

Diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas de Argentina

Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms from Argentina

Tamiozzo, P.J.^{1,2}; Lucchesi, P.M.A.^{2,3}; Ambrogi A.¹

¹Departamento Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Ruta 36 Km 601. Río Cuarto. Prov. de Córdoba. República Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). República Argentina. ³Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología-Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. Paraje Arroyo Seco s/n, Tandil, Prov. de Buenos Aires. República Argentina.

RESUMEN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una de las enfermedades respiratorias de mayor impacto en la industria porcina. Conocer su diversidad genética permite el desarrollo de estudios epidemiológicos y de patogénesis para desarrollar estrategias de control más efectivas. En este trabajo se analizaron 39 muestras de ADN de hisopado nasal y lavado bronquial de cerdos de distintas edades, provenientes de siete orígenes diferentes, que habían sido positivas a la detección de *M. hyopneumoniae* por nPCR. Para tipificar este patógeno en las muestras provenientes de hisopados nasales, se diseñó una nPCR que amplifica en el gen *p146* una región que codifica serinas repetidas en tándem. Para las muestras de lavados bronquiales, se amplificó esa región mediante PCR, así como también otros VNTRs (*variable number tandem repeats*), localizados en otros genes. Las metodologías empleadas, que permiten el análisis a partir de muestras clínicas sin el aislamiento previo del patógeno, determinaron que existe diversidad genética entre las cepas de *M. hyopneumoniae* que se encuentran en nuestro país. Se detectaron diferentes genotipos de este patógeno tanto entre granjas como entre animales de un mismo establecimiento, así como genotipos compartidos entre diferentes granjas o animales.

Palabras clave: (*Mycoplasma hyopneumoniae*), (VNTR), (gen *p146*), (tipificación)

Correspondencia e-mail: Pablo Tamiozzo ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

Recibido: 06-06-2011

Aceptado: 25-08-2011

SUMMARY

Mycoplasma hyopneumoniae is the etiological agent of porcine enzootic pneumonia (EP), one of the respiratory diseases with higher impact on the swine industry. Knowledge of *M. hyopneumoniae* genetic diversity is useful for epidemiological and pathogenesis studies to develop effective control strategies. In this work, 39 DNA samples from nasal swabs and bronchial lavages, that previously rendered positive for this pathogen by nPCR, were analyzed. They corresponded to pigs of different ages, belonging to seven farms. For *M. hyopneumoniae* typing using DNA from nasal swabs, a nPCR assay was developed to amplify the region coding for the serine tandem repeat domain of *p146* gene. For samples from bronchial lavages, the same region was amplified by PCR, along with other VNTRs (variable number tandem repeats) from other loci. With this approach, that proved to be useful for the direct analysis of clinical samples without prior isolation of the pathogen, the genetic diversity of *M. hyopneumoniae* strains circulating in our country could be evidenced. Different genotypes were found among farms and also among animals from a same farm, but there were also animals (from a different or a same farm) that harbored a same *M. hyopneumoniae* genotype.

Key words: (*Mycoplasma hyopneumoniae*), (VNTR), (*p146* gene), (typing).

INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de la neumonía enzoótica porcina (NEP), una de las enfermedades respiratorias de mayor impacto en la industria porcina²⁰. El conocimiento de la diversidad genética de *M. hyopneumoniae*, así como el de otras bacterias, es importante para estudiar su transmisión, establecer asociaciones con la patogenicidad de diferentes cepas, desarrollar vacunas y otras estrategias para el control de la enfermedad. Varios estudios han demostrado su diversidad genética utilizando distintas técnicas^{15, 16} y han podido reconocerse cepas de *M. hyopneumoniae* de alta y baja virulencia²².

Básicamente, las técnicas de diferenciación genotípicas pueden dividirse en aquellas no especie-específicas que necesitan el aislamiento del microorganismo, y aquellas especie-específicas para las cuales el aislamiento no es indispensable. Dada la dificultad en el cultivo y aislamiento de *M. hyopneumoniae* debido a sus exigencias nutricionales y lento crecimiento, estas últimas resultan de mucha utilidad.

Utilizando una de estas metodologías, el análisis de regiones repetidas en tándem (VNTRs, *variable number tandem repeats*), de Castro *et al.* 2006⁵ estudiaron 22 regiones del genoma en 5 cepas de *M. hyopneumoniae*. A

partir de ese análisis, estos autores señalan las regiones más polimórficas para el desarrollo de ensayos de tipificación, para los cuales proponen la amplificación de regiones del gen codificante de la adhesina *P146* (regiones repetitivas: R1 y R3) y de dos genes de proteínas hipotéticas (*H4* y *H5*). Dado que los VNTRs estudiados por estos autores están localizados dentro de secuencias codificantes y en fase con el marco de lectura, codifican para un número variable de repeticiones de aminoácidos⁵. Por otro lado, Mayor *et al.* 2007¹¹ propusieron otra metodología de tipificación de este patógeno, basada en la determinación del número de serinas repetidas codificadas en la región R3 del gen *p146* y en el análisis de la secuencia flanqueante. En base a este método, y analizando directamente muestras clínicas, se ha demostrado una gran variabilidad entre cepas de *M. hyopneumoniae* de diferentes países europeos^{11, 14} y de Estados Unidos de América (EUA)¹² en donde también se la ha empleado para estudios de brote²¹ y del transporte aéreo de una cepa de *M. hyopneumoniae* a largas distancias⁶.

Debido a la importancia de conocer las diferencias genéticas entre cepas de *M. hyopneumoniae* circulantes en nuestro país, para la mejor comprensión de su epidemiología y el desarrollo de estrategias de control más eficientes, el objetivo del presente trabajo fue

investigar la variabilidad de algunas regiones VNTR de *M. hyopneumoniae* directamente a partir de muestras clínicas provenientes de distintos establecimientos de nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con ADN de muestras clínicas (hisopados nasales y lavados bronquiales) de cerdos de diferentes establecimientos de distintas provincias de Argentina y de animales provenientes del extranjero, que fueron parte de estudios previos realizados por el Grupo de Salud Porcina (Depto. de Patología Animal-Fac. Agronomía y Veterinaria-Universidad Nacional de Río Cuarto)^{17,18}. El ADN había sido extraído utilizando el kit DNAzol (InvitrogenTM, CA, EUA) y estaba conservado a -20°C. Para este estudio se seleccionaron todas las muestras que habían sido positivas a una PCR anidada que detecta *M. hyopneumoniae*, descrita por Calsamiglia *et al.* 1999³. Debido a la limitada cantidad de material genético de algunas muestras, en varios casos no fue posible analizar todos los loci. En la Tabla 1 se detallan las distintas muestras analizadas, agrupadas por establecimiento de origen.

Procesamiento de las muestras: Dado que, por pruebas realizadas anteriormente en nuestro laboratorio, el material genético obtenido a partir de muestras de hisopado nasal no pudo amplificarse mediante PCRs estándar previamente descritas^{5, 11}, a diferencia del material de lavado bronquial (probablemente debido a la sensibilidad de las reacciones), el procesamiento de los dos tipos de muestra fue distinto.

Hisopados nasales: Para aumentar la sensibilidad de la PCR desarrollada por Mayor *et al.* 2007¹¹ que amplifica, dentro del gen *p146*, la región codificante de serinas repetidas en tándem (*p146R3*), las muestras de ADN provenientes de hisopados nasales fueron amplificadas por una PCR anidada para la cual se diseñaron los cebadores externos: MhT146F (5'-GCTGGGATAAGCGATACCAA-3') y MhT146R (5'-GCTTTCCATGTTTGCCATTT-3')¹⁸. La primera ronda de amplificación se

realizó en 30 µL de volumen final, con 5 µL de ADN templado, 200 µM de cada dNTP, 0,2 µM de cada cebador, 3mM de MgCl₂, buffer de PCR 1X (20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl) y 2,5 U Taq polimerasa (InvitrogenTM, Brasil), bajo las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min seguida por 35 ciclos de 94°C por 2 min (desnaturalización), 56°C por 2 min (*annealing*) y 72°C por 2 min (extensión), con una extensión final de 72°C por 10 min. La segunda reacción fue realizada tomando 2 µL del producto de la primera reacción, siguiendo posteriormente las mismas condiciones y cebadores descritos por Mayor *et al.* 2007¹¹. Los amplicones obtenidos, previa visualización en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, fueron purificados (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN, Duesseldorf, Alemania), cuantificados y posteriormente secuenciados (ABI 3130xl, Applied Biosystems; INTA Castelar). El número de serinas repetidas en tándem se determinó visualizando las secuencias con el software Chromas 2.32 software (Technelysium Pty Ltd.). Las secuencias de nucleótidos fueron alineadas empleando ClustalW¹⁰.

Lavados bronquiales: Se seleccionaron los loci *p146R1*, *p146R3*, *p216R1/R2* y *H4* para amplificar por PCR estándar, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por de Castro *et al.*⁵ a partir del análisis de 5 cepas de *M. hyopneumoniae*. Los amplicones fueron corridos en gel de agarosa al 1,2% a 150 V por 5 horas, teñidos con SYBR Green I y visualizados en un transiluminador de luz UV. Para el estudio del número de serinas repetidas en tándem codificadas en la región *R3* del gen *p146*, las muestras de ADN fueron amplificadas con los cebadores y las condiciones descritas por Mayor *et al.*¹¹. Estos amplicones fueron purificados, secuenciados y analizados como se describió para los obtenidos a partir de hisopados nasales.

RESULTADOS

El análisis de VNTRs empleando muestras correspondientes a hisopados nasales y lavados bronquiales mostró la circulación de diferentes

Tabla 1. Datos correspondientes a las muestras analizadas.

Granja	Tipo de establecimiento	Categoría muestreada	Lugar	Tipo de muestra	Nº de muestras
A	Parto-terminación	Reproductores y terminación	Prov. Santa Fe	Hisopado nasal	7
B	Múltiple sitio	Reproductores, destete y terminación	Prov. Santa Fe	Hisopado nasal	8
C	Parto-terminación	Terminación	Prov. Córdoba	Hisopado nasal	3
				Lavado bronquial	3
D	Parto-terminación	Terminación	Prov. Córdoba	Lavado bronquial	2
E	Parto-terminación	Terminación	Prov. Córdoba	Lavado bronquial	2
F	Múltiple sitio	Recría	Prov. San Luis	Hisopado nasal	10
				Lavado bronquial	4
G	Animales de reposición	Reproductores	Exterior	Lavado bronquial	6

genotipos de *M. hyopneumoniae* en la población de cerdos de Argentina. Se encontraron diferencias entre establecimientos y en algunos casos también dentro de establecimientos (Tablas 2 y 3). No se encontró asociación entre categoría de animal y genotipo del patógeno, ya que en una misma categoría se encontraron diferentes genotipos y hubo genotipos compartidos entre distintas categorías.

La secuenciación de la región *p146R3* amplificada de 39 muestras (hisopados nasales y lavados bronquiales), permitió detectar la presencia de 6 alelos, codificantes de repeticiones de 13, 14, 16, 17, 19 y 21 serinas. En 13 muestras de lavado bronquial este locus no mostró polimorfismo cuando se analizaron por electroforesis los amplicones obtenidos con los cebadores descritos por de Castro *et al.* 2006⁵ (Tabla 3). Sin embargo, cuando se determinó por secuenciación la cantidad de serinas repetidas en tándem en esa región, se detectó la presencia de 3 alelos -codificando repeticiones de 13, 14 y 17 serinas- (Tabla 2). El locus *p146R1* mostró dos alelos al igual que el locus *p216R1/R2*, mientras que el *H4* fue el más polimórfico,

mostrando cuatro posibles alelos, observándose 2 amplicones en una de las muestras (Figura 1 y Tabla 3).

Los animales de reposición provenientes del exterior presentaron un único genotipo de *M. hyopneumoniae* (con 14 serinas repetidas en la región R3 de *p146* y alelos a/e/i en los VNTRs *p146R1*, *p216R1/R2* y *H4*, respectivamente), el cual no se diferenció de uno de los genotipos presentes en nuestro país.

DISCUSIÓN

Las metodologías empleadas para el análisis de VNTRs de *M. hyopneumoniae* en muestras clínicas de porcinos (hisopados nasales y lavados bronquiales) permitieron determinar que existe diversidad genética entre las cepas que se encuentran en nuestro país. Se detectaron diferentes genotipos de este patógeno tanto entre granjas como entre animales de un mismo establecimiento, así como genotipos compartidos entre diferentes granjas o animales.

Considerando las diferencias de tamaño aproximado entre los alelos correspondientes a

Tabla 2. Número de serinas repetidas en tándem en muestras de hisopados nasales y lavados bronquiales, determinado a partir de la secuenciación del VNTR *p146R3*.

Granja	Muestras	Nº serinas repetidas en tándem
A	1a*	21
	2a*	21
	3a*	21
	4a*	21
	5a*	21
	6a*	21
	7a*	21
B	1b*	14
	2b*	14
	3b*	16
	4b*	21
	5b*	21
	6b*	21
	7b*	21
	8b*	21
C	1c*	16
	2c*	16
	3c*	16
	4c	17
D	1d	19
	2d	19
E	1e	13
	2e	14
F	1f*	14
	2f*	14
	3f*	14
	4f*	14
	5f*	14
	6f*	14
	7f*	14
	8f*	14
	9f*	14
	10f*	14
	11f	14
	12f	14
G	3g	14
	4g	14
	5g	14
	6g	14

* Hisopado nasal

los loci *H4*, *p216R1/R2* y *p146*, y teniendo en cuenta la cantidad de nucleótidos involucrados en las regiones repetidas en tándem descritas por de Castro *et al.* 2006⁵, se puede determinar que los alelos difieren en un mínimo de 2 unidades de repetición.

Se observó también, que una muestra presentó dos posibles alelos del VNTR *H4*, lo cual podría deberse a reacciones inespecíficas de los cebadores o a la presencia de diferentes genotipos de *M. hyopneumoniae* en la misma muestra. En el caso de *M. conjunctivae*, Belloy *et al.* 2003² demostraron una infección simultánea con 2 cepas en algunos ovinos, que detectaron al estudiar la región variable del gen *lppS* (homólogo el gen *p146* de *M. hyopneumoniae*).

En cuanto al gen *p146*, mediante la comparación por electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos con los cebadores descritos por de Castro *et al.* 2006⁵ no se observó polimorfismo en la región *R3* en el presente trabajo, que en cambio pudo ser detectado mediante secuenciación. Esto puede explicarse por la menor capacidad de discernir en un gel de agarosa diferencias de un bajo número de unidades de repetición, y en este caso sólo 3 bases componen la unidad de repetición. La mayoría de las muestras (19/39 – 48,7%-) presentaron 14 serinas repetidas en esta región, y correspondieron a 4 de los establecimientos estudiados (uno de ellos con animales muestreados a su ingreso desde el exterior de nuestro país). El 30,8% (12/39) de las muestras presentaron 21 regiones de serinas repetidas, pero se limitan sólo a los establecimientos A y B, las cuales son granjas cercanas. Debido a la proximidad operacional de las granjas, la transmisión por fómites⁹ o por el personal¹ puede haber jugado un papel más importante que la transmisión aérea de las cepas ya que la misma ha sido demostrada hasta 4,7 km por Dee *et al.* 2009⁶ y las granjas se encontraban a 7,6 kilómetros de distancia. Además, en la granja B hubo también muestras con 14 y 16 serinas repetidas lo que sugiere la circulación de al menos tres genotipos de *M. hyopneumoniae* dentro de la misma. En las granjas C y E en

Tabla 3. Alelos determinados por electroforesis de los amplicones correspondientes a los VNTRs estudiados en muestras de lavado bronquial.

Granja	Muestras	Alelos de los distintos VNTRs			
		<i>p146R1</i>	<i>p146R3</i>	<i>p216R1/R2</i>	<i>H4</i>
C	4c	b	c	d	-
	5c	b	c	e	f
	6c	a	c	e	g, h
E	1e	b	c	-	f
	2e	-	c	d	-
F	11f	-	c	e	i
	12f	a	c	e	i
	13f	a	c	e	i
	14f	-	c	e	h
G	1g	a	c	-	i
	2g	a	c	e	i
	3g	a	c	e	i
	4g	a	c	e	-

(-): Negativas (No se obtuvieron amplicones). Diferentes letras indican distintos alelos con los siguientes tamaños aproximados: a) 400 pb; b) 370 pb; c) 500 pb; d) 490 pb; e) 690 pb; f) 800; g) 750; h) 700 pb e i) 890 pb.

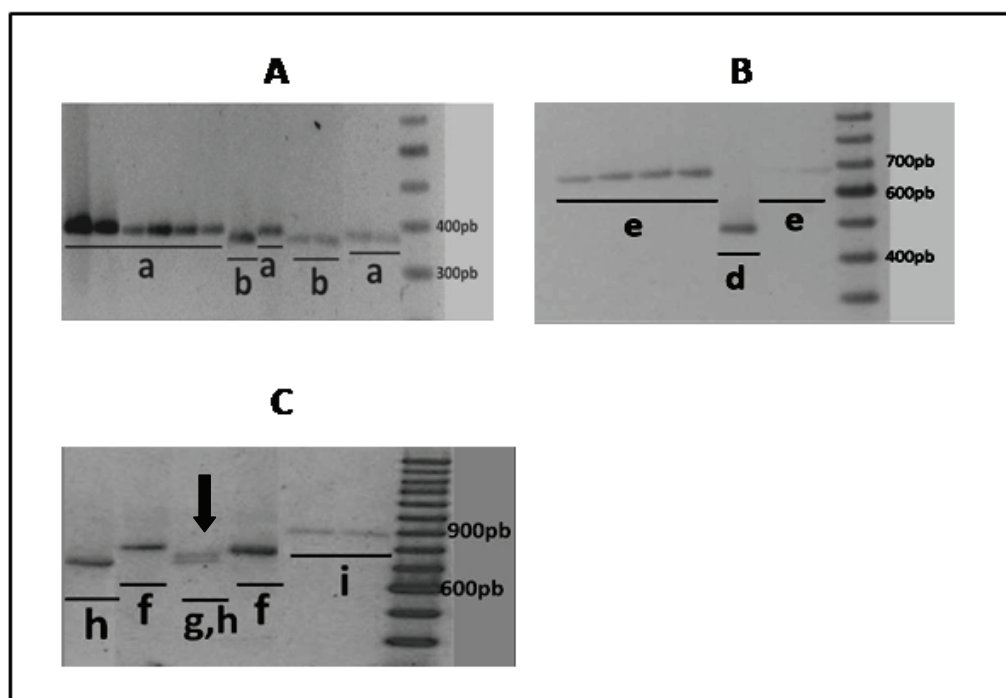


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a los VNTRs p146R1 (A), p216R1/R2 (B) y H4 (C). Letras diferentes indican diferentes alelos. A la derecha se observa el marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™) y se indica el tamaño de algunas de sus bandas. La flecha indica 2 amplicones en la misma muestra.

donde las diferencias entre muestras fueron debidas a una unidad de repetición (16 vs. 17 y 13 vs. 14 serinas, respectivamente) la situación es diferente ya que ha sido sugerido que entre muestras de una misma granja, una diferencia de 3 pb indica que las cepas podrían ser similares, casi idénticas¹¹.

Mediante la secuenciación de esta región del mismo gen, Oliveira *et al.* 2008¹² y Savic *et al.* 2010¹⁴ estudiaron el polimorfismo genético de cepas de distintas granjas de diferentes estados de EUA y Serbia, respectivamente, y Torremorel *et al.* 2008²¹ aplicaron esta técnica para el estudio de un brote. Otro estudio¹⁶, en el que amplificaron por PCR este mismo gen y analizaron luego los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), demostró una gran diversidad de *M. hyopneumoniae*, pero señala como principal desventaja para estudios epidemiológicos, que el análisis está limitado a un solo gen y dado que la tasa de mutaciones es desconocida, puede que existan regiones muy variables y otras más estables, a pesar de que todos los *Mycoplasmas* presentes en las muestras estarían bajo la misma presión de selección, por lo que el estudio de numerosas partes del genoma aportaría mayor información.

Un estudio anterior realizado en Europa¹¹ analiza la diversidad de *M. hyopneumoniae*, utilizando además de la secuenciación del gen *p146*, la detección por PCR de los genes codificantes de un elemento repetitivo (REP) y un transportador ABC putativo⁸. Sin embargo, concluyen que la inclusión de estos 2 genes en el estudio no aumentó significativamente el poder de discriminación, que ya de por sí era alto. Los autores pudieron identificar cepas específicas de un mismo establecimiento y demostrar que existe una gran variabilidad entre aislamientos de diferentes granjas y localización geográfica, así como también señalaron que el número de repeticiones y la secuencia de la región flanqueante se mantienen en una cepa luego de numerosos repiques.

El presente estudio genera antecedentes en el país y en la región acerca de la diversidad genética de *M. hyopneumoniae*, un importante

patógeno con alta prevalencia en Argentina⁷ y en el mundo. El conocimiento de la circulación de diferentes cepas resulta muy útil para estudios epidemiológicos, de patogénesis y de evaluación de estrategias de control. Además, serían útiles estudios para la caracterización molecular y comparación de las cepas circulantes con las vacunales utilizadas actualmente en nuestro país, ya que las mismas constituyen una de las herramientas de control más importantes de la NEP y ha sido demostrado que ni la infección previa, ni la vacunación con cepas de *M. hyopneumoniae* de baja virulencia protegen de la infección con cepas de alta virulencia²³. Las cepas vacunales usadas en nuestro país son las mismas que las utilizadas en otras partes del mundo y si bien existen antecedentes en la caracterización genómica⁵, incluso proteómica⁴ de algunas de estas cepas, no existen trabajos que las comparen entre sí, ni con las cepas circulantes. Estos estudios contribuirían a conocer el rol que juega la variabilidad genética respecto a la presentación clínica e inmunidad contra la enfermedad. Dado que los VNTRs estudiados ocurren dentro de secuencias codificantes, los cambios en el número de repeticiones pueden generar variantes de las proteínas que podrían tener impacto sobre la virulencia o inmunogenicidad. Según el conocimiento de los autores, es la primera vez que se informan diferencias entre cepas de *M. hyopneumoniae* en Argentina aplicando esta metodología de tipificación genética.

CONCLUSIONES

Mediante la metodología de tipificación empleada en este trabajo se evidenció la presencia en nuestro país de distintas cepas de *M. hyopneumoniae*, pudiendo presentarse varias en una misma granja. El método posee la ventaja de permitir caracterizar al microorganismo sin la necesidad de obtener un cultivo puro, lo cual, en el caso de este patógeno, es muy difícil. El desarrollo de la nPCR para lograr la amplificación y posterior secuenciación de la región R3 del gen *p146* fue de utilidad para el análisis de las muestras correspondientes

a hisopados nasales, las cuales no habían podido ser amplificadas en ensayos de PCR convencionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Batista, L.; Pijoan C.; Ruiz A. 2004. Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. *J. Swine Health Prod.* 12: 75-77.
- Belloy, L.; Janovsky, M.; Vilei, E.M.; Pilo, P.; Giacometti, M.; Frey, J. 2003. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across Species in Natural Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: (4): 1913-1919.
- Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Trigo, A. 1999. Applications of a nested-polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Invest.* 1: 246-251.
- Calus, D.; Baele, M.; Meyns, T. *et al.* 2007. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet. Microbiol.* 120 (3-4):284-91.
- de Castro, L.A.; Rodrigues Pedroso, T.; Kuchiishi, S.S. 2006. Variable number of tandem aminoacid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet. Microbiol.* 10; 116 (4): 258-69.
- Dee, S.; Otake, S.; Oliveira, S.; Deen, J. 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* 40 (4): 39.
- Dolso, I.; Pelliza, B.; Vissio, C.; Carranza, A.; Ambrogi, A.; Busso, J. 2000. Lesiones neumónicas halladas en matadero y su asociación con sistemas de crianza de cerdos al aire libre y confinados. *Congreso MERCOSUR de Producción Porcina.* 22 al 25/10. Bs.As. Rep. Argentina; SP-11.
- Dubosson, C.R.; Conzelmann, C.; Miserez, R. *et al.* 2004. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet. Microbiol.* 19: 102 (1-2): 55-65.
- Goodwin, R.F. 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet. Rec.* 116: 690-694.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P. *et al.* 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.
- 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.* 38 (3): 391-398.
- Oliveira, S.; Torremorell, M.; Been, C. 2008. *Mycoplasma hyopneumoniae* strain variation being observed in the field. *Allen D. Leman Swine Conference.* University of Minnesota. St Paul. Minnesota.
- Pinto, P.M.; Klein, C.S.; Zaha, A. *et al.* 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci.* 7: 45.
- Savic, B.; Ivetic, V.; Milicevic, V.; Pavlovic, I.; Zutic, M.; Gagrcin, M. 2010. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from conventional farrow-to-finish pig farms in Serbia. *Acta. Vet. Hung.* 58 (3): 297-308.
- Stakenborg, T.; Vicca, J.; Butaye, P. *et al.* 2005. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 109 (1-2): 29-36.
- Stakenborg, T.; Vicca, J.; Maes, D. *et al.* 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J. Microbiol. Methods.* 66 (2): 263-275.
- Tamiozzo, P.; Pelliza, B.; Carranza, A.; Ambrogi A. 2011. Monitoramento da presença de *Mycoplasma hyopneumoniae* em granjas de suínos durante a implementação de programas de erradicação. *Ciência Rural.* UFSM. CR-6145. 41 (4).
- Tamiozzo, P.J.; Lucchesi, P.M.A.; Ambrogi, A. 2010. Desarrollo y evaluación de una nueva PCR anidada (nPCR) para estudios de diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *X Congreso Nacional De Producción Porcina.* XVI Jornadas De Actualización Porcina. Mendoza. República Argentina.
- Tamiozzo, P. 2009. Rol, uso e importancia de la nPCR en la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas y

- su progenie luego de la aplicación de un programa de despoblación parcial. *Tesis para optar al grado de Magister en salud y Producción Porcina*. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto.
20. Thacker, E. Mycoplasmal diseases. In: STRAW, B.E *et al.* (Eds.). 2006. *Diseases of swine*. 9.ed. Oxford: Blackwell Publishing. 701-717.
 21. Torremorell, M.; Oliveira, S.; Acosta, J.; Correa Lima Linhares, D.; dos Santos, J.; Been, C. 2008. Using genetic sequencing for control of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Allen D. Leman Swine Conference*. University of Minnesota. St Paul. Minnesota.
 22. Vicca, J.; Stakenborg, T.; Maes, D. *et al.* 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.* 97 (3-4): 177-190.
 23. Villarreal, I.; Maes, D.; Meyns, T. *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. *Vacc.* 27 (12): 1875-1879.
 24. Villarreal, I.; Maes, D.; Vranckx, K.; Calus, D.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F. 2011. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vacc.* 29 (9): 1731-1735.

