

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO**

**FACULTAD DE AGONOMIA Y VETERINARIA**

**Informe de Trabajo Final presentado para optar al grado de  
Médico Veterinario**

**Modalidad: Monografía**

**“Una revisión acerca de la adhesina P97 de *Mycoplasma  
hyopneumoniae*: Implicancias en la determinación de tipos  
genéticos del agente, desarrollo de nuevas vacunas y  
herramientas diagnósticas.”**

**Alumno: Cots, Agustina.**

**DNI: 37.107.176**

**Director: Dr. Tamiozzo, Pablo.**

**Río Cuarto, Córdoba.**

**Diciembre 2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO FACULTAD DE  
AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

“Una revisión acerca de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*:  
Implicancias en la determinación de tipos genéticos del agente, desarrollo de  
nuevas vacunas y herramientas diagnósticas.”

Autor: Agustina Cots

DNI: 37.107.176

Director: Pablo Tamiozzo

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión

Evaluadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fecha de Presentación: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Secretario Académico

## ÍNDICE

Resúmen.....	1
1. La neumonía enzoótica porcina.....	2
2. El agente: <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	2-3
3. Distinta virulencia entre cepas de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	3-4
4. Diversidad genética de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	4-5
5. Análisis del número variable de regiones repetidas en tándem (VNTR) de P97.....	5-7
6. VNTR de P97 y su relación con la patogenia de la neumonía enzoótica porcina.....	8-10
7. Vacunas contra la neumonía enzoótica porcina.....	10-12
8. Vectores vacunales con P97.....	12
8.a. Vacunas vectorizadas en bacterias.....	12-14
8.b. Vacunas vectorizadas en Adenovirus.....	15-16
9. Vacunas de subunidades proteicas y de ADN que contienen P97.....	17-19
10. P97 en el desarrollo de pruebas serológicas.....	19
11. Conclusiones.....	20
12. Referencias bibliográficas.....	21-35

## RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo fue realizar una revisión sobre la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* destacando la importancia de esta proteína como mediadora principal de la virulencia del agente. Para ello se han descrito las variaciones genéticas entre las distintas cepas y los mecanismos más importantes de infección e interacción con el huésped.

Debido a las grandes pérdidas en la industria del ganado porcino que produce *Mycoplasma hyopneumoniae* como uno de los principales agentes de la Neumonía Enzoótica porcina, se ha hecho hincapié sobre el desarrollo de vacunas que incluyen diferentes antígenos y los resultados a nivel inmunitario que se obtienen al utilizarlas, así como también se menciona la implicancia de la P97 en los métodos serodiagnósticos.

## SUMMARY

The main objective of this work was to perform a review about the P97 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* highlighting the importance of this protein as the main mediator of agent virulence. Thus we have described the genetic variations between the different strains and also the most important mechanisms of infection and interaction with the host.

Due to large losses in the pig industry producing *Mycoplasma hyopneumoniae* as one of the main agents of Porcine Enzootic Pneumonia, emphasis has been placed on the development of vaccines that include different antigens and the immunological results obtained when using them, as well as the implication of P97 in serodiagnostic methods.

## **1. La neumonía enzoótica porcina.**

La neumonía enzoótica porcina (NEP) es una enfermedad respiratoria crónica presente en la gran mayoría de los sistemas de cría de cerdos intensivos (Thacker & Minion, 2012). Es una de las enfermedades de mayor impacto en la industria porcina, causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. La infección se establece a través de la colonización del epitelio respiratorio del cerdo, un proceso iniciado por la adherencia del patógeno a los cilios del huésped. El éxito de la colonización resulta en ciliostasis y desprendimiento de los cilios de la superficie epitelial, alterando de esta manera la barrera mecánica mucociliar y dejando al huésped susceptible a infecciones secundarias (Blanchard *et al.* 1992; DeBey *et al.* 1994).

Esta enfermedad se caracteriza por una elevada morbilidad, que puede llegar al 100%, pero con baja o nula mortalidad en caso de no existir infecciones secundarias causadas por otras bacterias como *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* o *Arcanobacterium pyogenes*.

Cerdos de todas las edades son susceptibles a la infección por *M. hyopneumoniae*, sin embargo, la enfermedad usualmente no se presenta en animales menores de 6 semanas de edad. La NEP presenta una prevalencia particularmente alta en animales de desarrollo y terminación y la severidad de la misma depende de diversos factores como por ejemplo la presión de infección, la presencia de infecciones secundarias concomitantes y las condiciones ambientales (Maes *et al.* 2008).

Cuando la infección por *M. hyopneumoniae* no se complica con infecciones secundarias, la enfermedad puede tomar un curso subclínico en cuyo caso el impacto de la misma se verá reflejado en algunos índices productivos como la pérdida de la ganancia diaria de peso, aumento en los valores de conversión alimenticia y aumento en el tiempo de terminación de los animales.

## **2. El agente: *Mycoplasma hyopneumoniae***

*M. hyopneumoniae* es un microorganismo procariota que taxonómicamente pertenece al género *Mycoplasma*, a la familia *Mycoplasmataceae*, al orden *Mycoplasmatales* y a la clase *Mollicutes*. Una de las características que los distingue de las Eubacterias es la ausencia

total de pared celular y su incapacidad de sintetizar peptidoglicano y sus precursores, condición que les confiere resistencia a antibióticos beta-lactámicos. Son microorganismos con un genoma de tamaño reducido y con un bajo contenido de Guanina-Citocina. El género *Mycoplasma* representa los microorganismos de vida libre más pequeños que existen (Hayflick & Razin, 2010) y en relación a su filogenia, algunos autores señalan que provienen de una evolución reductiva lo que determina su simplicidad genotípica y fenotípica (Woese *et al.*, 1980). Presenta una morfología de células redondas u ovals de un diámetro de 400 a 1200 nm, está limitado por una membrana de aproximadamente 10 nm de espesor compuesta principalmente de lípidos y proteínas y presenta una cápsula externa de 20 nm de espesor. En el interior de su citoplasma se puede distinguir material nuclear fibrilar y ribosomas (Tajima & Yagihasi, 1982).

El cultivo y aislamiento del microorganismo es lento y complejo y a pesar de ser considerada la “prueba de oro” es una técnica poco sensible debido a las exigencias nutricionales del agente. En caso de obtener el aislamiento, el mismo debe ser diferenciado de otros micoplasmas de los cerdos, como *M. flocculare* que presenta incluso similitudes antigénicas a *M. hyopneumoniae*. La diversidad antigénica entre cepas de *M. hyopneumoniae* fue identificada por primera vez por Frey *et al.* (1992) y luego ratificada por Artiushin & Minion (1996) y Kokotovic *et al.* (1999).

### **3. Distinta virulencia entre cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Las diferencias genéticas entre cepas de *M. hyopneumoniae* han sido demostradas desde hace tiempo (Artiushin & Minion, 1996), pero recién en 2003, Vicca *et al.* encontraron diferencias significativas entre cepas de *M. hyopneumoniae* de alta, moderada y baja virulencia en relación a la severidad de signos clínicos (tos no productiva), lesiones pulmonares macro y microscópicas y serología. Desde entonces la diversidad genética del microorganismo ha sido estudiada alrededor del mundo, incluso en nuestro país utilizando distintos marcadores moleculares (Stakenborg *et al.*, 2005; 2006; de Castro *et al.*, 2006; Tamiozzo *et al.*, 2011).

También se ha demostrado la variabilidad en el proteoma de cepas de referencia patógenas (232 y 7448) y no patógenas (cepa J) (Pinto *et al.*, 2007; 2009; Li *et al.* 2009) y de cepas de campo (Calus *et al.*, 2007). Dado que las cepas de referencia tienen el 84% de los genes en común y que no existe hasta el momento un marcador molecular capaz de diferenciar entre cepas de alta y de baja virulencia, de estos trabajos se desprende que existen modificaciones post-traduccionales que diversifican las proteínas. A pesar de que existe una variabilidad en el proteoma

de más del 30%, no se ha relacionado tampoco tal variabilidad con la mayor o menor virulencia de las mismas.

Si bien la dinámica de la infección y la severidad de la NEP depende en gran medida de prácticas de manejo y condiciones de alojamiento de los animales, Maes *et al.* 2008 considera que juega un papel importante la virulencia de la/s cepa/s de *M. hyopneumoniae* circulante/s dentro la piara (Vicca *et al.*, 2003), hecho que ya es aceptado por la comunidad científica.

En este sentido, algunos estudios han demostrado que las cepas de *M. hyopneumoniae* de alta virulencia tienen mayor capacidad de inducir lesiones pulmonares y procesos inflamatorios más marcados respecto a cepas de baja virulencia (Meyns *et al.*, 2007), o que lechones de 28 días de edad inoculados con cepas de *M. hyopneumoniae* de baja virulencia no fueron protegidos contra la descarga experimental 28 días después con cepas de alta virulencia. Por el contrario, basándose en parámetros clínicos y patológicos hallaron que la infección previa con cepas de baja virulencia (que no produjeron signos clínicos severos por sí mismas) puede aumentar la severidad de la infección posterior con cepas de alta virulencia, por lo que desaconsejan el uso de las cepas de baja virulencia para su uso como vacunas vivas (Villarreal *et al.*, 2009).

#### **4. Diversidad genética del agente**

La secuenciación del genoma completo de *M. hyopneumoniae* sería la prueba de oro para determinar diferencias genéticas (Oliveira *et al.*, 2008), si bien existen hasta la actualidad cuatro cepas totalmente secuenciadas: la cepa 232, la cepa J, la cepa 7448 y la cepa 168 (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011) otros métodos de diferenciación más rápidos y baratos están disponibles.

Existen varias técnicas para establecer dichas diferencias. Éstas pueden dividirse en aquellas que necesitan el aislamiento del microorganismo y aquellas que no. Dentro de las técnicas que necesitan el aislamiento tenemos el RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs), que ha sido descrita concretamente para *M. hyopneumoniae* (Artiushin & Minion, 1996) así como para otras especies de micoplasmas (Rawadi, 1998), según estudios más recientes (Stakenborg *et al.*, 2006), donde se evaluaron varias de estas técnicas, que si bien el poder de discriminación fue satisfactorio, el número de bandas obtenidos fue bajo utilizando los cebadores anteriormente descritos (Artiushin & Minion, 1996). Presenta además baja reproducibilidad, puesto que hay que correr todas las muestras juntas y esto es una limitante cuando se quieren

comparar cepas viejas con cepas nuevas, incluso ha sido informada la existencia de variación entre distintas corridas de geles (Hong *et al.*, 2005). El AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) también ha sido descrita previamente para *M. hyopneumoniae* (Kokotovic *et al.*, 1999), y al obtener un número elevado de bandas la hacen una técnica reproducible, pero a su vez, esto puede entorpecer la interpretación de resultados. Es una técnica con un poder discriminatorio de más del 99% (Stakenborg *et al.*, 2006). El AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) fue descrito hace tiempo por Artiushin & Minion (1996), pero no es una técnica que haya sido luego rescatada y utilizada en otros estudios posteriores. La electroforesis de campos pulsantes (PFGE por las siglas en inglés de: Pulsed Field Gel Electrophoresis) descrita por Stakenborg *et al.* (2005) sería la técnica de elección por su reproducibilidad y alto poder discriminatorio, pero presenta como limitantes el costo del equipo para poder llevarla a cabo.

Como se mencionara anteriormente, las técnicas que no necesitan del aislamiento del agente son de elección para la tipificación del mismo, debido a las dificultades en el cultivo del agente. Dentro de estas, las más utilizadas son la tipificación de secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés de: Multiple Locus Sequence Typing) y el análisis multilocus del número variable de regiones repetidas en tándem (MLVA por sus siglas en inglés de: Multiple-Locus Variable-number of Tandem Repeat –VNTR-Analysis).

El análisis MLST es una herramienta robusta, con alto poder discriminatorio que ha sido utilizada en estudios de brote (Kuhnert & Overesch, 2014), en la tipificación del agente en cerdos salvajes (Kuhnert *et al.*, 2011) y en cerdos de criaderos confinados (Mayor *et al.*, 2008), sin embargo presenta cierta limitación cuando se trabaja con muestras clínicas, debido fundamentalmente a la carga del agente en las mismas.

Afortunadamente, el análisis MLVA ha sido señalado como una herramienta molecular capaz de tipificar el agente a partir de muestras clínicas (de Castro *et al.*, 2006, Vranckx *et al.*, 2011, Tamiozzo *et al.*, 2015).

## **5. Análisis del número variable de regiones repetidas en tándem (VNTR) de P97**

De un amplio repertorio de 22 VNTR primeramente descritos (de Castro *et al.*, 2006), cuatro de ellos han demostrado ser altamente polimórficos (P97R1, P146R3, H4 y H5) y adecuados para la tipificación del agente sin cultivo previo (Vranckx *et al.*, 2011). Debido a que el VNTR P97 y la proteína que codifica han sido exhaustivamente estudiados a nivel global y se



considera la adhesina más importante de *M. hyopneumoniae* pensamos que es importante resumir la información disponible en la presente revisión.

Como se verá en detalle más adelante, P97 tiene 2 regiones repetidas en tándem, R1 presenta el motivo de repetición AAKP [EV] y R2 P[NS]QGKKAEG([ATP])- (De Castro *et al.* 2006). A nivel genético, se determina el número de tripletes de nucleótidos que codifican para estos aminoácidos y se determina así el número de regiones repetidas en tándem de P97, junto con otros VNTR para la identificación de diferentes tipologías genéticas del agente.

Conocer el número de repeticiones en tándem de P97 es importante puesto que la adhesina que codifica, proteína asociada a la superficie celular, es esencial para adhesión del *M. hyopneumoniae* al epitelio respiratorio del cerdo y la posterior aparición de la enfermedad (Hsu *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1995). Sin embargo, se ha sugerido que P97 no es el único determinante de la adhesión, ya que incluso la cepa J de *M. hyopneumoniae*, que tiene una baja actividad de adherencia y es avirulenta, presenta más de siete unidades de repetición en la R1 (siete es el número mínimo de repeticiones que debe tener una cepa para adherirse)- Minion, 1998; Vasconcelos *et al.* 2005-. Por lo tanto, otras adhesinas, junto con P97, probablemente determinen la capacidad de adhesión de una cepa de *M. hyopneumoniae* dado que debe ser un determinante importante de la patogenicidad.

Para la determinación de la diversidad genética del agente, nunca se ha utilizado solamente el VNTR P97, sino que siempre se combina con el análisis de otras regiones repetidas en tándem (Lin, 2001; De Castro *et al.*, 2006; Stakenborg *et al.*,2006; Vranckx *et al.*, 2011; Nathues *et al.*, 2011; Vranckx *et al.*,2012; Charlebois *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2015a;b; Pantoja *et al.*, 2016; Sosa, 2017; Rebaque *et al.*,2017).

Es importante señalar también que tanto a partir de cepas de *M. hyopneumoniae* (Lin ,2001; De Castro *et al.*, 2006; Stakenborg *et al.*,2006; Nathues *et al.*, 2011; Charlebois *et al.*, 2014), como así también a partir de muestras clínicas como hisopados nasales o lavados broncoalveolares (Vranckx *et al.*, 2011; Vranckx *et al.*,2012; Dos Santos *et al.*, 2015a;b; Pantoja *et al.*, 2016; Sosa, 2017; Rebaque *et al.*,2017) es posible la determinación de las unidades de repetición de P97. En la tabla 1 se muestran los estudios que, en los últimos 15 años, analizaron este VNTR, la región estudiada (R1 y/o R2) así como también el tipo de muestra analizada y la región geográfica en donde se realizaron los mismos. Estos estudios a nivel genético han permitido identificar la diversidad del agente a nivel regional, entre y dentro de piaras incluso dentro del mismo animal y como puede observarse en la tabla 1, la R1 ha sido la más analizada (Lin ,2001;

De Castro *et al.*, 2006; Stakenborg *et al.*,2006; Vranckx *et al.*, 2011; Nathues *et al.*, 2011; Vranckx *et al.*,2012; Charlebois *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2015a;b; Pantoja *et al.*, 2016; Sosa, 2017; Rebaque *et al.*,2017).

Aunque, como se dijo, el esquema propuesto de los *loci* más polimórficos incluye además de P97, las regiones R3 de P146, H4 y H5 (De Castro *et al.*, 2006; Vranckx *et al.*, 2011), un reciente estudio ha propuesto la tipificación de *M. hyopneumoniae* analizando solo P97 y P146 (Dos santos *et al.*, 2015a)

P97		Muestras	Localización geográfica	Referencia
R1	R2	analizadas		
X		Cepas de campo	EEUU	Lin (2001)
X	X	Cepas vacunales	Brasil	De Castro <i>et al.</i> (2006)
X	X	Cepas de campo	Bélgica y Lituania	Stakenborg <i>et al.</i> (2006)
X		Muestras clínicas	Bélgica	Vranckx <i>et al.</i> (2011)
X		Cepas de campo	Alemania	Nathues <i>et al.</i> (2011)
X		Muestras clínicas	Bélgica	Vranckx <i>et al.</i> (2012)
X	X	Cepas de campo	Francia	Charlebois <i>et al.</i> (2014)
X		Muestras clínicas y cepas de campo	Brasil, España, México y EEUU	Dos Santos <i>et al.</i> (2015a)
X		Muestras clínicas	Brasil	Dos santos <i>et al.</i> (2015b)
X		Muestras clínicas	EEUU	Pantoja <i>et al.</i> (2016)
X		Muestras clínicas	Argentina	Sosa (2017)
X		Muestras clínicas	Argentina	Rebaque <i>et al.</i> (2017)

**Tabla 1. Región de P97 analizada de acuerdo al tipo de muestra y la región geográfica en donde se realizaron los estudios citados.**

## 6. VNTR de P97 y su relación con la patogenia de la neumonía enzoótica porcina

Después de la inhalación de los aerosoles expulsados al medio ambiente por los cerdos infectados mediante los accesos de tos, el agente debe atravesar la capa de moco que contiene un sin número de moléculas glicosiladas que sirven como “carnada” para las adhesinas de la superficie celular del *M. hyopneumoniae* y de otras bacterias, evitando así la colonización del epitelio ciliar. Las adhesinas, por medio de modificaciones postraduccionales son presentadas en la superficie celular del microorganismo e interactúan con un gran número de moléculas presentes en las células del epitelio ciliar, en la matriz extracelular de las células del epitelio del cerdo y otras proteínas circulantes en el medio interno del huésped.

Cuando el agente finalmente coloniza el epitelio ciliar respiratorio al adherirse a la punta y a lo largo de las cilias comprometiendo el barrido mucociliar, causa ciliostasis y muerte de las células del epitelio, dejando expuesto compuestos subepiteliales. Todo esto genera una respuesta inflamatoria que puede resultar exagerada.

El plasminógeno es abundante en el epitelio ciliado y en el lavado bronquio alveolar de cerdos sanos o enfermos de NEP. Por medio de la unión del plasminógeno a estas proteínas de superficie de *M. hyopneumoniae* habría un cambio en la estructura terciaria del plasminógeno que facilita el paso a plasmina por parte de los factores activadores del plasminógeno. La plasmina participa en la degradación de los coágulos de fibrina y promueve la invasión de los tejidos del huésped, ya que degrada proteínas de la matriz extracelular y membranas basales, por esta razón los niveles de plasmina están aumentados solamente en cerdos infectados. El *M. hyopneumoniae* se une también a la fibronectina, que se encuentra libremente en fluidos corporales, componentes de la matriz extracelular, en las superficies celulares y facilita la adhesión y la invasión de los tejidos por parte del agente.

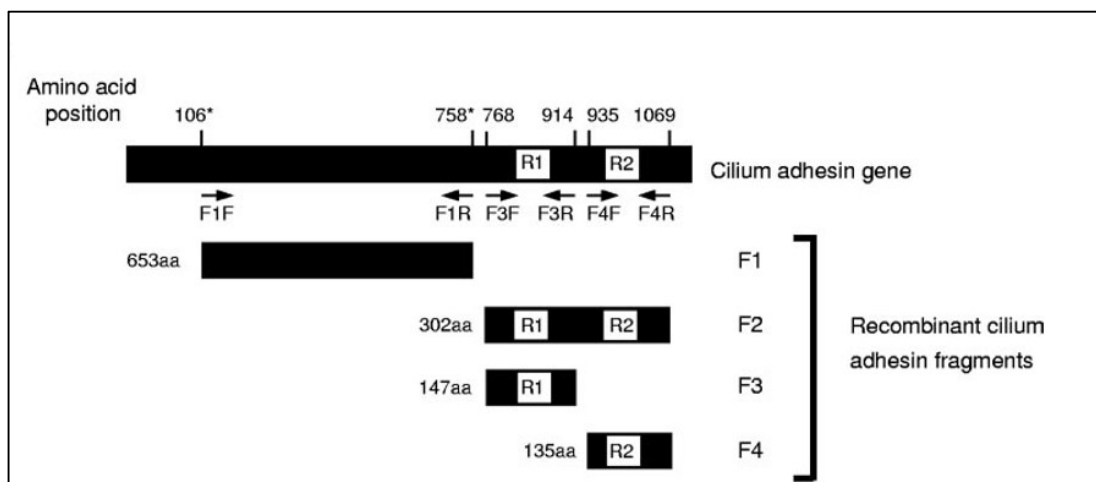
Se ha demostrado que muchos patógenos son capaces de reclutar glicosaminoglicanos exógenos (tales como Heparina, Heparán Sulfato, y Sulfato de Condroitina B) a sus superficies para facilitar la interacción entre el patógeno y los componentes de la matriz extracelular del huésped (Menozzi *et al.* 2002; Wadstrom *et al.* 1999). Se cree que la unión a los glicosaminoglicanos permite a la bacteria evadir el sistema inmune (Chen *et al.* 1995; Dubreuil *et al.* 2002) y modular la respuesta inflamatoria (Duensing *et al.* 1999), debido a interacciones con Quimosinas y Citoquinas del huésped. Por lo tanto, las proteínas de unión de los glicosaminoglicanos se consideran de vital importancia para llevar a cabo el proceso de infección.

Las familias de adhesinas P97 y P102 juegan un rol central en la adhesión del agente al epitelio del tracto respiratorio (Bogema *et al.*, 2011; 2012; Deutscher *et al.*, 2010; 2012, Hsu 1997, Jenkins *et al.*, 2006, Seymour *et al.*, 2010; 2011, 2012, Wilton *et al.* 2009, Zhang *et al.*, 1994). P 97 y otras adhesinas sufren modificaciones post-transduccionales, a veces poco ortodoxas, para presentar en la superficie de la célula del patógeno, distintas proteínas, aunque este mecanismo no está del todo comprendido.

Como se dijo, y al igual que varias adhesinas de *M. hyopneumoniae* caracterizadas, P97 cuenta con elementos repetitivos en su secuencia de aminoácidos (Boguslavsky *et al.* 2000; Dallo *et al.* 1990; Hsu *et al.* 1997); contiene dos regiones repetitivas, designadas como R1 y R2, localizadas en el extremo Carboxi (C) terminal (Hsu *et al.* 1998). Dentro de R1, la secuencia AAKPV/E fue identificada como el epítotope de unión a los cilios (Hsu *et al.* 1998), y según estudios realizados por Minion *et al.* 2000 se requieren al menos siete repeticiones para lograr una unión funcional, aunque otros autores como Hsu *et al.* 1998; Minion *et al.* 2000 han demostrado que se requiere un mínimo de ocho copias de la repetición R1 para lograr la unión, y también demostraron que no son suficientes para conferir la capacidad de adherirse *in vivo*. En cuanto a la R2, está involucrada en la unión del *M. hyopneumoniae* a la matriz extracelular del epitelio respiratorio (Jenkins *et al.* 2006). Estos datos sugieren que hay proteínas y mecanismos adicionales implicados en la adhesión al epitelio respiratorio. A su vez, estudios anteriores determinaron que son necesarias al menos 2,5 copias de la repetición R1 para su reconocimiento por el sistema inmune del cerdo (Hsu *et al.* 1998).

Como ventaja del estudio del VNTR de P97 se puede mencionar que ha permitido identificar la diversidad del agente a nivel regional, entre y dentro de las piaras, e incluso dentro del mismo animal, como desventaja podemos decir que el estudio de un solo VNTR muchas veces no permite la tipificación correcta del agente.

Jenkins *et al.* (2006) mostraron que la proteína P97 sufre modificaciones postraduccionales obteniendo hasta 4 fragmentos o productos, a saber: fragmentos F1, F2 (que contienen ambas regiones de repetición, R1 y R2), F3 (que sólo contiene R1) y F4 (que sólo contiene R2) –figura 1-. Mientras que F1 y F2 se unieron a heparina de manera dosis dependiente y saturable, F3 y F4 se unieron, pero débilmente y de una manera no saturable, indicando una interacción no específica (figura 1).



**Figura 1. Tomada de Jenkins *et al.*, 2006. Representación esquemática del gen de la adhesina P97 y los diferentes fragmentos (con sus correspondientes números de aminoácidos –aa-) que pueden obtenerse mediante procesos de endoproteólisis post-transducciones. F1: Fragmento 1, F2: Fragmento 2, F3: Fragmento 3, F4: Fragmento 4. R1: Región 1, R2: Región 2.**

A modo de conclusión, si bien no es claro aún, se cree que el número de repeticiones en tándem de las regiones R1 y R2 de P97 podrían influir en la conformación tridimensional de los fragmentos resultantes después de la endoproteólisis. De hecho, para la R1 se demostró que a mayor número de repeticiones, mayor afinidad a la heparina, por ende existe más probabilidad de interacción con el huésped y mejor colonización del tracto respiratorio.

## **7. Vacunas contra la neumonía enzoótica porcina**

Las vacunas comerciales actualmente disponibles consisten mayormente de bacterinas (células enteras de *M. hyopneumoniae* inactivadas) con adyuvantes que mejoran la respuesta inmune, tanto humoral como celular. Tales vacunas presentan ciertas desventajas ya que no evitan lesiones pulmonares, ni impiden la colonización por parte del agente (Thacker *et al.*, 1998). Tampoco son capaces de minimizar la transmisión del microorganismo, aunque puede reducir el número de microorganismos en el tracto respiratorio (Meyns *et al.*, 2006). Sin embargo, muchos estudios han demostrado reducción de los síntomas clínicos, de las lesiones pulmonares, mejoras en la performance productiva de los cerdos y por ende mayores beneficios económicos para el productor (Maes *et al.*, 2008; Sibila *et al.*, 2007; Maes *et al.*, 1998; 1999) al utilizar tales bacterinas.

El mecanismo por el cual las vacunas ejercen protección no es del todo claro. Después de la vacunación intra muscular (IM) hay una respuesta inmune humoral y celular (Thacker *et al.*, 1998), pero el rol protector de ambas respuestas no ha sido conclusivo. Si bien las bacterinas comerciales inducen una respuesta de anticuerpos específicos en suero, no indica necesariamente una respuesta inmune protectora. Las limitantes de las vacunas actualmente disponibles son las que han impulsado e impulsan en la actualidad el desarrollo de nuevas vacunas.

El desarrollo de una vacuna de manera convencional comienza con el cultivo del microorganismo, la identificación y selección de los antígenos, la obtención de los mismos y posteriores estudios de inmunogenicidad. En el año 2000, Rappouli cambió completamente el enfoque en el desarrollo de las vacunas, con la denominada vacunología reversa. En este nuevo enfoque, se comienza a trabajar con las bases de datos de genomas, ampliamente disponibles, mediante análisis *in silico* se seleccionan candidatos vacunales, se obtienen los antígenos y se realizan estudios de inmunogenicidad. Esto resulta en una considerable reducción de tiempo para la obtención de vacunas. El uso de la vacunología reversa en *M. hyopneumoniae* se justifica ya que es un microorganismo de difícil cultivo, se dispone de 4 genomas completos (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011), el tamaño de su genoma es reducido y tiene un limitado número de proteínas de membrana o secretadas.

Todo esto, en contraste con el hecho de que la mayoría de las vacunas actualmente disponibles son bacterinas con distintos adyuvantes, que para su desarrollo necesitan del cultivo del microorganismo que resulta costoso y requiere de mucho tiempo debido a las exigencias nutricionales del mismo, resulta en una alternativa interesante que es la producción de antígenos recombinantes.

Si bien se ha logrado clonar, expresar y purificar numerosas proteínas de membrana y secretadas (Simionatto *et al.*, 2010; 2012; Marchioro *et al.*, 2012) y ha sido testeada su antigenicidad en cerdos (Marchioro *et al.*, 2012), a menudo existen problemas en cada una de estas diferentes etapas. El clonado de los genes candidatos y la expresión de proteínas recombinantes puede verse afectado ya que *M. hyopneumoniae* no utiliza el código genético de la misma manera que otros procariotas, como *E. coli* por ejemplo, y hay que desarrollar técnicas alternativas para lograrlo (Simionatto *et al.*, 2009). Sucede también que muchas veces las proteínas fabricadas por el vector resultan tóxicas para el mismo obteniéndose por ejemplo proteínas insolubles que dificultan su posterior manipulación. Los estudios de inmunogenicidad en ratas son fáciles de realizar en nuestro medio, pero los resultados obtenidos en un modelo murino son difícilmente extrapolables a otras especies. No así los estudios de inmunogenicidad en cerdos, pero son

costosos, ya que debería trabajarse con animales libres de patógenos específicos, en instalaciones especialmente diseñadas y acondicionadas que muchas veces escapan a las posibilidades de nuestros centros de investigación.

## **8. Vectores vacunales con P97**

*M. hyopneumoniae* inicia el daño interactuando con el revestimiento epitelial de la mucosa respiratoria, la cual constituye la primera barrera de defensa. La respuesta inmune de la mucosa está caracterizada por la producción de Inmunoglobulina tipo A (IgA), ésta proteína previene la interacción del patógeno con los receptores de superficie. La inducción de una respuesta inmune periférica a través de una inmunización parenteral no eleva una significativa respuesta de la mucosa (IgA), sin embargo la inmunización de la mucosa es capaz de inducir inmunidad protectora tanto en secreciones externas como en compartimientos inmunes periféricos (Marinero *et al.*, 1995).

Concretamente refiriéndonos a P97 varios estudios han vectorizado alguna de estas proteínas (y otras) en distintas bacterias y virus que han sido administradas por diferentes vías en aras de obtener una buena respuesta inmune. P97 cumple un prerrequisito importante para el desarrollo de una subunidad vacunal efectiva, ya que es considerada la adhesina más importante para *M. hyopneumoniae* (Zhang y Wise, 1996; Wilton *et al.* 1998). Los cerdos infectados desarrollan respuesta inmune contra P97, y los anticuerpos producidos contra esta proteína previenen la adhesión del patógeno a las células del epitelio respiratorio *in vitro* (Zhang y Wise, 1996). Además, el gen que codifica para P97 ha sido encontrado en todos los aislamientos de *M. hyopneumoniae* (Wilton *et al.* 1998; Meyns *et al.* 2007), y esta proteína está bien caracterizada.

Fragmentos de estas proteínas han sido vectorizadas en diferentes sistemas, como en bacterias: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli*, *Pseudomona*, *Salmonella* y en *Adenovirus*.

### **8. a. Vacunas vectorizadas en bacterias**

En el caso de *Erysipelothrix rhusiopathiae*, varios estudios utilizaron distintas cepas de esta bacteria como vector, y en todos casos se expresó la misma porción de la adhesina P97, el extremo C-terminal, que es el responsable de la adherencia. Así, Shimoji *et al.* (2002) al utilizar la cepa acapsulada y atenuada YS-1, concluyeron, después de la inoculación intranasal (IN) en cerdos, que hubo un aumento de IgA específica contra P97, lo que convertía a este sistema

en una herramienta prometedora para el uso en vacunas. Un año después, los mismos autores (Shimoji *et al.*, 2003) utilizaron otra cepa de *E. rhusiopathiae* (cepa YS-19, derivada de YS-1) que administrada intranasal (IN) no demostró ninguna diferencia significativa en la respuesta inmune humoral (IgG, IgA e IgM) entre cerdos vacunados y no vacunados, pero sí una respuesta inmune celular y una reducción en la severidad de las lesiones pulmonares cuando se comparaban cerdos inmunizados con la cepa YS-19, YS-1 y el grupo control, no inmunizado. Por último, Ogawa *et al.* (2009) utilizaron una tercera cepa recombinante de *E. rhusiopathiae* (cepa Koganei 65-0.15) que inoculada oralmente (PO) en cerdos y vía Subcutánea (SC) en ratones, también logró demostrar una reducción en la severidad de las lesiones pulmonares.

Chen *et al.* (2006), evaluaron la respuesta inmune sobre ratones administrándoles vía oral (PO) una vacuna conformada por la proteína recombinante P97 (expresando R1) vectorizada en una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium (denominada aroA CS332). Se observó una respuesta inmune mediada por células (tipo Th1), es decir que los linfocitos T-helper 1 secretan, además de Interleucina 2, una serie de linfoquinas (Interferón Alfa y Factor de Necrosis Tumoral) que son los principales activadores de macrófagos y linfocitos citotóxicos, en otras palabras son los efectores de la inmunidad mediada por células (Margni *et al.* 1996), pero ninguna respuesta inmune de tipo humoral ni en suero, ni en lavados pulmonares. Matic *et al.* (2009), utilizaron como vector una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium (denominada aroA STM-1) que expresaba el F2 de P97 junto con NrdF (Ribonucleótido reductasa) y demostró al inocular vía oral (PO) a ratones, una diferencia en la respuesta inmune humoral de los animales vacunados.

En la tabla 2 se muestran los principales resultados obtenidos en los trabajos revisados. Aunque las vacunas vivas utilizadas mostraron buenos resultados en relación a la respuesta inmune de los animales vacunados, ya es reconocido que el nivel de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* no se correlaciona con la protección (Thacker *et al.*, 1998). Dentro de las posibles desventajas del potencial uso de este tipo de vacunas es que, al ser vivas, hay que suspender el tratamiento antibiótico; y tanto el almacenamiento como la administración pueden llegar ser más engorrosos.



Antígeno utilizado	Vía de administración	Principales resultados	Referencia
<b>Proteína recombinante P97 en <i>Erisipelotrix rhusopathiae</i> YS-1</b>	Cerdos: IN	Buena respuesta inmune local y sistémica.	Shimoji <i>et al.</i> 2002
<b>Proteína recombinante P97 en <i>Erisipelotrix rhusopathiae</i> YS-19</b>	Cerdos: IN	Respuesta inmune celular contra P97. Reducción de severidad de lesiones pulmonares	Shimoji <i>et al.</i> 2003
<b>Proteína recombinante P97 en <i>Erisipelotrix rhusopathiae</i> Koganei 65-0.15</b>	Ratones: SC Cerdos: PO	Reducción de la severidad de las lesiones pulmonares	Ogawa <i>et al.</i> 2009
<b>Proteína recombinante P97 (R1) en cepa aroA CS332 atenuada de <i>Salmonella Typhimurium</i></b>	Ratones: PO	No se observó respuesta inmune humoral. Sí respuesta inmune celular	Chen <i>et al.</i> 2006
<b>Proteína recombinante P97 (F2) y NrdF en cepa aroA STM-1 de <i>Salmonella Typhimurium</i></b>	Ratones: PO	Respuesta inmune humoral en vacunados	Matic <i>et al.</i> 2009

**Tabla 2.** Vacunas vivas utilizadas como vectores de P97 y/u otras proteínas de *M. hyopneumoniae*. Se muestra la especie animal en la que fue testeada, la vía de administración y los principales resultados obtenidos. Referencias: IN (Intranasal), SC (Subcutánea), PO (oral).

## 8. b. Vacunas vectorizadas en Adenovirus

Los adenovirus se utilizan habitualmente como vectores para transportar genes, ya sea para la administración de vacunas o en la terapia génica. Los vectores recombinantes de Adenovirus (rAd) tienen un tropismo natural por las células mucosas del tracto respiratorio porcino (Papp *et al.* 1998; Rosenthal *et al.* 1996) por lo que representan una ventaja para el diseño de vacunas contra NEP. Además, los rAd son capaces de entregar eficientemente los transgenes recombinantes a las células presentadoras de antígenos, capaces de inducir respuesta inmune específica tanto celular como humoral contra las proteínas recombinantes expresadas, adecuado para producción de alto rendimiento *in vitro* (Graham, 1987; Fallaux *et al.* 1998). Considerando estas ventajas, Okamba *et al.* (2010) lograron generar vectores de Adenovirus recombinantes (en este caso utilizó Adenovirus tipo 5) expresando la porción C-terminal de P97 (conteniendo R1 y R2) designados como rAdP97c y testearon la capacidad de inducir respuesta inmune en cerdos y ratones. En este estudio se comparó el efecto de la vacuna recombinante *versus* una vacuna comercial administrada por vías IN e IM y se encontró que aquellos animales vacunados con rAdP97c generaron una buena respuesta inmune de tipo humoral. Observaron niveles mayores de IgG2 que IgG1 tanto sistémicos como localmente en los animales vacunados con el vector. También encontraron que aquellos animales vacunados con el vector tenían menos lesiones pulmonares macroscópicas y menor cantidad de *M. hyopneumoniae* recuperados de los tejidos, además de presentar mejores índices de aumento diarios de peso vivo respecto a los no vacunados. A pesar de todo lo dicho anteriormente, este autor concluye en que la vacuna comercial sigue proveyendo un mejor efecto protector, ya que realizó la comparación entre tres grupos, uno de animales no inmunizados (control), otro de animales inmunizados con la vacuna comercial y otro con la vacuna recombinante y a pesar de que ésta da buenos resultados, no superan a los arrojados por la vacuna comercial. En 2007, el mismo autor (Okamba *et al.*, 2007) había utilizado la porción C-terminal de P97 y la probó en ratones, concluyendo que en animales vacunados hubo una buena respuesta inmune humoral (IgG) en suero y lavados bronco alveolares.

Otro autor que logró generar vectores recombinantes de Adenovirus fue Roques *et al.* (2013), utilizando una proteína recombinante del virus formada por la glicoproteína 5 del virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio porcino (PRRSV) denominada GP5, la cápside proteica del Circovirus porcino tipo II (Cap) y la porción C-terminal de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae* (P97). En los ratones inoculados vía IM se encontró una respuesta específica de anticuerpos contra estos inmunógenos, y se observó un efecto inmunopotenciador de P97, ya que

la presencia de esta adhesina mejoró la respuesta de anticuerpos contra GP5 y Cap. En la tabla 3 se muestran los principales resultados obtenidos en los trabajos revisados.

Antígeno utilizado	Vía de administración	Principales resultados	Referencia
<b>Proteína recombinante P97 (R1 y R2) y Adenovirus tipo 5 (humano) (rAdP97c)</b>	Cerdos y ratones: IM e IN	Buena respuesta inmune humoral, mejor ganancia diaria de peso y reducción de lesiones pulmonares macroscópicas en vacunados con rAdP97c. Menor efecto protector que la vacuna comercial	Okamba <i>et al.</i> 2010
<b>Adenovirus recombinante que expresa la proteína quimérica formada por GP5 (PRRSV), Cap (Circovirus), P97C (Mycoplasma)</b>	Ratones: IM	Inmunidad anticuerpo-específica. Efecto inmunopotenciador de P97.	Roques <i>et al.</i> 2013
<b>Proteína recombinante porción C terminal de P97 (rAdP97c)</b>	Ratones: IM e IN	Respuesta inmune humoral (IgG) en suero y lavados bronco alveolares	Okamba <i>et al.</i> 2007

**Tabla 3. Vacunas vivas utilizadas como vectores de P97 y/u otras proteínas de *M. hyopneumoniae*. Se muestra la especie animal en la que fue testeada, la vía de administración y los principales resultados obtenidos. Referencias: IN (Intranasal), IM (Intramuscular).**

## 9. Vacunas de subunidades proteicas y de ADN que contienen P97

Otra opción que se ha escogido en el diseño de nuevas vacunas contra la NEP que contienen fragmentos de P97 son las vacunas de subunidades proteicas. Para obtener los fragmentos proteicos y luego vacunar a los animales, se han utilizado diferentes sistemas de expresión. En el caso de *Escherichia coli*, Conceição *et al.* (2006), desarrollaron y evaluaron el efecto de una vacuna recombinante compuesta por la región R1 de P97 de *M. hyopneumoniae* fusionada con la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LTBR1) en ratones inoculados vía intramuscular (IM) e intranasal (IN), y demostraron una respuesta inmune celular y humoral (específicamente inmunidad local, IgA) y también una desviación en esa respuesta inmune hacia Th1 cuando la vía utilizada era IN y hacia Th2 cuando era IM, la respuesta Th2 se refiere a que los linfocitos T helper 2 secretan varias Interleucinas (IL 4, 5, 7, 9, 10 y 13) las cuales tienen efecto sobre la proliferación y diferenciación de los Linfocitos B y sobre la secreción de Inmunoglobulinas, es decir que corresponde a la inmunidad humoral (Margni *et al.* 1996), volviendo a lo dicho anteriormente, significaría que la vía de administración tiene una influencia en la modulación de la respuesta inmune con el adyuvante LTB. Por otro lado, Marchioro *et al.* (2014), evaluaron la capacidad de una proteína quimérica constituida por tres antígenos (Porción C-terminal de P97, proteína de shock de calor P42 y NrdF) y utilizando como adyuvante la LTB, para inducir inmunidad local y sistémica en diferentes grupos de cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae*. El resultado obtenido fue una buena respuesta inmune local (IgA) en mucosa y también una respuesta sistémica (IgG), pero aun así no tuvo un buen efecto protector cuando se comparó con la inmunidad producida por la bacterina comercial, utilizada como control. Contrariamente, Chen *et al.* (2001) evaluaron la respuesta inmune específica de Ig G en ratones y cerdos utilizando una vacuna constituida por la exotoxina no tóxica de *Pseudomona* y la porción R1 de P97 (PE-RR1) expresadas en *E. coli*, administradas tanto en ratones como en cerdos por vía IM. En ambas especies, se observó una mejor respuesta inmune sistémica (IgG) contra *M. hyopneumoniae* en aquellos vacunados con PE-RR1, que aquellos inmunizados con la bacterina comercial, utilizada como control. Lee *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio sobre los efectos de una vacuna compuesta por la proteína recombinante P97 (R1 y R2) denominada P97C y la proteína 3 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Apx3) expresadas en una *E. coli*. Se compararon diferentes grupos de animales (cerdos y ratones), algunos vacunados con Apx3, otros con P97C y otros con la combinación de ambos antígenos (AP97) por vía Subcutánea (SC) en ratones e IM en cerdos y encontraron diferencias en parámetros clínicos y también en lesiones pulmonares macroscópicas entre grupo de animales vacunados y grupo control.

Finalmente, Wolley *et al.* (2014) utilizaron un coctel de varios fragmentos de proteínas de *M. hyopneumoniae*: P97 (F2), P102r, P216 F3, P159F4, P135F4, P146F1 y P116F3 y aunque hallaron una buena respuesta inmune humoral en los cerdos vacunados IM, no fueron capaces de demostrar un efecto protector de la vacuna.

Antígeno utilizado	Vía de administración	Principales resultados	Referencia
<b>Proteína recombinante P97 (R1) y unidad B de enterotoxina lábil al calor de <i>Escherichia coli</i> (LTBR1)</b>	Ratones: IM e IN	Respuesta inmune celular y humoral, (específicamente inmunidad local) contra <i>M. hyopneumoniae</i> .	Conceição <i>et al.</i> 2006
<b>Proteína quimérica recombinante formada por tres antígenos: porción C-terminal de P97 (R1), proteína de shock de calor P42 y NrdF, fusionada con LTBR1 como adyuvante.</b>	Cerdos: IM e IN	Respuesta inmune local (IgA) en mucosa y sistémica (IgG) en suero. Mejor efecto protector de bacterina comercial comparada con la vacuna experimental.	Marchioro <i>et al.</i> 2014
<b>Proteína recombinante P97 (R1) y exotoxina A de <i>Pseudomonas</i> (PE) expresada en <i>E. coli</i></b>	Cerdos y Ratones: IM	Mejor respuesta inmune (IgG) en cerdos y ratones inmunizados con PE-RR1 que aquellos vacunados con la bacterina comercial.	Chen <i>et al.</i> 2001
<b>Protina recombinante P97 (R1 y R2) y proteína 3 de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (Apx3) y mezcla de ambos antígenos (AP97)</b>	Ratones: SC Cerdos: IM	Diferencias en parámetros clínicos y lesiones pulmonares macroscópicas entre vacunados y grupo control	Lee <i>et al.</i> 2014
<b>Cóctel de vacunas con ADN de cinco antígenos (P97, P36, P46, NrdF y P97R1); cóctel de proteínas vacunales con los mismos antígenos, y combinación de ambas.</b>	Ratones: IM y SC	Vacuna ADN: fuerte respuesta inmune Th1, inducción de inmunidad humoral antígeno dependiente. Inmunización SC con cóctel de proteínas: Inmunidad humoral y respuesta Th1 Combinación: fuerte respuesta inmune humoral y Th1.	Chen <i>et al.</i> 2008
<b>Coctel P97 (F2), P102r, P216 F3, P159F4, P135F4, P146F1 y P116F3</b>	Cerdos: IM	Buena respuesta inmune humoral. No hubo efecto protector	Woolley <i>et al.</i> 2014

**Tabla 4. Vacunas realizadas con subunidades proteicas (recombinantes) y de ADN. Se muestra la especie animal en la que fue testeada, la vía de administración y los principales resultados obtenidos. Referencias: IM (Intramuscular), IN (Intranasal), SC (Subcutánea).**

Los principales resultados de los trabajos revisados se muestran en la tabla 4. Aunque el uso de vacunas de subunidades ha demostrado buenos resultados en lo referidos a la respuesta inmune, a ya más de 30 años de la obtención de la primera proteína recombinante, son pocos los productos de este tipo que se encuentran en el mercado.

Por último, otra opción en uso de vacunas de ADN. En este sentido, Chen *et al.* (2008) evaluó la capacidad protectora potencial de vacunas recombinantes, por un lado utilizó vacunas a base de ADN administrada por vía IM formada por cinco antígenos, entre ellos P97, P97R1, P36, P46 y NrdF; por otro lado vacunas en base a proteínas por vía SC de los mismos antígenos mencionados, y también evaluó el efecto resultante de la combinación de ambos cócteles. Los resultados arrojan que la vacuna de ADN generó una fuerte respuesta inmune tipo Th1 (tabla 4).

#### **10. P97 en el desarrollo de pruebas serológicas**

Son pocos los antecedentes respecto al uso de la proteína que P97 codifica, utilizada en pruebas diagnósticas, pero con resultados interesantes. Así, Kim *et al.* (2006) utilizaron un fragmento de P97 recombinante de 30 kDa como antígeno de una prueba de ELISA y de otra técnica denominada resonancia de la superficie del plasma, y concluyeron que este fragmento proteico podría utilizarse como antígeno para estudios serológicos. Un año después (Kim *et al.* 2007) realizaron otro estudio en donde se obtiene y compara el desempeño de dos fragmentos de la adhesina para su uso en serodiagnóstico: un fragmento de 50 kDa (incluyendo el sitio de escisión N-terminal) y otro de 30 kDa (incluyendo R1 y R2 en el extremo C-terminal, los cuales son esenciales para la adherencia). De las setenta muestras de suero de cerdos no vacunados, 26 resultaron seropositivas cuando se utilizó el fragmento de 30 kDa; sin embargo, solo 4 muestras fueron seropositivas cuando se utilizó el fragmento de 50 kDa, por ello concluyeron que la proteína recombinante de 30 kDa tendría un mejor desempeño para medir la respuesta de anticuerpos a la vacunación y/o a la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por último, en un trabajo más reciente (Feng *et al.*, 2014) compararon los resultados de un ELISA basado en P97R1 con los de un ELISA comercial y hallaron un 73,6% de coincidencia entre los resultados de ambos ensayos con la ventaja de que el ELISA P97R1 detectó la seroconversión de animales inoculados experimentalmente 2 semanas antes que el test comercial, concluyendo además que el ELISA P97R1 es un adecuado marcador serológico para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* especialmente en estadios tempranos de la infección.

## 11. Conclusiones

El estudio del *loci* P97 a nivel genómico y proteico y su reconocido rol en la patogénesis de la neumonía enzoótica porcina la han convertido en la adhesina más estudiada y mejor caracterizada. A pesar de que se reconoce que no es la única adhesina por la cual el *M. hyopneumoniae* coloniza el epitelio del tracto respiratorio de los cerdos, su papel es muy importante. Dado los abundantes antecedentes de P97 a nivel genético, se recomienda el estudio de este VNTR en conjunto con otros *loci* para poder comparar los resultados obtenidos entre diferentes investigadores, ya que estos han permitido realizar estudios de brote y localización geográfica de la enfermedad. Con lo que respecta a la prevención de la enfermedad, si bien los resultados en vacunas experimentales son prometedores, siguen siendo insuficientes para lograr la protección total contra la enfermedad, en mi opinión considero que hay un déficit en la puesta en práctica de estos productos. A nivel diagnóstico los resultados también son prometedores, aunque escasos, por lo que deberían realizarse estudios más concluyentes en este aspecto.

## 12. Referencias bibliográficas

ARTIUSHIN S, F.C MINION; 1996. *Arbitrarily primed PCR analysis of Mycoplasma hyopneumoniae field isolates demonstrates genetic heterogeneity*. El análisis arbitrario de PCR con cebadores de aislamientos de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae* demuestra heterogeneidad genética Int. J. Syst Bacteriol. 46: 324-328.

BLANCHARD B, M.M VENAM, A. CAVALIER, J.L LANNIC, J. GOURANTON and M. KOBISCH; 1992. *Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with Mycoplasma hyopneumoniae*. Observación con microscopio electrónico del tracto respiratorio de cerdos SPF inoculados con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30:329–341.

BOGEMA D.R, N.E SCOTT, M. PADULA, J.L TACCHI, B.A RAYMOND, C. JENKINS, S.J CORDWELL, F.C MINION, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC; 2011. *The sequence TTKFQE defines the site of Proteolytic cleavage in MHP683, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae*. La secuencia TTKFQE define el sitio de clivaje proteolítico en MHP683, un nuevo glicosaminoglicano y adhesina al cilio de *Mycoplasma hyopneumoniae*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

BOGEMA D.R, A.T DEUTSCHER, L.K WOOLLEY, L.M SEYMOUR, B.B RAYMOND, J.L TACCHI, M.P PADULA, N.E DIXON, F.C MINION, C. JENKINS, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC; 2012. *Characterization of cleavage events in the multifunctional cilium adhesin Mhp684 (P146) reveals a mechanism by which Mycoplasma hyopneumoniae regulates surface topography*. La caracterización de los eventos de clivaje en la adhesina multifuncional P146 (Mhp684) revela un mecanismo por el cual *Mycoplasma hyopneumoniae* regula la topografía de superficie. M.bio 3(2).

BOGUSLAVSKY S, D. MENAKER, I. LYSNYANSKY, T. LIU, S. LEVISOHN, R. ROSENGARTEN, M. GARCIA and D. YOGEV; 2000. *Molecular characterization of the Mycoplasma gallisepticum pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein*. Caracterización molecular del gen pvpA de *Mycoplasma gallisepticum* que codifica una proteína citoadhesina variable. Infect. Immun. 68:3956–3964.

CALUS D, M. BAELE, T. MEYNS, A. DE KRUIF, P. BUTAYE, A. DECOSTERE, F. HAESBROUCK, D. MAES; 2007. *Protein variability among Mycoplasma hyopneumoniae*



*isolates*. Variabilidad de proteínas en aislamientos de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* (120): 284-91.

CHARLEBOIS A, C. MAROIS-CRÉHAN, P. HÉLIE, C.A GAGNON, M. GOTTSCHALK, M. ARCHAMBAULT; 2014. *Genetic diversity of Mycoplasma hyopneumoniae isolates of abattoir pigs*. Diversidad genética de aislamientos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de matadero. *Veterinary Microbiology* 168, 348–356.

CHEN, T., J. SWANSON, J. WILSON, AND R. J. BELLAND; 1995. *Heparin protects Opa Neisseria gonorrhoeae from the bactericidal action of normal human serum*. La heparina protege la *Opa Neisseria gonorrhoeae* de la acción bactericida del suero humano normal. *Infect. Immun.* 63:1790–1795.

CHEN J.R, C.W LIAO, C.N.W MAO, C.N WENG; 2001. *A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of Mycoplasma hyopneumoniae adhesin with Pseudomona exotoxin: in vivo Evaluation of specific IgG response in mice and pigs*. Una quimera recombinante compuesta por la región RR1 de *Mycoplasma hyopneumoniae* adherida con una exotoxina de *Pseudomona*: evaluación *in vivo* de la respuesta específica de IgG en ratones y cerdos. *Vet Microbiol.* 80:347-57.

CHEN A.Y, S.R FRY, J.F FAULKNER, G. DAGGARD, T.K.S MUKKUR, 2006. *Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae as a mucosal Vaccine in mice*. Evaluación de la inmunogenicidad de la adhesina P97R1 de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una vacuna mucosal en ratones. *Journal of Medical Microbiology* 55: 923–929.

CHEN A.Y, S.R FRY, G. E DAGGARD, T.K.S MAKKUR; 2008. *Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of Mycoplasma hyopneumoniae delivered as a cocktail DNA and/or recombinant Protein vaccines in mice*. Evaluación de la respuesta inmune a los potenciales antígenos protectores recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* administrados como cóctel de ADN y / o vacunas de proteína recombinante en ratones. *El Sevier. Vaccine* 26:4372-4378.

CONCEIÇÃO F.R, A.N MOREIRA, O.A DELLAGOSTIN; 2006. *A recombinant chimera composed of R1 repeat region of Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin with Escherichia Coli heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice*. Una quimera

recombinante compuesta por la región repetida R1 de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* y por la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia Coli* provoca respuesta inmune en ratones. El Sevier 24:5734-5743.

DALLO S.F, A. CHAVOYA and J.B BASEMAN; 1990. *Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesion-related protein of Mycoplasma pneumoniae*. Caracterización del gen de una proteína de adhesión de 30 kilodaltons de *Mycoplasma pneumoniae*. Infect. Immun. 58:4163–4165.

DEBEY M.C and R.F ROSS; 1994. *Ciliostasis and loss of cilia induced by Mycoplasma hyopneumoniae in porcine tracheal organ cultures*. Ciliostasis y pérdida de los cilios inducido por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cultivos traqueales de porcinos. Infect. Immun. 62:5312–5318.

DE CASTRO L.A, T. RODRIGUES PEDROSO, S.S KUCHIISHI; 2006. *Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in Mycoplasma hyopneumoniae strains*. Número variable de repeticiones en tándem de aminoácidos en los productos CDS relacionados con la adherencia en las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 10; 116 (4): 258-69.

DEUTSCHER A.T, C. JENKINS, F.C MINION, L.M SEYMOUR, M.P PADULA, N.E DIXON, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC; 2010. *Repeat regions R1 and R2 in the P97 paralogue Mhp271 of Mycoplasma hyopneumoniae bind heparin, fibronectin and porcine cilia*. Las regiones repetidas R1 y R2 de P97 parálogas a Mhp271 de *Mycoplasma hyopneumoniae* se unen a heparina, fibronectina y cilios porcinos. Mol Microbiol. 78, 444-458.

DEUTSCHER A.T; 2012. *Mycoplasma hyopneumoniae Surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs*. Las proteínas de superficie Mhp385 y Mhp384 de *Mycoplasma hyopneumoniae* se unen a los cilios del huésped y a los glicosaminoglicanos y se procesan endoproteolíticamente mediante proteasas que reconocen diferentes motivos de escisión. J. proteome Res 11, 1924-1936.

DOS SANTOS L.F, S. SREEVATSAN, M. TORREMORELL, M.A MOREIRA, M. SIBILLA, M. PIETERS; 2015. *Genotype distribution of Mycoplasma hyopneumoniae in swine herds from different geographical regions*. Distribución de genotipos de *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* en rebaños de cerdos de diferentes regiones geográficas. Vet. Microbiol. 175(2-4):374-81. (a)

DOS SANTOS L.F, J. ALVAREZ, A. PEREZ, M.A.S MOREIRA, M. PIETERS; 2015. *Association of number of tandem repeats in two important adhesins in Mycoplasma hyopneumoniae*. Asociación entre el número de repeticiones en tandem de dos importantes adhesinas de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V.67, n.5, p.1461-1464. (b)

DUBREUIL J. D, G.D GIUDICE, AND R. RAPPUOLI; 2002. *Helicobacter pylori interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process*. Interacciones entre *Helicobacter pylori* con el suero del huésped y las proteínas de la matriz extracelular: rol potencial en el proceso infeccioso. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66:617–629.

DUENSING T. D, J.S WING, AND J.P VAN PUTTEN; 1999. *Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis*. Reclutamiento de proteínas de huéspedes mamíferos dirigido a polisacáridos sulfatados: una nueva estrategia en la patogénesis microbiana. Infect. Immun. 67:4463–4468.

FALLAUX F.J, A. BOUT, I. VAN DER VELDE, D.J VAN DEN WOLLENBERG, K.M HEHIR, J. KEEGAN; 1998. *New helper cells and matched early region 1-deleted Adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses*. Las nuevas células auxiliares y los vectores de *Adenovirus* marcados tempranamente en la primera región previenen la generación de *Adenovirus* competentes para la replicación. Hum Gene Ther. 9:1909-17.

FENG Z.X, Y. BAY, J.T JAO, G.T PHARR, X.F WAN, S.B XIAO, L.Z CHI, Y. GAN, H.Y WANG, Y.N WEI, M.J LIU, Q.Y XIONG, F.F BAI, B. LI, X.S WU, G.Q SHAO; 2014. *Use of serological and mucosal immune responses to Mycoplasma hyopneumoniae antigens P97R1, P46 and P36 in the diagnosis of infection*. Uso de respuesta immune mucosa y serológica de los antígenos P97R1, P46 y P36 de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el Diagnóstico de la infección. Vet. J: 128-33.

FREY J, A. HALDIMANN, J. NICOLET; 1992. *Chromosomal heterogeneity of various Mycoplasma hyopneumoniae field strains*. Heterogeneidad de cromosomas de varios aislamientos de cepas de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Int J Syst Bacteriol. 42:275–280.

GRAHAM F.L; 1987. *Growth of 293 cells in suspension culture*. Crecimiento de 293 células en cultivo de suspensión. J Gen Virol. 68:937-40.

HAYFLICK L, RAZIN S; 2010. *Highlights of mycoplasma research an historical perspective*. Aspectos destacados de la investigación sobre micoplasmas: una perspectiva histórica. Biologicals 38(2):183-90.

HONG Y., M. GARCÍA., S. LEVISOHN, P. SAVELKOUL, V. LEITING, I. LYSNYANSKY, D.H LEY, S.H KLEVEN; 2005. *Differentiation of Mycoplasma gallisepticum strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods*. Diferenciación de las cepas de *Mycoplasma gallisepticum* usando el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados y otros métodos de tipificación basados en ADN. Avian Dis. 1:43-9.

HSU T, A. SERGEY, and F.C MINION; 1997. *Cloning and Functional Analysis of the P97 Swine Cilium Adhesin Gene of Mycoplasma hyopneumoniae*. Clonación y análisis funcional del gen de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* en los cilios del cerdo. Infect. Immunol. 1317–1323.

HSU T, F.C MINION; 1998. *Identification of the cilium binding epitope of the Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin*. La identificación del epítipo de unión de la adhesina p97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* a los cilios. Infect. Immunol. 66 (10): 4762–4766.

JENKINS C, J.L WILTON, F.C MINION, L. FALCONER, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC; 2006. *Two domains within the Mycoplasma hyopneumoniae cilium adhesin bind heparin*. Dos dominios dentro de la adhesina de *Mycoplasma hyopneumoniae* unida a la heparina. Infect Immun. 481-7.

KIM T.J, H.S CHO, N.Y PARK, I. LEE; 2006. *Serodiagnostic Comparison between Two Methods, ELISA and Surface Plasmon Resonance for the Detection of Antibody Titres of Mycoplasma hyopneumoniae*. Comparación serodiagnóstica entre dos métodos, ELISA y Resonancia de Plasmón de superficie para la detección de títulos de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Vet. Med. B, 87–90.

KIM T.J, JANG E.J; 2007. *In vitro expression of the 50-kDa and 30-kDa fragments of the P97 adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae in Escherichia Coli and their use for serodiagnosis*. Expresión *in vitro* de dos fragmentos de 50-kDa y 30-kDa de la adhesina P97 de *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* en *Escherichia Coli* y su uso para serodiagnóstico. The Canadian Journal of Veterinary Research 71:278-282.

KOKOTOVIC B, N.F FRIIS, J.S JENSEN, P. AHRENS; 1999. *Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of Mycoplasma species*. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados de huellas dactilares de especies de *Mycoplasma*. J Clin Microbiol. 37: 3300-3307.

KUHNERT P, G. OVERESCH, L. BELLOY; 2011. *Genotyping of Mycoplasma hyopneumoniae in wild boar lung samples*. Genotipificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* en muestras de pulmón de jabalí. Veterinary Microbiology 152, 191–195.

KUHNERT P, G. OVERESCH; 2014. *Molecular epidemiology of Mycoplasma hyopneumoniae from outbreaks of enzootic pneumonia in domestic pig and the role of wild boar*. Epidemiología molecular de *Mycoplasma hyopneumoniae* en brotes de Neumonía Enzoótica en cerdos domésticos y el papel del jabalí. Vet Microbiol. 1-2:261- 6.

LEE S.H, S. LEE, C. CHAE, D.Y RYU; 2014. *A recombinant chimera comprising the R1 and R2 repeat regions of Mycoplasma hyopneumoniae P97 and the N-terminal region of A. pleuropneumoniae ApxIII elicits immune responses*. Una quimera recombinante comprendiendo la región R1 y R2 de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae* y la región N-terminal de *A. pleuropneumoniae ApxIII* provoca respuesta inmune. BMC Veterinary Research 1746-6178.

LI Y.Z, Y.P HO, S.T CHEN, T.W CHIOU, Z.S LI, D. SHIUAN; 2009. *Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of Mycoplasma hyopneumoniae*. Análisis comparativo proteómico de la cepa patógena 232 y la cepa no virulenta J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Biochemistry (Mosc.) (74): 215-220.

LIN B.C; 2001. *Interspecies differentiation of Mycoplasma hyopenumoniae field strains isolated in the United States*. Diferenciación interespecies de aislamientos de cepas de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Estados Unidos. American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, Nashville, Tennessee. Pp. 225-235.

LIU W, Z. FENG, L. FANG, Z. ZHOU, Q. LI, S. LI, R. LUO, L. WANG, H. CHEN, G. SHAO, S. XIAO; 2011. *Complete genome sequence of Mycoplasma hyopneumoniae strain 168*.

Secuencia genómica completa de la cepa 168 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Bacteriol. 193:1016-1017.

MAES D, H. DELUYKER, M. VERDONCK, F. CASTRYCK, C. MIRY, A. LEIN, B. VRIJENS, A. DE KRUIF; 1998. *The effect of vaccination against Mycoplasma hyopneumoniae in pig herds with a continuous production system*. El efecto de la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de grande con un sistema de producción continuo. Central Veterinary med 45(8):495-505.

MAES D, H. DELUYKER, M. VERDONCK, F. CASTRYCK, C. MIRY, B. VRIJENS, W. VERBEKE, J. VIAENE, A. DE KRUIF; 1999. *Effect of vaccination against Mycoplasma hyopneumoniae in pig herds with an all-in/all-out production system*. Efecto de la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de granja en sistemas de producción “todo adentro-todo afuera”. Vaccine 17(9-10):1024-34.

MAES D, J. SEGALÉS, T. MEYNS, M. SIBILA, M. PIETERS, F. HAESEBROUCK; 2008. *Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs*. Control de las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Vet. Microbiol. 126: 297-309.

MARCHIORO S.B, S. SIMIONATTO, V. GALLI, F.R CONCEIÇÃO, C.B BRUM, A. FISCH, C.K GOMES, O.A DELLAGOSTIN; 2012. *Production and characterization of recombinant transmembrane proteins from Mycoplasma hyopneumoniae*. Producción y caracterización de proteínas transmembrana recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol. 155(1):44-52.

MARCHIORO S.B, R. DEL POZO SACRISTÁN, A. MICHIELS, F. HAESEBROUCK, F.R CONCEIÇÃO, O.A DELLAGOSTIN, D. MAES; 2014. *Immune responses of a chimaeric Protein Vaccine containing Mycoplasma hyopneumoniae antigens and LTB against experimental M. hyopneumoniae infection in pigs*. Respuesta inmune de una vacuna de proteína quimérica conteniendo como antígenos *Mycoplasma hyopneumoniae* y *LTB* contra la infección experimental en cerdos por *M. hyopneumoniae*. El Sevier, Vaccine 32:4689-4694.

MARGNI R.A y colaboradores; 1996. Inmunología e Inmunoquímica. Quinta edición. Ed. Médica Panamericana, BA, Argentina. 495p.

MARINARO M, H.F STAATS, T. HIROI, R.J JACKSON, M. COSTE, P.N BOYAKA; 1995. *Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4*. El efecto adyuvante en mucosa de la toxina del cólera en los ratones resulta de la inducción de células T auxiliar 2 (Th2) e IL-4. *J Immunol.* 155:4621-32.

MATIC J.N, T.D TERRY, D. VAN BOCKEL, T. MADDOCKS, D. TINWORTH, M.P JENNINGS, S.P DJORDJEVIC, M.J WALKER; 2009. *Development of non-antibiotic-resistant, chromosomally based, constitutive and inducible expression systems for aroA-attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium*. Desarrollo de sistemas de expresión constitutivos e inducibles no resistentes a los antibióticos, basados en cromosomas para la cepa atenuada aroA de *Salmonella* entérica, serovar *typhimurium*. *Infect Immun.* 77(5):1817-26.

MAYOR D, J. JORES, B.M KORCZAK, P. KUHNERT; 2008. *Multilocus sequence typing (MLST) of Mycoplasma hyopneumoniae: a diverse pathogen with limited clonality*. Multilocus sequence typing (MLST) de *Mycoplasma hyopneumoniae*: Un patógeno diverso con limitada clonalidad. *Vet Microbiol.* 1-2:63- 72.

MENOZZI F.D, K. PETHE, P. BIFANI, F. SONCIN, M.J BRENNAN, C. LOCHT; 2002. *Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans*. Aumento de la virulencia bacteriana mediante la explotación de glicosaminoglicanos del huésped. *Mol Microbiol.* 43, 1379-1386.

MEYNS T, J. DEWULF, A. DE KRUIF, D. CALUS, F. HAESEBROUCK, D. MAES; 2006. *Comparison of transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in vaccinated and non-vaccinated populations*. Comparación de la transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en poblaciones vacunadas y no vacunadas. *Vaccine.* 24(49-50):7081-6.

MEYNS T, D. MAES, D. CALUS, S. RIBBENS, J. DEWULF, K. CHIERS; 2007. *Interactions of highly and low virulent Mycoplasma hyopneumoniae isolates with the respiratory tract of pigs*. Interacciones de aislamientos de *Mycoplasma hyopneumoniae* de alta y baja virulencia con el tracto respiratorio de los cerdos. *Vet. Microbiol.* 120:87-95.

MINION F.C; 1998. *Mycoplasma gene expression in Escherichia Coli*. Expresión de genes de *Mycoplasma* en *Escherichia Coli*. *Methods Mol Biol.* 104:259-65.

MINION F.C, C. ADAMS, T. HSU; 2000. *R1 region of P97 mediates adherence of Mycoplasma hyopneumoniae to swine cilia*. La región R1 de p97 interviene en la adherencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* a los cilios del cerdo. *Infect Immunol.* 68 (5), 3056–3060.

MINION F.C, E.J LEFKOWITZ, M.L MADSEN, B.J CLEARY, S.M SWARTZELL, G.G MAHAIRAS; 2004. *The genome sequence of Mycoplasma hyopneumoniae strain 232 the agent of swine mycoplasmosis*. La secuencia del genoma de la cepa 232 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el agente de la micoplasmosis porcina. *J. Bacteriol.* 186 (21), 7123–7133.

NATHUES H, E. GROSSE BEILAGE, L. KREIENBROCK, R. ROSENGARTEN, J. SPERGSEER; 2011. *RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of Mycoplasma hyopneumoniae isolates from pigs housed in a region with high pig density*. Los análisis RAPD y VNTR demuestran la heterogeneidad genotípica de aislamientos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos alojados en una región con alta densidad de animales. *Vet. Microbiol.* 152(3-4):338-45.

OGAWA Y, E. OISHI, Y. MUNETA, A. SANO, H. HIKONO, T. SHIBAHARA, Y. YAGI, Y. SHIMOJI; 2009. *Oral vaccination against Mycoplasmal pneumonia of swine using a live Erisipelothrix rhusopathiae Vaccine strain as a vector*. Vacunación oral contra neumonía micoplasmática en cerdos usando como vector una cepa viva de *Erisipelothrix rhusopathiae*. *El Sevier, Vaccine* 27. 4543-4550.

OKAMBA F.R, E. MOREAU, K. CHEIKH SAAD BOUH, C.A GAGNON, B. MASSIE, M. ARELLA, 2007. *Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the Mycoplasma hyopneumoniae P97 adhesin*. Respuesta inmune inducida por replicación defectiva de *Adenovirus* expresando la porción C-terminal de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol.* 14 (6):767-74.

OKAMBA F.R, M. ARELLA, N. MUSIC, J.J JIA, M. GOTTSCHALK, C.A GAGNON; 2010. *Potencial use of a recombinant replication-defective adenovirus vector carrying the C-terminal portion of the P97 adhesin Protein as a Vaccine against Mycoplasma hyopneumoniae in swine*. Uso potencial de un vector recombinante de replicación defectiva de *Adenovirus* portador de la porción C-terminal de la adhesina P97 como vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. *El Sevier. Vaccine* 28:4802-4809.



OLIVIEIRA S, M. TORREMORELL, C. BEEN; 2008. *Mycoplasma hyopneumoniae strain variation being observed in the field*. Observación de una variación de una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* en aislamientos de campo. Allen. D. Lemman Swine Conference. University of Minnesota. St Paul. Minnesota.

PANTOJA L.G, K. PETTIT, L.F DOS SANTOS, R. TUBBS, M. PIETERS; 2016. *Mycoplasma hyopneumoniae genetic variability within a swine operation*. Variabilidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una operación porcina. J vet diagnostic Invest. 28(2): 175-9.

PAPP Z, L.A BABIUK, M.E BACA-ESTRADA; 1998. *Induction of immunity in the respiratory tract and protection from bovine herpesvirus Type 1 infection by different routes of immunization with recombinant adenovirus*. Inducción de inmunidad en el tracto respiratorio y protección contra la infección por *Herpesvirus Bovino tipo 1* por diferentes vías de inmunización con *Adenovirus* recombinante. Viral Immunol. 11(2):79-91.

PINTO P.M, G. CHEMALE, L.A DE CASTRO, A.P COSTA, J.D KICH, M.H VAINSTEIN, A. ZAHA, H.B FERREIRA; 2007. *Proteomic survey of the pathogenic Mycoplasma hyopneumoniae strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins*. Encuesta proteómica de la cepa patogénica 7448 de *Mycoplasma hyopneumoniae* e identificación de nuevas modificaciones post-traduccionales y proteínas antigénicas. Vet Microbiol. 121(1-2):83-93.

PINTO P.M, C.S KLEIN, S. ZAHA, H.B FERREIRA; 2009. *Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen Mycoplasma hyopneumoniae*. Análisis proteómico comparativo de cepas patogénicas y no patogénicas del patógeno del cerdo *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proteome Sci. 7: e45.

RAPPUOLI R; 2000. *Reverse vaccinology*. Invertir la vacunología. Curr Opin Microbiol. 3(5):445-50. Review.

RAWADI G, O. DUSSURGET; 1998. *Genotypic Methods for diagnosis of Mycoplasma infections in humans, animals, plants and cell cultures*. Métodos genotípicos para diagnóstico directo de infecciones mycoplasmiales en humanos, animales, plantas y cultivos celulares. Biotechnol Genet Eng Rev 15:51-78.

RAZIN S, L. HAYFLICK; 2010. *Highlights of mycoplasma research: an historical perspective*. Aspectos sobresalientes de la investigación sobre el micoplasma: una perspectiva histórica. *Biologicals*. 38: 183-90.

REBAQUE F, P. CAMACHO, J. PARADA, P. LUCCHESI, A. AMBROGI, P. TAMIOZZO; 2017. *Persistence of the same type of Mycoplasma hyopneumoniae in a closed herd for at least two years*. Persistencia del mismo tipo genético de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja cerrada por al menos dos años. *Revista Argen. Microbiol. RAM*-210.

ROQUES E, A. GIRARD, C. A GAGNON, D. ARCHAMBAULT; 2013. *Antibody responses induced in mice immunized with recombinant adenovectors expressing chimeric proteins of various porcine pathogens*. Respuestas de anticuerpos inducidas en ratones inmunizados con adenovectores recombinantes que expresan proteínas quiméricas de diversos patógenos porcinos. *El Sevier. Vaccine* 31:2698-2704.

ROSENTHAL K.L, K.F.T COPELAND, W.S GALLICHAN; 1996. *Recombinant Adenoviruses as vectors for mucosal immunity*. Adenovirus recombinantes como vectores para inmunidad en la mucosa. San Diego: *Mucosal vaccines*; p.147-58.

SEYMOUR L.M; 2010. *A processed multidomain Mycoplasma hyopneumoniae adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia*. Una adhesina multidominio de *Mycoplasma hyopneumoniae* procesada se une a fibronectina, plasminógeno y a los cilios respiratorios del cerdo. *J. Biol. Chem.* 285, 33 971-33 978.

SEYMOUR L.M, L. FALCONER, A.T DEUTSCHER, F.C MINION, M.P PADULA, N.E DIXON, S.P DJORDJEVIC, M.J WALKER; 2011. *Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of Mycoplasma hyopneumoniae*. Mhp107 es miembro de la familia de adhesinas multifuncionales de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Biol. Chem* 286, 10 097-10 104.

SEYMOUR L.M, C. JENKINS, A.T DEUTSCHER, B.A RAYMOND, M.P PADULA, J.L TACCHI, D.R BOGEMA, G.J EAMENS, L.K WOOLLEY, N.E DIXON, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC; 2012. *Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin(ogen) to the Mycoplasma hyopneumoniae cell Surface*. Mhp182 (P102) se une a la fibronectina y contribuye al reclutamiento de plasmina y plasminógeno a la superficie celular de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Cellular Microbiology* 14 (1), 81-94.

SHIMOJI Y, E. OISHI, T. KITAJIMA, Y. MUNETA, S. SHIMIZU, Y. MORI; 2002. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a Live Vaccine Vehicle for Heterologous Protein Expression and Intranasal Immunization of Pigs. Cepa YS-1 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* como vehículo en una vacuna viva para la expresión de la proteína heteróloga y la inmunización intranasal en cerdos. *Infection and immunity* p. 226–232.

SHIMOJI Y, E. OISHI, Y. MUNETA, H. NOSAKA, Y. MORI; 2003. *Vaccine efficacy of the attenuated Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. Eficacia de la vacuna con la cepa atenuada YS-19 de *Erysipelothrix rhusiopathiae* expresando la adhesina P97 recombinante contra la Neumonía micoplasmal en cerdos. *El Sevier* 532–537.

SIBILA M, M. NOFRARIAS, S. LOPEZ-SORIA; 2007. *Exploratory field study on Mycoplasma hyopneumoniae* infection in suckling pigs. Estudio de campo exploratorio sobre la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos lactantes. *Veterinary Microbiology* (121): 352– 356.

SIMIONATTO S, S.B MARCHIORO, V. GALLI, T.D LUERCE, D.D HARTWIG, A.N MOREIRA, O.A DELLAGOSTIN; 2009. *Efficient site-directed mutagenesis using an overlap extension-PCR method for expressing Mycoplasma hyopneumoniae* genes in *Escherichia coli*. Eficiencia de la mutagénesis dirigida a un sitio usando un método de extensión y superposición de PCR para la expresión de genes de *Mycoplasma hyopneumoniae* en *Escherichia Coli*. *J. Microbiol Methods* 79(1):101-5.

SIMIONATTO S, S.B MARCHIORO, V. GALLI, D.D HARTWIG, R.M CARLESSI, F.M MUNARI, J.P LAURINO, F.R CONCEIÇÃO, O.A DELLAGOSTIN; 2010. *Cloning and purification of recombinant proteins of Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. Clonación y purificación de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae* expresadas en *Escherichia Coli*. *Protein Expr. Purif.* 69(2):132-6.

SIMIONATTO S, S.B MARCHIORO, V. GALLI, C.B BRUM, C.S KLEIN, R. REBELATTO, E.F SILVA, S. BORSUK, F.R CONCEIÇÃO, O.A DELLAGOSTIN; 2012. *Immunological characterization of Mycoplasma hyopneumoniae* recombinant proteins. Caracterización inmunológica de proteínas recombinantes de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35(2):209-16.

SOSA C; 2017. Diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* y su relación con la severidad de las lesiones pulmonares compatibles con Neumonía Enzoótica Porcina. Tesis para optar al grado de Licenciada en Biología. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Marzo 2017.

STAKENBORG T, J. VICCA, P. BUTAYE; 2005. *The diversity of Mycoplasma hyopneumoniae within and between herds using pulsed field gel electrophoresis*. La diversidad de *Mycoplasma hyopneumoniae* en y entre los rebaños utilizando electroforesis en gel de campo pulsado. *Vet. Microbiol.* 109 (1-2): 29-36.

STAKENBORG T, J. VICCA, D. MAES; 2006. *Comparison of molecular techniques for the typing of Mycoplasma hyopneumoniae isolates J*. Comparación de técnicas moleculares para la tipificación de aislamientos de la cepa J de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiol. Methods.* 66 (2): 263-275.

THACKER E.I, B.J THACKER, T.B BOETTCHER, H. JAYAPPA; 1998. *Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four comercial Mycoplasma hyopneumoniae bacterins*. Comparación de anticuerpos producidos, estimulación de linfocitos y protección inducida por cuatro bacterinas comerciales de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Swine Health Prod* 6: 107-12.

THACKER E, F.C MINION C; 2012. *Mycoplasmal diseases*. Enfermedades micoplasmales. *Diseases of Swine*, 9th ed. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK; 701-717.

TAJIMA M, T. YAGIHASHI; 1982. *Interaction of Mycoplasma hyopneumoniae with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy*. Interacción de *Mycoplasma hyopneumoniae* con el epitelio respiratorio porcino observado por microscopía electrónica. *Infect. Immun.* (37): 1162-1169.

TAMIOZZO P, P.M.A LUCCHESI, A. AMBROGI; 2011. Diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas de Argentina. *In-Vet* 13, 27–35.

TAMIOZZO P, R. ZAMORA, P.M.A LUCCHESI, A. ESTRANGUET, J. PARADA, A. CARRANZA, P. CAMACHO, A. AMBROGI; 2015. *MLVA typing of Mycoplasma hyopneumoniae bacterins and field strains*. Tipificación mediante MLVA de bacterias y cepas de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec Open*.

VASCONCELOS A.T, H.B FERREIRA, C.V BIZARRO, S.L BONATTO, M.O CARVALHO, P.M PINTO, D.F ALMEIDA, L.G ALMEIDA, R. ALMEIDA, L. ALVES-FILHO; 2005. *Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of Mycoplasma hyopneumoniae and a strain of Mycoplasma synoviae*. Cerdos y aves patógenos: las secuencias del genoma completo de dos cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* y una cepa de *Mycoplasma synoviae*. Bacteriol. 187 (16), 5568–5577.

VICCA J, T. STAKENBORG, D. MAES, P. BUTAYE, J. PEETERS, A. DE KRUIF, F. HAESEBROUCK; 2003. *Evaluation of virulence of Mycoplasma hyopneumoniae field isolates*. Evaluación de la virulencia en aislamientos de campo de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol. (97): 177-190.

VILLARREAL I, D. MAES, T. MEYNS *et al.* 2009. *Infection with a low virulent Mycoplasma hyopneumoniae isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent M. hyopneumoniae isolate*. La infección con una cepa de *M. hyopneumoniae* de baja virulencia no protege a los cerdos de infecciones con cepas de alta virulencia. Vacc. 27 (12): 1875-1879.

VRANCKX K, D. MAES, D. CALUS, I. VILLARREAL, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK; 2011. *Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of Mycoplasma hyopneumoniae strains without cultivation*. El análisis de repetición en tandem de un número variable de múltiples locus es una herramienta adecuada para la diferenciación de cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* sin cultivar. Journal of Clinical Microbiology 49, 2020–2023.

VRANCKX K, D. MAES, P. SACRISTÁN RDEL, F. PASMANS, F. HAESEBROUCK; 2012. *A longitudinal study of the diversity and dynamics of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pig herds*. Un estudio longitudinal de la diversidad y dinámica de las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de granja. Vet Microbiol; 3-4:315-21.

WADSTROM T, AND A. LJUNGH; 1999. *Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity*. Proteínas microbianas de unión a glicosaminoglicanos en la adhesión e invasión tisular: eventos clave en la patogenicidad microbiana. J. Med. Microbiol. 48:223–233.

WILTON J.L, A.L SCARMAN, M. WALKER, S.P DJODJVEVIC; 1998. *Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of Mycoplasma hyopneumoniae*. Variabilidad de la región repetitiva reiterada en el gen de la adhesina al cilio de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Microbiology 144:1931-43.

WILTON J *et al*; 2009. *Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding Protein of Mycoplasma hyopneumoniae*. Mhp493 (P216) es una proteína procesada proteolíticamente de unión a la heparina y a los cilios. Mol. Microbiol 71, 566-582.

WOESE C.R, J. MANILOFF, L.B ZABLEN; 1980. *Phylogenetic analysis of the mycoplasmas*. Análisis filogenético de Micoplasmas. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. 2:494-498.

WOOLLEY L.K, S.A FELL, J.R GONSALVES, B.B RAYMOND, D. COLLINS, T.A KUIT, M.J WALKER, S.P DJORDJEVIC, G.J EAMENS, C. JENKINS; 2014. *Evaluation of recombinant Mycoplasma hyopneumoniae P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs*. Evaluación de parálogos recombinantes P97/P102 de *Mycoplasma hyopneumoniae* formulados con adyuvantes seleccionados como vacunas contra la neumonía micoplasmal en cerdos. Vaccine. 32(34):4333-41.

ZHANG Q, T.F YOUNG, R.F ROSS; 1994. *Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for Mycoplasma hyopneumoniae*. Ensayo de adherencia de placas de microtitulación y análogos de receptores para *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect Immun 62, 1616-1622.

ZHANG Q, T.F YOUNG and R.F ROSS; 1995. *Identification and characterization of a Mycoplasma hyopneumoniae adhesin*. Identificación y caracterización de la adhesina de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Infect. Immun. 63:1013– 1019.

ZHAGN Q, K.S WISE; 1996. *Molecular basis of size and antigenic variation of a Mycoplasma hominis adhesin encoded by divergent vaa genes*. Bases moleculares de tamaño y variación antigénica de una adhesina *Mycoplasma hominis* codificada por genes divergentes. Infect Immun. 64(7):2737-44.