



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**POLIMORFISMO EN EL GEN DE LA ADHESINA P97 DE *Mycoplasma  
hyopneumoniae***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**LORENA REYES GUERRA**

**TUTOR: DR. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. ALEJANDRO DE LA PEÑA MOCTEZUMA**

**DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO**

**MÉXICO, D. F.**

**2008**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

**A mis padres Reynaldo y Lupita por enseñarme el amor al estudio, por su ejemplo  
en la profesionalidad que nunca he olvidado.**

**A Adriana, Liz, Héctor, Alia, Assad, Eli por su fraternidad.**

**A Jorge Cid:**

“Tu voz habla amorosa...

Tan tierna habla que me olvido  
de que es falsa su blanda prosa.

    Mi corazón desentristece.

Sí, así como la música sugiere  
    lo que en la música no está,  
    mi corazón nada más quiere  
que la melodía que en ti hay...

¿Amarme? ¿Quién lo creería? Habla  
con la misma voz que nada dice  
si eres una música que arrulla.  
Yo oigo, ignoro, y soy feliz.

    Ni hay felicidad falsa,  
    mientras dura es verdadera.  
¿Qué importa lo que la verdad exalta  
si soy feliz de esta manera?”

**“Fernando Pessoa”**

*Lorena*

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.**

**Al proyecto PAPIIT IN219006 y CONACYT 059050**

“Para ser grande, sé entero: nada  
Tuyo exageres o excluyas.  
Sé todo en cada cosa. Pon cuanto eres  
En lo mínimo que hagas,  
Por eso la luna brilla toda  
En cada lago, porque alta vive.”

“Ricardo Reis”

**Al Dr. Alfredo Sahagún Ruiz por su guía y amistad.**

**Al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma por contribuir a mi empeño y su valiosa amistad.**

**A los doctores miembros del jurado Dr. Abel Ciprián Carrasco, Dra. Rosa Elena Miranda y Dr. Edmundo Calva por sus valiosos comentarios para la elaboración de la tesis.**

**A mis amigas hermosas Lupita Patiño y Rosalba Rincón, por hacer más perfecto aquello en que creo, y que con su amor, me relajaron en los momentos de tensión.**

**A mis compañeros de generación por permitirme representarlos ante el Comité Académico del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal.**

**A mis amigas Andira, Caro, Selene, Liliana, Lupita.**

**A mis amigos Paco Jacal, Rodrigo M, Oscar M, Raúl S, Edgar A, Humberto R, Salim C, Bernardo P, Alberto B, por su amistad y poder contar con sus valiosísimos consejos, jejeje!!.**

**A todos los miembros del Departamento de Microbiología e Inmunología-FMVZ-UNAM que hicieron posible la elaboración de este trabajo**

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>ABC</b>	<b>Transportador de unión al ATP (ATP-Binding-cassette)</b>
<b>ADN</b>	<b>Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>ARN</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>ARNr</b>	<b>Ácido ribonucleico ribosomal</b>
<b>ARNt</b>	<b>Ácido ribonucleico de transferencia</b>
<b>A-T</b>	<b>Adenina-Timina</b>
<b>ATP</b>	<b>Trifosfato de adenosina</b>
<b>BLAST</b>	<b>Basic local alignment search tool</b>
<b>CTAB</b>	<b>Bromuro de cetil-trimetil-amonio</b>
<b>EDTA</b>	<b>Etilen diamino tetra acetato de sodio</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos de Norte América</b>
<b>FC</b>	<b>Fijación del complemento</b>
<b>FGF</b>	<b>Factor de crecimiento de fibroblastos</b>
<b>G-C</b>	<b>Guanina-Citosina</b>
<b>IF</b>	<b>Inmunofluorescencia</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gamma</b>
<b>Ig</b>	<b>Inmunoglobulina</b>
<b>kb</b>	<b>Kilobases</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>Mab</b>	<b>Anticuerpo monoclonal</b>
<b>MCP-3</b>	<b>Proteína quimiotáctica de monocitos 3</b>
<b><math>\mu</math>g</b>	<b>Microgramo</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b><math>\mu</math>l</b>	<b>Microlitro</b>
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<b>Proteína inflamatoria de macrófagos 1<math>\alpha</math></b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>ORF</b>	<b>Marco abierto de lectura</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>PF-4</b>	<b>Factor plaquetario 4</b>
<b>PRRSV</b>	<b>Virus del síndrome respiratorio y reproductivo del cerdo</b>
<b>RFLP</b>	<b>Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>S</b>	<b>Svedberg – Coeficiente de sedimentación</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil-sulfato de sodio</b>
<b>SPF</b>	<b>Libre de patógenos específicos (Specific pathogen free)</b>
<b>TAE</b>	<b>Tris- ácido acético-Etilen dinitrilo tetra acetato disódico</b>
<b>TE</b>	<b>Solución amortiguadora de Tris-EDTA</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>UNAM</b>	<b>Universidad Nacional Autónoma de México</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra violeta</b>
<b>VNTR</b>	<b>Número variable de repeticiones en tándem</b>

## ÍNDICE

1. <b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
2. <b>INTRODUCCIÓN</b>	5
2.1. Clasificación Taxonómica	5
2.2. Antígenos de <i>M. hyopneumoniae</i>	6
2.3. Neumonía enzoótica porcina	8
2.4. Manifestaciones clínicas	8
2.5. Lesiones	9
2.6. Epidemiología	9
2.7. Diagnóstico	10
2.8. Tratamiento	11
2.9. Profilaxis	11
2.10. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>M. hyopneumoniae</i>	12
2.11. Mecanismos de patogenicidad y virulencia	13
3. <b>HIPÓTESIS</b>	15
4. <b>OBJETIVO</b>	15
5. <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	16
5.1. Muestras	16
5.2. Medio para aislar <i>M. hyopneumoniae</i>	16
5.3. Procesamiento de la muestra para el aislamiento	17
5.4. Extracción de ADN	17
5.5. Iniciadores	17
5.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
5.7. Secuenciación	19
5.8. Análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos del gen de la adhesina P97 de <i>M. hyopneumoniae</i>	19
6. <b>RESULTADOS</b>	21
6.1. Amplificación del gen de la adhesina P97 de <i>M. hyopneumoniae</i> por la PCR	21
6.2. Secuenciación	21
6.3. Variantes de R1 del gen de la adhesina P97	23
6.4. Variantes de R2 del gen de la adhesina P97	25
6.5. Variantes en la secuencia de nucleótidos R1 y R2 de P97	25

6.6. Alineación de las secuencia de nucleótidos del gen de P97 de R1 y R2	26
6.7. Filogramas derivados del fragmento amino-terminal de P97	28
6.8. Filograma de la secuencia de nucleótidos de las variantes de R1 y R2	30
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>8. CONCLUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>44</b>
<b>10. APÉNDICE I</b>	<b>51</b>
<b>11. APÉNDICE II</b>	<b>52</b>
<b>12. APÉNDICE III</b>	<b>54</b>
<b>13. APÉNDICE IV</b>	<b>55</b>
<b>14. APÉNDICE V</b>	<b>56</b>
<b>15. APÉNDICE VI</b>	<b>62</b>
<b>16. APÉNDICE VII</b>	<b>63</b>



## Polimorfismo en el gen de la adhesina P97 de *Mycoplasma hyopneumoniae*

### Resumen

*Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente primario de la neumonía enzoótica en cerdos, enfermedad respiratoria crónica, de baja mortalidad y alta morbilidad, que ocasiona importantes pérdidas económicas, asociadas a la baja ganancia de peso y deficiente conversión alimenticia. La transmisión de *M. hyopneumoniae* es por contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de cerdos infectados. *M. hyopneumoniae* inicia la colonización de la superficie del epitelio respiratorio por medio de la adhesina P97, la cual se une a glicolípidos sulfatados sobre la membrana de las células ciliadas. El gen *p97* tiene dos regiones repetitivas, R1 que se caracteriza por adherirse a las células ciliadas y R2, estas regiones codifican para A/TKPV/EA/T y GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S respectivamente, y ambas varían en el número de repeticiones presentes en las diferentes cepas reportadas. Basados en esta información, planteamos la hipótesis de que los *M. hyopneumoniae* mexicanos diferirán en sus secuencias a nivel de R1 y R2 en *p97* de las cepas reportadas en las bases de datos de *GenBank*. Este estudio está dirigido a determinar si estas regiones, en *M. hyopneumoniae* nacionales, difieren de las reportadas en otros países. La cepa J de *M. hyopneumoniae* fue utilizada como testigo positivo y la cepa de campo de *M. hyorhinitis*, como testigo negativo. Se obtuvieron muestras de 384 pulmones de cerdos con lesiones provenientes de rastros del Estado de México, que fueron procesadas para aislamiento bacteriológico y extracción de ADN mediante CTAB/fenol/cloroformo. Para la PCR se utilizaron los iniciadores MhpF y MhpR, basados en la secuencia del gen *mhp271*; MhpRR1-F y MhpRR2-R, basados en la secuencia del gen *p97* para *M. hyopneumoniae* y Mhyor37F y Mhyor37R, basados en la secuencia del gen *p37* para *M. hyorhinitis*. El gen *p97* amplificado por la PCR, se secuenció de manera automática en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)<sup>a</sup>, utilizando el sistema ABI<sup>®</sup>. El análisis de las secuencias se realizó con el software Sequencher versión 5, *ClustalW* y BLAST del NCBI. De las 384 muestras el 54.7% (210) resultaron negativas a la bacteriología, mientras que 45.3% (174) fueron positivas. De las positivas en el 2.3% (4) se aisló *Mycoplasma hyorhinitis*, en el 40.8% (71) *Pasteurella multocida* tipo A, en el 6.9% (12) *Pasteurella*, en el 51.7% (90) *Arcanobacterium pyogenes*, en el 17.2% (30) *Escherichia coli*, en el 17.2% (30) *Staphylococcus aureus*, en el 41.4% (72) *Staphylococcus* y en el 17.2%

---

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos

(30) *Moraxella*. Mientras que se detecto por PCR en el 16.1% (28) *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En 2 muestras de pulmones 1p97 y 79p97 se amplificó una secuencia nueva en R1: **AKLVA**. Este descubrimiento cambia la secuencia conocida A/TKPE/VA/T a A/TKP/**LE**/VA/T. En la muestra 292P97 se encontró la secuencia nueva en R2: GAPNQGKK**SE**. Este hallazgo cambia la secuencia conocida GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S a GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/T/**SE**/K/T/S. Han sido reportadas en *GenBank* 25 variantes en la secuencia de nucleótidos en R1. En este estudio encontramos 1 nueva secuencia de R1 en las muestras 1P97 y 79P97. Similarmente, han sido reportadas 30 variantes en la secuencia de nucleótidos en R2, en este estudio encontramos 1 nueva secuencia de R2 en la muestra 292P97. Concluimos que los *M. hyopneumoniae* que ocurren en México, presentan diferencias en la secuencia de aminoácidos de P97 respecto a los que ocurren en otros lugares de mundo; esto podría tener implicaciones importantes respecto a la protección inmunológica con vacunas basadas en cepas de otros países; por lo que se sugiere el desarrollo de inmunógenos con cepas nacionales.

## Abstract

*Mycoplasma hyopneumoniae* causes enzootic pneumonia, a chronic pulmonary disease of the pig, characterised by low mortality and high morbidity, the most important disease associated to economics loss in swine production, due to reduced rate of gain and feed efficiency. Transmission of *M. hyopneumoniae* is by direct contact with respiratory tract secretion from infected swine. *M. hyopneumoniae* attaches to the ciliated epithelial cells lining the respiratory tract via the P97 adhesin that binds to sulphated glycolipids on the host-cell membrane of tracheal cilia. *p97* has two repetitive regions, R1 which codes for the region responsible for attachment to the ciliary membrane and R2. R1 and R2 encode the amino acid sequences A/TKPV/EA/T and GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S respectively; both of them vary in the number of amino acid repeats between different strains. Based on this information, propose the hypothesis that the Mexican *M. hyopneumoniae* will differ in *p97* R1 and R2 from the strains reported in *GenBank*. This study is about the characterization of Mexican strains of *M. hyopneumoniae* in the R1 and R2 regions and the description of the differences with the reported in other countries. *M. hyopneumoniae* strain J was used as positive control and the field strain of *M. hyorhinis* as a negative control. 384 samples of injured lung were obtained from slaughterhouses of the State of Mexico, which were processed for bacteriological isolation and DNA extraction with CTAB/phenol/chloroform for PCR. The primers MhpF and MhpR, were used, based on the sequence of the *mhp271* gene; MhpRR1-F and MhpRR2-R based on the sequence of the gene *p97* for *M. hyopneumoniae* and Mhyor37F and Mhyor37R based on the sequence of the gene *p37* for *M. hyorhinis*. The *p97* gene was amplified by PCR and sequenced at the Institute of Biotechnology, UNAM<sup>b</sup>, in an automatic way using the ABI<sup>®</sup> system. The analysis of the sequences was done by the software Sequencher, *ClustalW* and BLAST NCBI. From the 384 samples, 54.7% (210) were negative by bacteriology, while 45.3% (174) were positive. From these last 2.3% (4) were positive to *Mycoplasma hyorhinis*, 40.8% (71) to *Pasteurella multocida* type A, 6.9% (12) to *Pasteurella*, 51.7% (90) to *Arcanobacterium pyogenes*, 17.2% (30) to *Escherichia coli*, 17.2% (30) to *Staphylococcus aureus*, 41.4% (72) to *Staphylococcus*, and 17.2% (30) to *Moraxella*. While *Mycoplasma hyopneumoniae* was detected in 16.1% (28) of the samples by PCR. A new sequence was found in the 1p97 and 79p97 Mexican *M. hyopneumoniae* in R1: **AKLVA**. This discovery redefines the consensus sequences from A/TKPV/EA/T to A/TKP/LE/VA/T.

---

<sup>b</sup> Institute of Biotechnology of the UNAM from Cuernavaca, Morelos,

A new sequence was found in the 292P97 sample in R2: GAPNQGKKSE. This discovery change the consensus sequence from GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S to GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/T/SE/K/T/S. 25 variants have been reported in the nucleotide sequence in R1 (*GenBank*). In this study, we find a new sequence in R1 in the 1P97 and 79P97 Mexican *M. hyopneumonie*. 30 variants have been reported in the nucleotide sequence for R2. In this study, we found one new sequence in R2 in the 292P97 Mexican *M. hyopneumoniae*. We conclude that the Mexican *M. hyopneumonie*, present differences in the amino acid sequence of P97 with regard to those in other parts of the world; this might have important implications with regard to the immune protection with vaccines based from strains from other countries; thus the development of immunogens is suggested to be done with national strains.

## Introducción

Los micoplasmas son un grupo de bacterias que pertenecen a la clase *Mollicutes*, por carecer de pared celular. Esta clase incluye 200 especies siendo los procariontes de vida libre más pequeñas que existen; por la falta de pared celular se deben de diferenciar estas bacterias de las formas L bacterianas. Miden 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  y su membrana es similar a la de las células eucariontes en cuanto que incluyen esteroides en su composición. El tamaño de su genoma oscila entre 580 kb (*M. genitalium*) y 1,350 kb (*M. penetrans*)<sup>1</sup>. Son exigentes nutricionalmente, requieren de proteínas, esteroides y fosfolípidos para su desarrollo por lo que son difíciles de cultivar. Las colonias se caracterizan por presentar una zona central que penetra el agar y una zona periférica sobre la superficie (forma de huevo frito), sin embargo algunas especies como *M. hyopneumoniae* no presentan esta morfología<sup>2</sup>.

El desarrollo de técnicas de biología molecular ha permitido la detección de micoplasmas en un mayor número de huéspedes. Algunos han sido asociados a enfermedades agudas y crónicas en animales y el hombre incluyendo afecciones respiratorias, del tracto genital, conjuntivitis, mastitis y artritis entre otras. Estudios recientes han mostrado la importancia de algunos componentes estructurales de la membrana de los micoplasmas en la patogenicidad, como proteínas relacionadas con el citoesqueleto<sup>3</sup> y las adhesinas, que han sido descritas en *M. pneumoniae* (P1), *M. genitalium* (MgPa)<sup>4</sup>, *M. gallisepticum* (Mgc2)<sup>5</sup> y *M. hyopneumoniae* (P97)<sup>6</sup>.

## Clasificación taxonómica

*Mycoplasma hyopneumoniae* se encuentra clasificado en la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*, ésta familia está compuesta por los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. *Mycoplasma hyopneumoniae* se encuentra en la familia *Mycoplasmataceae* por su requerimiento de colesterol y en el género *Mycoplasma* por ser ureasa negativo. Los patógenos hemotróficos *Haemobartonella* y *Eperythrozoon*, antes clasificados como rickettsias, son ahora considerados miembros del género *Mycoplasma*<sup>7</sup> con diferencias en morfología, tamaño del genoma y requerimientos nutricionales<sup>8</sup>. Las secuencias 16S rRNA son importantes como marcadores filogenéticos y su uso es recomendado por el Subcomité taxonómico de *Mollicutes*<sup>9</sup>. La alineación de múltiples secuencias 16S rRNA de la clase *Mollicutes* indican que *M. flocculare*, *M. hyopneumoniae*

y *M. hyorhinis* forman un subgrupo dentro del filogrupo de fermentadores, el cual es distinto del filogrupo de *M. pneumoniae*<sup>10</sup>.

Se conoce el genoma completo de *M. hyopneumoniae* cepa J con 897 kb; la cepa 7448 con 920 kb y la cepa 232 con 893 kb (*GenBank* AE017243, AE017244 y AAB70214 respectivamente)<sup>11, 12</sup>. El genoma de *M. hyopneumoniae* esta compuesto por 28.6 % de G+C, tiene secuencias que codifican para 304 (44%) supuestas proteínas, 261 (38%) proteínas hipotéticas conservadas, 127 (18%) proteínas hipotéticas únicas. El genoma contiene un operón para ARNr 16S-23S, un gen 5S ARNr a 100 kb del 23S ARNr y 30 secuencias codificantes para ARNt<sup>11</sup> (0); presenta el gen *dnaA* y *dnaN* que codifican para proteínas implicadas en la replicación del ADN; genes del sistema secretor, *secA*, *secY*, *secD*, *prsA*, *dnaK*, *tig* (trigger factor) y *lepA*; proteínas de transporte, SgaA, SgaB, SgaT, MtlF, MtlA, NagE y LicA; proteasas relacionadas en el proceso post-traduccional de la adhesina P97, Map, PepA, PepF, PepP y Gcp; el complejo DnaK-DnaJ-GrpR responsable de la proteína estructural en *M. hyopneumoniae*<sup>11</sup>.

### **Antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae***

*Mycoplasma hyopneumoniae* se relaciona antigénicamente con *M. flocculare*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae*<sup>13, 14</sup>. Las proteínas como la lactado deshidrogenasa de 36 kDa, así como los antígenos de 40, 43, 64, 74 y 97 kDa, que pueden ser utilizadas para distinguir *M. hyopneumoniae* de *M. flocculare* y *M. hyorhinis* ambos pueden estar en lesiones de neumonía enzootica. Las propiedades antigénicas de varias cepas de *M. hyopneumoniae* muestran proteínas inmunodominantes, incluyendo la proteína citosólica P36, además de las proteínas de membrana P46 y P74. Las proteínas P36 y P46 contienen determinantes antigénicos específicos de especie, altamente conservados en diferentes cepas de *M. hyopneumoniae*<sup>15, 16</sup>.

La proteína P72 de *M. hyopneumoniae* presenta 70% de homología con la enzima I del sistema fosfotransferasa (PTSI), comparado con otras especies de micoplasma. En diferentes estudios, la expresión de los genes de virulencia son controlados por la vía de represión catabólica de PTS, por lo que los autores sugieren que la mutante PTSI puede ser utilizada como una vacuna recombinante para la prevención de la neumonía enzoótica<sup>17</sup>.

Las lipoproteínas de la cepa J de *M. hyopneumoniae*, con masas moleculares de 44, 50 y 65 kDa, han sido identificadas como antígenos de superficie. La P65 contiene un motivo conservado amino terminal Gly-Asp-Ser-Leu (GDSL) asociado a la familia de enzimas lipolíticas y es considerada factor de virulencia porque podría reducir la función del surfactante en pulmones neumónicos, sin embargo, se requiere mayor investigación sobre su significancia patogénica y fisiológica *in vivo* e *in vitro*. La identificación de un marco abierto de lectura (ORF) que codifica para un homólogo de transportador de unión al ATP ABC enseguida del gen *p65* sugiere que es parte de un sistema de transporte activo<sup>18, 19</sup>.

Las lipoproteínas inmunogénicas *mhp378* y *mhp651*, con secuencia de aminoácidos altamente conservadas en diferentes aislados de *M. hyopneumoniae*, se expresan durante la enfermedad y pueden estar involucradas en la patogenicidad<sup>20</sup>.

La adhesina ciliar P97 ha sido extensivamente caracterizada en *M. hyopneumoniae*<sup>3, 21</sup>. Es una proteína de membrana periférica de 97 kDa (P97) que se une a tres distintos glicolípidos sulfatados, sobre la membrana de las células ciliadas de la tráquea del cerdo<sup>22, 23</sup> y además se une a dos dominios de heparina (glucosaminoglucano). La adhesina P97 es proteolíticamente procesada post-traduccionalmente durante el desarrollo *in vitro* y este procesamiento es extensivo y cepa-específico. La mayoría de los productos procesados se mantienen asociados a superficie celular de *M. hyopneumoniae*, a pesar de la ausencia de dominios hidrofóbicos u otros motivos que la pudieran anclar a la membrana celular<sup>24</sup>. Interacciones proteína-proteína ya sea con otras proteínas de *M. hyopneumoniae* o con moléculas derivadas del huésped podrían facilitar la localización de estos fragmentos procesados en la superficie celular<sup>24</sup>. La adhesina P97 se expresa simultáneamente con la proteína P102. La adhesina P97 se expresa a 37°C en condiciones de baja osmolaridad a un pH de 6.8 a 7.2 y tiene un punto isoeléctrico calculado de 8.8; se sintetiza como una preproteína de 124.9 kDa de 814 a 887 aminoácidos la cuál es procesada en fragmentos de 22, 28, 66 y 94 kDa. El fragmento de 22 kDa corresponde a la región amino terminal de la preproteína y funciona como péptido señal; mientras que los fragmentos de 28 y 66 kDa derivan del fragmento de 94 kDa. El tamaño de la adhesina madura es de 97 kDa.

### **Neumonía enzoótica porcina**

*Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente primario de la neumonía enzoótica en cerdos, enfermedad respiratoria crónica, con baja mortalidad y alta morbilidad. El primer reporte de su aislamiento en pulmones neumónicos y la reproducción experimental de la enfermedad fue realizado por Mare y Switzer (1965) y Goodwin *et al.* (1965), en EUA e Inglaterra respectivamente<sup>14</sup>. La enfermedad ha ocasionado pérdidas económicas en la industria porcina predisponiendo a neumonías bacterianas con diferentes agentes secundarios, como *Pasteurella multocida* y *Arcanobacterium pyogenes*; reduce la conversión alimenticia y produce un retardo en el crecimiento<sup>25</sup>. Las condiciones de manejo y alojamiento pueden determinar la forma de presentación de la enfermedad y el curso clínico de la infección<sup>26</sup>. El control y erradicación de la enfermedad podrían ser más efectivos con el uso de vacunas que con la utilización de antibióticos; pero la carencia de éstas y la falta de herramientas de diagnóstico dificultan la erradicación de la enfermedad.

### **Manifestaciones clínicas**

La presentación de la neumonía enzoótica puede ser aguda, cuando se reintroduce en piaras de animales libres de patógenos específicos (S.P.F), o crónica, cuando se presenta en hatos donde la enfermedad es enzoótica. En la forma aguda, los animales de diferentes edades son afectados, presentando anorexia, fiebre 40.6-41.7 °C, estrés respiratorio y tos, ocasionando la muerte de algunos adultos y hasta el 50% de los lechones. Los signos clínicos en la presentación crónica, se caracterizan por tos crónica, la cual inicia en forma gradual de pocas semanas a meses, aunque algunos cerdos afectados no la evidencian; sin embargo se intensifica en la finalización del ciclo de producción, donde se puede observar animales con retraso en el crecimiento. Los signos pueden ser más severos cuando la piara no inmune es afectada. Los sonidos respiratorios se van complicando cuando inicia la infección por agentes secundarios, los animales presentan inapetencia, dificultad para respirar, tos severa, fiebre, postración y finalmente la neumonía puede ocasionar la muerte<sup>27, 28</sup>.



## **Lesiones**

Las lesiones macroscópicas neumónicas consisten en áreas de consolidación púrpuras o grises, localizadas en la parte ventral del lóbulo apical, cardiaco e intermedio y en la parte anterior de los lóbulos diafragmáticos, exudado catarral en vías aéreas, linfonodos mediastínicos y bronquiales aumentados de tamaño<sup>27</sup>.

Las lesiones microscópicas tempranas consisten en acumulación de neutrófilos en lámina propia y alrededor de las vías aéreas y alveolos, infiltrado linfocitario en la adventicia de las arteriolas, vénulas y vías aéreas. En la enfermedad progresiva se incrementa el número de linfocitos perivasculares, peribronquiales y en la lámina propia de las vías aéreas. Los alvéolos presentan edema eosinofílico y hay un incremento de células mononucleares, septales y polimorfonucleares. Entre los 15-20 días se aprecia hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas. En lesiones más avanzadas se aprecia proliferación linforeticular en áreas perivasculares y peribronquiales, alvéolos colapsados y enfisema alveolar<sup>26, 27, 28</sup>.

## **Epidemiología**

La neumonía enzoótica es transmitida a cerdos susceptibles por contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de animales infectados. La infección puede ser introducida a granjas por aerosoles desde una distancia de 3.2 km<sup>27</sup>. La prevalencia de la enfermedad en cerdos en finalización se incrementa debido al largo periodo de incubación, el aumento de la densidad animal, la presencia de otros agentes infecciosos como *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *P. multocida* tipo A y *A. pyogenes*, y factores ambientales después del destete, como manejo inadecuado de los animales, instalaciones con poca ventilación, contaminación con amonio y nitritos. En algunas áreas, la enfermedad ha aumentado su complejidad y severidad, por la relación con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV). Las pérdidas económicas son atribuidas a la reducida ganancia de peso y mala eficiencia alimenticia. Se tienen reportes de una reducción del crecimiento entre 12.7% y 15.9% que pueden representar de 8 hasta 85 kg en animales que están en contacto con la enfermedad. Las pérdidas económicas se han estimado de aproximadamente 2.80 USD por cada animal producido<sup>27</sup>. La información acerca de la prevalencia de la neumonía enzoótica y las pérdidas económicas han sido basada sobre la evaluación de las lesiones en pulmones obtenidos en el rastro, por lo tanto se tiene que tener precaución con el manejo de la información<sup>27, 28</sup>.

## Diagnóstico

Los métodos serológicos utilizados para el diagnóstico de la neumonía enzoótica incluyen, Fijación del complemento (FC), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), inmunotransferencia tipo Western blot e inmunofluorescencia indirecta (IF)<sup>27</sup>.

Se ha desarrollado un ELISA tipo sándwich, donde se utiliza un anticuerpo monoclonal (Mab, IgA) y el antígeno recombinante P46 de *M. hyopneumoniae*, para la detección de anticuerpos anti-P46 en muestras de suero de cerdos infectados experimentalmente y en condiciones naturales. En animales experimentales se identificó una seropositividad similar para FC y ELISA (anti-P46), mientras que en muestras de animales de campo, de 2-6 meses de edad de estos al momento de la matanza, se apreció un incremento del 80% en la seropositividad por ELISA; mientras que en la FC se detectaron reacciones no específicas<sup>28</sup>.

Se han utilizado además ensayos de ELISA indirecta comerciales y ELISA tipo sándwich (Mab para la proteína de 74 kDa de *M. hyopneumoniae*) con 100% de sensibilidad y especificidad<sup>28</sup>.

La inmunotransferencia tipo Western blot se puede utilizar como prueba confirmatoria para la presencia de anticuerpos anti-*M. hyopneumoniae* en suero porcino, cuando se obtengan falsos positivos en las pruebas de ELISA comercial basadas en antígenos completos, ya que puede existir reactividad cruzada con otras especies de micoplasma debida a los antígenos de 70 y 30 kDa<sup>29</sup>.

La producción y caracterización de Mab específicos anti-P46 and anti-P65 permiten la detección efectiva por IF indirecta e inmunoperoxidasa indirecta de *M. hyopneumoniae* en secciones de pulmón fijados en formalina y congelados respectivamente de cerdos de 6-7 semanas<sup>30</sup>.

Debido a que *M. hyopneumoniae* es difícil de aislar y de identificar, el diagnóstico por cultivo no es factible, ni práctico; por lo que se han desarrollado técnicas moleculares que facilitan su detección. Se desarrolló una PCR, que amplifica un fragmento de 853 pb del gen *MHJ0212* de la supuesta proteína del sistema de transportador ABC<sup>31,32</sup> (Apéndice III). Se recomienda el lavado broncoalveolar, para coleccionar muestras del tracto respiratorio inferior de los cerdos para la detección de *M. hyopneumoniae in vivo*. Se desarrolló una PCR simple y una PCR multiplex de los genes *p36* y *p46* que codifican para una proteína

citoplasmática con actividad de lactato deshidrogenasa de 36 kD y una proteína de membrana de 46 kD respectivamente, ambos ensayos se aplicaron sobre muestras de pulmón, hisopos nasales y lavados bronqueoalveolares (15); también se diseñó una RT-PCR anidada del gen *mhprRNA-16S* (RNA ribosomal 16S)<sup>33, 34</sup> (Apéndice III); así como, una RT-PCR del gen *pr1* que codifica a la supuesta proteína transportadora ABC de *M. hyopneumoniae* las dos técnicas fueron probadas en muestras de pulmón obtenidos de rastro<sup>35</sup>, las cuales tienen elevada sensibilidad (0.5-1 fg de ADN) y especificidad para *M. hyopneumoniae*.

### **Tratamiento**

La enfermedad por *M. hyopneumoniae* puede ser controlada con la administración de antibióticos, que tienen la ventaja de poder aplicarse por diferentes vías y reducir infecciones causadas por otros patógenos bacterianos respiratorios.

La combinación de tiamulina-clortetraciclina-valnemulina reducen la severidad de los signos clínicos de la neumonía enzoótica<sup>36</sup>. La tilosina, un macrólido eficaz, distribuido en los tejidos y fluidos corporales, inhibe la síntesis de proteínas bacterianas por la unión reversible al rRNA 23S en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano<sup>37</sup>. Estos quimioterapéuticos pueden ser administrados en el alimento.

Las fluoroquinolonas, principalmente marbofloxacina y enrofloxacina se utilizan para el tratamiento de neumonía enzoótica, actúan sobre las enzimas de transcripción, ADN girasa y topoisomerasa IV bacterianas. Sin embargo, se ha observado resistencia al quimioterapéutico, debido a mutaciones en el gen *parCE* y *gyrAB*<sup>38</sup>.

### **Profilaxis**

La vacunación es una alternativa económica y segura para controlar la enfermedad, y así aumentar la eficacia y la habilidad de incrementar la productividad, principalmente en la ganancia diaria de peso; existen bacterinas comerciales que utilizan concentrados de células de *M. hyopneumoniae* inactivadas<sup>c, 39</sup>. Sin embargo, no protegen completamente a los cerdos de la infección por *M. hyopneumoniae* y otros patógenos secundarios<sup>40, 41</sup>. Debido a la complejidad del cultivo *in vitro* de *M. hyopneumoniae*, el costo de producción de

---

<sup>c</sup> Diluvac Forte<sup>®</sup>; Intervet International.

bacterinas a partir del microorganismo completo es elevado, por lo que justifica la búsqueda de vacunas subunitarias.

La adhesina P97 es el antígeno mejor estudiado de *M. hyopneumoniae*, que puede generar protección evitando su adherencia a las células ciliadas del tracto respiratorio porcino<sup>6</sup>.

Se han elaborado quimeras recombinantes con la región repetitiva R1 de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae*, unida al dominio de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* PE( $\Delta$ III), el cual es utilizado como un bio-adyuvante no tóxico. La respuesta inmune en ratones y en cerdos a la región repetitiva R1 unida a PE( $\Delta$ III) fue superior, comparada con las células completas de *M. hyopneumoniae*, según los resultados de la técnica de ELISA e inmunotransferencia tipo Western blot<sup>41</sup>. En un modelo de ratón se evaluó la respuesta inmune mediada por células, humoral y secretoria, con una vacuna oral de *Salmonella typhimurium aroA*, expresando la región R1 de la adhesina de P97; la cual induce una respuesta Th1 específica para R1, pero no genera anticuerpos IgA en la mucosa<sup>42</sup>. Por otro lado, se evaluó en ratones una vacuna recombinante que expresa la región repetitiva R1 de la adhesina P97, unida a la subunidad B de la enterotoxina termo-lábil, no tóxica, de *Escherichia coli* (rLTBR1). Se logró una mayor producción de IgA anti-R1 en tráquea y bronquios; así como anticuerpos sistémicos anti-R1 e inmunidad celular comparando con bacterinas comerciales inactivadas de células completas de *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, se requiere de estudios en cerdos para evaluar la respuesta inmune a rLTBR1<sup>43</sup>.

### **Cultivo *in vitro* *M. hyopneumoniae***

El aislamiento de *M. hyopneumoniae* es complicado, por sus exigencias nutricionales y debido a la frecuente presencia de *M. hyorhinis* en el tracto respiratorio. El medio de cultivo utilizado para su desarrollo fue descrito por Friis<sup>44</sup>. En cultivos líquidos primarios *M. hyopneumoniae* tiene un desarrollo lento, produciendo una ligera turbidez y la acidificación del medio después de 3 a 30 días de incubación.

Para el cultivo de *M. hyopneumoniae* se necesitan varios subcultivos antes de inocular el medio sólido, el cual se incuba en una atmósfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. En el medio sólido se pueden observar colonias en 2 a 3 días, que incrementan su tamaño a 0.25 ó 1

mm de diámetro aproximadamente a los 10 días. A diferencia de otros micoplasmas no producen las típicas colonias en forma de “huevo frito” y su desarrollo es irregular<sup>14</sup>.

La identificación bioquímica de los aislados, se realiza determinando dependencia de esteroides mediante la presencia de zonas de inhibición del desarrollo alrededor de discos de papel filtro impregnados con digitonina en un medio sólido, (para la diferenciación entre *Acholeplasma* y *Mycoplasma*)<sup>41</sup>, reducción de tetrazolio<sup>45</sup> y/o fermentación de la glucosa<sup>2</sup>.

Se puede hacer la identificación de los aislados mediante inhibición del crecimiento sobre medio sólido utilizando anticuerpos específicos, aunque se han detectado diferencias antigénicas entre aislados de *M. hyopneumoniae*. Una alternativa para la identificación es el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) utilizando las enzimas de restricción *Vsp I*, *Cla I* y *Hind III*<sup>13, 46</sup>.

En las muestras clínicas existen diferentes microorganismos que interfieren con el desarrollo de *M. hyopneumoniae*, por lo que se requiere adicionar inhibidores al medio de cultivo como: bacitracina, meticilina, acetato de talio o penicilina procaínica, para lograr su aislamiento<sup>44</sup>. De manera similar, los cultivos celulares y medios bacteriológicos se pueden contaminar con *M. hyorhinis*, de rápido desarrollo; procedente del suero o tripsina de cerdo.

### **Mecanismos de patogenicidad**

La variación en la virulencia entre diferentes aislados de *M. hyopneumoniae* ha sido caracterizada en modelos experimentales de infección por el análisis del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)<sup>37</sup>.

Se desarrolló un ensayo para detectar las regiones repetitivas de número variable (VNTR), en *M. hyopneumoniae* para diagnóstico de NE y la tipificación de cepas circulantes. En este estudio se encontró que el genoma de *M. hyopneumoniae* contiene al menos 22 VNTR que corresponden a 12 genes y codifican para proteínas que pueden afectar su estructura, producir variaciones antigénicas y por lo tanto tener implicaciones en la patogenicidad e interacción con el sistema inmune del huésped<sup>47</sup>.

*Mycoplasma hyopneumoniae* inicia la colonización de la superficie epitelial por medio de adhesinas. La adherencia y multiplicación del microorganismo induce la pérdida de cilios y la reducción de la actividad ciliar de traquea, bronquios y bronquiolos. La primera defensa

de este tejido incluye mecanismos inespecíficos, tales como la producción de moco y el movimiento de los cilios. Adicionalmente, está el sistema inmune mucosal, que se caracteriza por la producción de la inmunoglobulina secretoria tipo A (IgA)<sup>43</sup>. La adhesina ciliar P97 ha sido extensivamente caracterizada en *M. hyopneumoniae*<sup>3, 21</sup>. La adhesina tiene relación con la patogénesis y con la probable evasión de la respuesta inmune del huésped<sup>48</sup>. Por otra parte, el gen *p159* (*mhp494*) codifica para P159 que es una proteína de superficie que también es proteolíticamente procesada post-traduccionalmente, generando un complejo patrón de fragmentos que residen en la superficie de *M. hyopneumoniae* y se unen a heparina, de manera similar que P97. La heparina bloquea la adherencia de *M. hyopneumoniae* a células PK15, lo que sugiere que utiliza diferentes medios para unirse a las células eucariontes<sup>49</sup>. El gen *p159* (apéndice III) se localiza en el genoma de *M. hyopneumoniae* adyacente al parálogo de *p97* identificado como *p216* (*mhp493*)<sup>11</sup>. El gen *p97* se encuentra en un operón que incluye un segundo gen, que codifica para una proteína de 102 kDa designada como P102; ambos se expresan durante la enfermedad. El análisis en Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST*) de *p97* y *p102*, revela varios genes homólogos para ambos genes que podrían representar una fusión de los genes<sup>50</sup>. La P97 tiene dos regiones repetitivas, la R1 y la R2, que codifican para los aminoácidos A/TKPE/VA/T y GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S respectivamente (Apéndice V). Ambas varían en secuencia y en el número de repeticiones (R1: 4-17 y R2: 3-6) en diferentes cepas. La adherencia de *M. hyopneumoniae* a las células ciliadas del cerdo es mediada por la región repetitiva R1, la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal F1B6 que bloquea su adherencia *in vitro*, evidenciando su importancia en la patogénesis de la enfermedad<sup>23, 51, 52, 53</sup>.

Existe polimorfismo entre diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* a nivel de R1 y R2 en *p97* reportados en *GenBank*, por lo que sospechamos que habrá diferencias entre los nacionales. En el presente estudio se analizó la secuencia de *p97* a nivel de R1 y R2 en diferentes *M. hyopneumoniae* de México, y se comparó con las secuencias publicadas en *GenBank* y se determinaron sus relaciones filogenéticas.

**Hipótesis:** Existen diferencias en las secuencias de las regiones repetitivas R1 y R2 de *p97* de *Mycoplasma hyopneumoniae* entre aislados mexicanos y los reportados en *GenBank*.

**Objetivo:** Determinar si existen diferencias en las secuencias de R1 y R2 de *p97* de *Mycoplasma hyopneumoniae* entre aislados mexicanos y los reportados en *GenBank*.

**Objetivos particulares:**

1. Identificar las bacterias asociadas a la lesión pulmonar.
2. Aislar *Mycoplasma hyopneumoniae* de muestras de pulmones con lesiones sugerentes a neumonía enzótica.
3. Amplificar por la PCR el fragmento del gen *p97* que incluye las regiones R1 y R2.
4. Secuenciar el fragmento R1 y R2 de *p97* de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
5. Analizar las secuencias comparando con las publicadas en *GenBank*.

## Material y métodos

### Muestras

Se recolectaron un total de 384 muestras de pulmón de cerdo con lesiones sugerentes a neumonía enzootica provenientes de los estados de Jalisco, Veracruz, Puebla, Hidalgo y Michoacán; en los rastros “Abastos Cuautitlán TIF”, “Municipal Naucalpan”, “Municipal de Tlalnepantla” y “Rastro Santa Clara TIF”, del municipio de Ecatepec, Estado de México. Con el fin de aumentar la probabilidad de obtener diferentes *M. hyopneumoniae*, se tomaron aproximadamente 15 pulmones durante 25 muestreos realizados del 25 de agosto del 2006 al 2 de noviembre de 2007.

### Medio para aislar *M. hyopneumoniae*

El aislamiento primario se realizó en medio líquido de Friis modificado<sup>44</sup>, utilizando 500 ml de solución balanceada de Hank<sup>d</sup> con 0.175 g de bicarbonato de sodio, 750 ml de agua destilada, 8.2 g de caldo infusión cerebro corazón (BHI)<sup>e</sup>, 8.7 g de caldo PPLO (pleuropneumoniae like organisms)<sup>f</sup>, rojo de fenol 0.01g por cada litro de solución de Hank; ajustando el pH a 7.4 y esterilizado por autoclave a 121°C/15 lb/15 min. Posteriormente, se adicionaron cantidades iguales de suero de porcino<sup>g</sup> y de equino<sup>h</sup> inactivados a 60°C en una concentración final del 20%, 60 ml de extracto de levadura fresca (pH 7.4) y penicilina procaínica 800, 000 UI por cada litro de medio de cultivo. El medio fue esterilizado por filtración<sup>i</sup> (membranas de 0.22 µm). Finalmente, se colocaron 3 ml del medio líquido en tubos de 13X100 mm estériles.

El medio sólido de Friis se elaboró con las mismas condiciones del medio líquido, adicionando 0.9 % de agarosa<sup>j</sup>, del cual se vaciaron 30 ml en cajas de Petri de 90 mm de diámetro estériles.

---

<sup>d</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>e</sup> Difco<sup>TM</sup>.

<sup>f</sup> Difco<sup>TM</sup>.

<sup>g</sup> HyClone®.

<sup>h</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>i</sup> MILLIPORE.

<sup>j</sup> ONBIO.



## Procesamiento de la muestra para el aislamiento bacteriano

La superficie del tejido pulmonar de las 384 muestras, se esterilizó con espátula caliente a la flama, tomando 1 cm<sup>3</sup> de muestra que fue inoculada en un cuarto de la caja de agar sangre (AS), para aislamiento en cultivo puro, cruzando una estría en cada cuadrante de *S. aureus* productor de  $\beta$ -toxina para microorganismos que puedan ser dependientes de NAD. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5-10% de CO<sub>2</sub>, durante 24-48 h. La identificación se realizó por pruebas bioquímicas para los diferentes microorganismos aislados en todas las muestras.

Con el fin de aislar *M. hyopneumoniae*, se utilizaron todas las muestras que resultaron positivas por PCR al fragmento de *mhp271*, para su proceso (Cuadros 1 y 2). El tejido se homogenizó utilizando medio líquido de Friis para aislamiento de *M. hyopneumoniae* y se filtró a través de 0.45µm. Se realizaron 4 diluciones décuples seriadas de la muestra de tejido pulmonar previamente homogenizado en el medio líquido de Friis con un volumen inicial de 3 ml y se incubaron a 37 °C durante 9 días.

Cuando se observó cambio de coloración posterior a los 9 días se resembró en medio sólido de Friis incubándolo a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> durante 9 días más y evaluando las cajas con un microscopio estereoscópico para la búsqueda de las colonias características.

## Extracción de ADN

De 1 ml del tejido pulmonar previamente homogenizado y suspendido en medio líquido de Friis, de cerdos sospechosos a *M. hyopneumoniae*, se extrajo ADN por la técnica de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)<sup>k</sup>/fenol<sup>l</sup>/cloroformo<sup>m</sup>,<sup>54</sup> (Apéndice I). El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría<sup>n</sup>.

## Iniciadores

Se diseñaron iniciadores a partir del gen *p97* (*GenBank*) de manera que incluyeran las dos regiones repetitivas R1 y R2: MhpRR1-F y MhpRR2-R degenerado, que amplifican un fragmento de aproximadamente 800 pb. Se diseñaron los iniciadores MhpF y MhpR,

---

<sup>k</sup> SIGMA Aldrich

<sup>l</sup> SIGMA Aldrich

<sup>m</sup> SIGMA Aldrich

<sup>n</sup> Pharmacia Ultrospec 3000 Spectrophotometer.

basados en la secuencia del gen *mhp271* que amplifican un fragmento de 760 pb y los iniciadores descritos por Caron Mhyor37F y Mhyor37R basados en la secuencia del gen *p37* para *M. hyorhinis* que amplifican un fragmento de 347 pb <sup>15</sup>(15) (Cuadro 1).

Los iniciadores utilizados fueron comparados con las diferentes secuencias a partir del gen *p97* (*GenBank*, apéndice III y V) con el programa *ClustalW* versión 1.82 del European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI, [www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)) y se analizaron en BLAST del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) para identificar posible homología con otras secuencias del *GenBank*.

Cuadro 1.- Iniciadores				
<i>mhp271</i>	MhpF	5'GTCTAACTGTCGGACTTAGCA3'	MhpR	5'GCCTGT GATTTGCGAAGACTA 3'
<i>P97</i>	MhpRR1-F	5'ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCAT3'	MhpRR2-R	5'TACCTAAG/TTACAGGAAGGTAATTAG 3'
<i>P37</i>	Mhyor37F	5'GTAGTCAAGCAAGAGGATGT3'	Mhyor37R	5'GCTGGAGTTATTATACCAGGA 3'

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN genómico de *M. hyopneumoniae* de la cepa J proporcionada amablemente por el Dr. Hugh Cai, de la Universidad de Guelph, Canadá, fue utilizado como control positivo para amplificar los genes *mhp271* y el de la adhesina P97 como y el ADN de *M. hyorhinis* cepa de campo aislada en el laboratorio de Inmunología Molecular de la UNAM, como control negativo. Se utilizó ADN genómico de muestras de tejido pulmonar para la amplificación de fragmentos de los genes *mhp271* y de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae*.

Inicialmente, se realizó la amplificación del gen *mhp271* de *M. hyopneumoniae*, las muestras que resultaron positivas, fueron procesadas para amplificación del gen *p97* (Cuadro 2).

La reacción de amplificación para cada programa de la PCR se desarrolló en un termociclador Eppendorf® modelo Mastercycler gradient, en un volumen de 20 µl, con 2 µl de solución amortiguadora 10X (20mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM de KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 0.3 µM de cada iniciador, 0.25 unidades de *Taq* ADN polimerasa<sup>o</sup> y concentraciones ≤ 200 ng de ADN. Las condiciones de la PCR se resumen en el Cuadro 2.

<sup>o</sup> Roche.

Cuadro 2.- Condiciones de la PCR						
Programa	Desnaturalización Inicial	Ciclos	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
mhp271	94°C x 2 min	35	94°C x 30 seg	55°C x 30 seg	72°C x 1 min	72°C x 4 min
p97	94°C x 10min	35	94°C x 1 min	53°C x 1 min	72°C x 1 min 30 seg	72°C x 7 min
p37	94°C x 4 min	30	94°C x 1 min	50°C x 1 min	72°C x 1 min 30 seg	72°C x 10 min

Los productos de la PCR (760 pb para *mhp271*, 800 pb para *p97* de *M. hyopneumoniae* y 347 pb para *p37* de *M. hyorhinae*) fueron evaluados por electroforesis a 100 volts, por 45 min, en geles de agarosa al 1% (peso/vol. en TAE 1X) (Apéndice II), teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml), utilizando el marcador de peso molecular 1 kb ladder<sup>p</sup> y observados en un transiluminador de luz UV<sup>q</sup> y finalmente fotodocumentados en un procesador de imágenes<sup>r</sup>.

### Secuenciación

El fragmento del gen *p97* fue amplificado por la PCR y el producto se purificó en un sistema comercial<sup>s</sup> y se secuenció en el Instituto de Biotecnología de la UNAM<sup>t</sup>. La secuenciación se realizó de manera automática utilizando el sistema ABI.

Las secuencias obtenidas con los iniciadores para el fragmento de *p97*, se analizaron con el programa Sequencher<sup>®</sup> (versión 4.5), evaluando los cromatogramas. Las secuencias de R1 y R2 de *p97* fueron comparadas con las reportadas en *GenBank* y alineadas con el programa de *ClustalW* versión 1.82 del EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)) y BLAST del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)).

Con la finalidad de obtener secuencias diferentes de R1 y R2 de *p97*, se secuenciaron un máximo de dos muestras positivas provenientes del mismo lote de pulmones de cerdos.

### Análisis de las secuencias de ADN y aminoácidos

<sup>p</sup> Invitrogen.

<sup>q</sup> DyNA Light Dual Intensity (80 / 100%) UV Transilluminator, Labnet

<sup>r</sup> KODAK Gel Logic 200 Imaging System

<sup>s</sup> QIAquick, QIAgen.

<sup>t</sup> Instituto de Biotecnología de la UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, México

Las secuencias de nucleótidos de *p97* de diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* se obtuvieron del *GenBank* del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html)) (Apéndice III). Con la finalidad de encontrar las secuencias similares se utilizó BLAST del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)); estas secuencias junto con las secuencias mexicanas obtenidas en este estudio, fueron alineadas, analizadas y utilizadas para construir árboles filogenéticos por el método de unión de vecinos con el programa *ClustalW* versión 1.82 del EMBL-EBI ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html)). Se utilizó el programa DNA to Protein Translation para obtener la secuencia de aminoácidos ([bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html](http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html)).

## Resultados

El desarrollo de *M. hyopneumoniae*<sup>u</sup> de la cepa J de referencia, en medio líquido de Friis fue de 4 días, observándose un cambio en la coloración. En medio sólido se observaron colonias en un promedio de 7 días post-inoculación. De las muestras de pulmón de cerdo, se identificaron diferentes microorganismos por aislamiento en cultivo puro en AS y pruebas bioquímicas complementarias. Se detectó por la PCR *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* (Cuadro 3). Las muestras positivas por la PCR a *M. hyopneumoniae*, se inocularon en medio líquido de Friis para su aislamiento. Aunque se observó cambio de color en el medio líquido, no se logró el aislamiento en medio sólido.

Cuadro 3.- Identificación de Microorganismos en Pulmón			
	Aislamiento	PCR	%
<i>M. hyopneumoniae</i>	-	28	16.1
<i>M. hyorhinis</i>	4	4	2.3
<i>P. multocida</i> tipo A	71	-	40.8
<i>Pausterella</i>	12	-	6.9
<i>A. pyogenes</i>	90	-	51.7
<i>E. coli</i>	30	-	17.2
<i>S. aureus</i>	30	-	17.2
<i>Moraxella</i>	30	-	17.2
<i>Staphylococcus</i>	72	-	41.4
Muestras positivas	174		45.3
Muestras negativas	210		54.7
Total de muestras	384		100

### Amplificación del fragmento del gen *p97* de *Mycoplasma hyopneumoniae* por la PCR

Se obtuvieron 6 fragmentos diferentes correspondientes a las regiones de R1 y R2 de *p97* de las muestras 1P97, 79P97, 174P97, 176P97, 185P97, 292P97 con pesos moleculares de 643 pb, 643 pb, 724 pb, 724 pb, 719 pb, 768 pb respectivamente (Apéndice III).

### Secuenciación

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos de *p97* de *M. hyopneumoniae* mexicanos se muestran en el Apéndice V. En la Figura 1 se aprecian las secuencias de aminoácidos de R1 de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae*, 20 reportadas en *GenBank*, y 6 secuencias mexicanas obtenidas en este estudio. El número de repeticiones varía de 4 a 17, siendo la variante más frecuente **AKPVA** seguida de **AKPEA** (147 y 139 respectivamente), ambas están en todas las cepas; y las menos frecuentes (una vez) **AKNKP**, **VKPVA** y **AKLVA**.

<sup>u</sup> Universidad de Guelph, Canadá

Figura 1.- Secuencia de aminoácidos R1 de *M. hyopneumoniae* (GenBank)\* y secuencias mexicanas \*\*. \***J M.hp** = cepa J de referencia (Canadá); Letras en verde= secuencias que flanquean a R2; variantes = secuencia de aminoácidos en colores; **No. de repeticiones** = 1-17

No. de repeticiones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
*0118285 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*0117704 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*0117577 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*IAF2355B01 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*IAF218601 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*IAF66900 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*R659 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTNTNT
*U50901 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPET	TKPVA	AKPEA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	TNTGFSL
*232 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPET	TKPVA	AKPEA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	TNTGFSL
*AY957500 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	VKPVA	AKPEA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	TNTNTGF
*406892 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	TNTGFSL
*F19 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPET	AKPVA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
*7448 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPVA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
*J <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPET	TKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
*Mhp1 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	PSQKRQN
*ATCC25934 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPET	TKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
*20868B <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPET	TKPVA	-----	----	----	----	----	----	----	----	TNTNTNT
*207352 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVG	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	----	----	----	TNTGFSL
*IAFDM9827 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKNKP	-----	----	----	----	----	----	----	----	----	KEDYFPM
*IAF46401 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	TNTNTNT
<b>*J M. h</b>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPET	TKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
**185 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
**292 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
**176 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
**174 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	AKPVA	AKPEA	-----	----	----	----	----	TNTNTNT
**1 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKLVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	TNTNTNT
**79 <i>M. h</i>	ILPQPPA	AKPEA	AKLVA	AKPEA	AKPVA	-----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	TNTNTNT

Considerando las nuevas variantes en secuencia de aminoácidos en R1 de P97 en los *M. hyopneumoniae* mexicanos 1P97 y 79P97, la secuencia conocida **A/TKPE/VA/T** cambia a **A/TKP/LE/VA/T** (Figura 1, Apéndice III). Sin embargo, debido a que en el *GenBank* se encontró la variante **AKNKP** en la cepa **IAFDM9827**, no reportada aún en la literatura, la secuencia de aminoácidos de R1 es **A/TKP/L/NE/V/KA/T/P** (Apéndice III). En la Figura 2 se aprecian las diferentes variantes de aminoácidos de R1.

<b>AKPVA</b>	<b>*AKPEA</b>
<b>VKPVA</b>	<b>AKLVA</b>
<b>AKPVG</b>	<b>TKPVA</b>
<b>AKPET</b>	<b>*AKNKP</b>

Figura 2.- Variantes R1 reportadas *GenBank*,\* IAFDM9827 y \*cepa mexicana

En la Figura 3 se aprecian las secuencias de aminoácidos de R2 de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae* 20 reportadas en *GenBank* y 6 secuencias mexicanas obtenidas en este estudio (Apéndice III). El número de repeticiones varía de 3 a 6, siendo más frecuente la variante **GAPNQGKKAE**<sup>53</sup>, que se encuentra en 22 de las 26 secuencias analizadas; seguida de **GTPNQGKKAE** que está presente en 14 y las menos frecuentes (una vez) fueron **GAPNQGKKSE** y **GTSNQSPTS**.

Figura 3.- Secuencia de aminoácidos R2 de *M. hyopneumoniae* (GenBank)\*\* y secuencias mexicanas\*\*. \***J M.hp** = cepa J de referencia (Canadá); Letras en verde= secuencias que flanquean a R2; variantes = secuencia de aminoácidos en colores; No. de repeticiones = 1-6

No. de repeticiones		1	2	3	4	5	6	
*J M. h	MTE	GSPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GASNQSTTT	ELT
*ATCC25934 M. h	MTE	GSPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GASNQSTTT	ELT
*AY957500 M. h	MTE	GSSNQGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQNTTT	ELT
*232 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELT
*U50901 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELT
*Mhp1 M. h	MTE	GSSNQGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQNTTT	-----	ELT
*IAFDM9827 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	ELT
*20868B M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	ELT
*7448 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	ELT
*406892 M. h	MTE	GTQNGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTPNQGKKAE	GTPNQSPTS	-----	ELT
*207352 M. h	MTE	GTQNGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTPNQSPTS	-----	-----	ELT
*F19 M. h	MTE	GSSNQGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	ELT
*R659 M. h	MTE	GSSNQGKKGE	GTPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	ELT
*0118285 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	-----	ELT
*0117577 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	-----	ELT
*IAF2355B01 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	-----	ELT
*IAF218601 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	-----	ELT
*IAF66900 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQNTTT	-----	-----	-----	ELT
*0117704 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTSNQSPTS	-----	-----	-----	ELT
*IAF46401 M. h	MTE	GSSNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GASNQSTTT	-----	-----	-----	ELT
<b>*J M. h</b>	MTE	GSPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GAPNQGKKAE	GAPSQGKKAE	GASNQSTTT	ELL
**1 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELT
**79 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELT
**174 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELL
**176 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELL
**185 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKAE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	EL
**292 M. h	MTE	GSSNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPNQGKKSE	GTPNQGKKAE	GAPSQSPTT	-----	ELT



Considerando la nueva variante en secuencia de aminoácidos de R2 de P97 en el *M. hyopneumoniae* mexicano 292P97, la secuencia conocida de R2 **GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S** cambia a **GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/T/SE/K/T/S** (Figura 3 y Apéndice III). En la Figura 4 se aprecian las secuencias de aminoácidos de las variantes de R2 representadas por diferente color.

<b>GAPNQGKKA</b> E	<b>GSPNQGKKA</b> E	<b>GTPNQGKKA</b> E	<b>*GAPNQGKKA</b> SE
<b>GAP</b> S <b>Q</b> GKKA <b>E</b>	<b>GSS</b> N <b>Q</b> GKKA <b>E</b>	<b>GTQ</b> N <b>Q</b> GKKA <b>GE</b>	<b>GSS</b> N <b>Q</b> GKKA <b>GE</b>
<b>GSS</b> N <b>Q</b> GKKA <b>SE</b>	<b>GAP</b> S <b>Q</b> <b>Q</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>T</b>	<b>GAP</b> S <b>Q</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>T</b>	<b>GTP</b> N <b>Q</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>S</b>
<b>GAS</b> N <b>Q</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>T</b> <b>T</b>	<b>GTS</b> N <b>Q</b> <b>Q</b> <b>S</b> <b>P</b> <b>T</b> <b>S</b>	<b>GTS</b> N <b>Q</b> <b>Q</b> <b>N</b> <b>T</b> <b>T</b>	

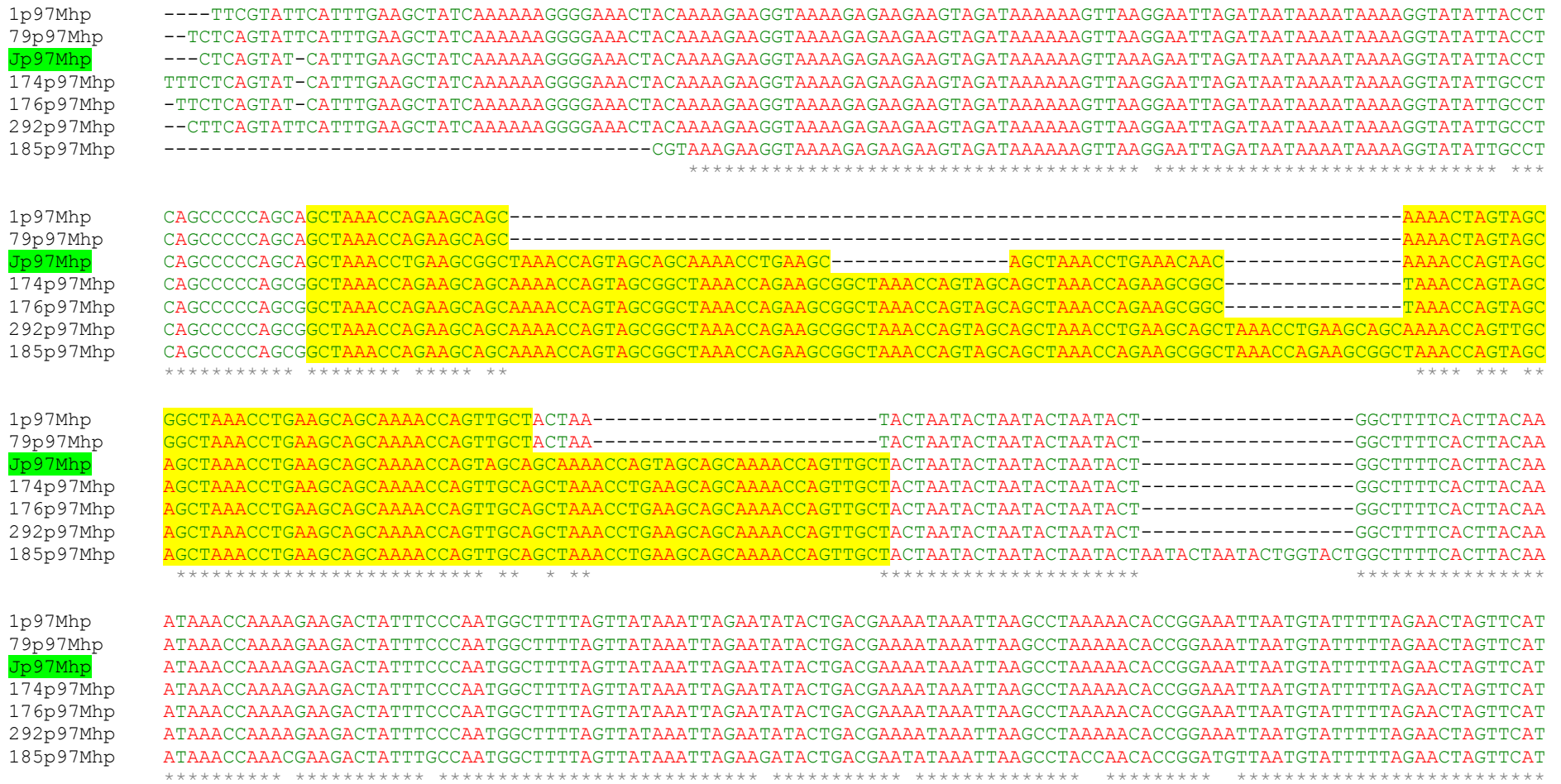
Figura 4.- Variantes de R2 (*GenBank*) y \*variante de R2 mexicana

### Variantes de la secuencia de nucleótidos R1y R2

Se observaron 26 variantes de la secuencia de nucleótidos de R1 y 31 de R2, considerando las cepas en *GenBank* y las nuevas secuencias mexicanas (Figuras 5, 6, 7, 8 y 9 presentes en el Apéndice V y VI).

En la Figura 10 se compara la secuencia de nucleótidos de R1 y R2 de *M. hyopneumoniae* mexicanos con la cepa J de referencia (*ClustalW*). En la alineación se aprecian regiones discontinuas debidas a un menor número de repeticiones R1 o R2 que explican las diferencias en el tamaño en las secuencias variando de 643 a 768 pb mientras que las reportadas en *GenBank* varían de 643 a 829 pb (Apéndice VII).

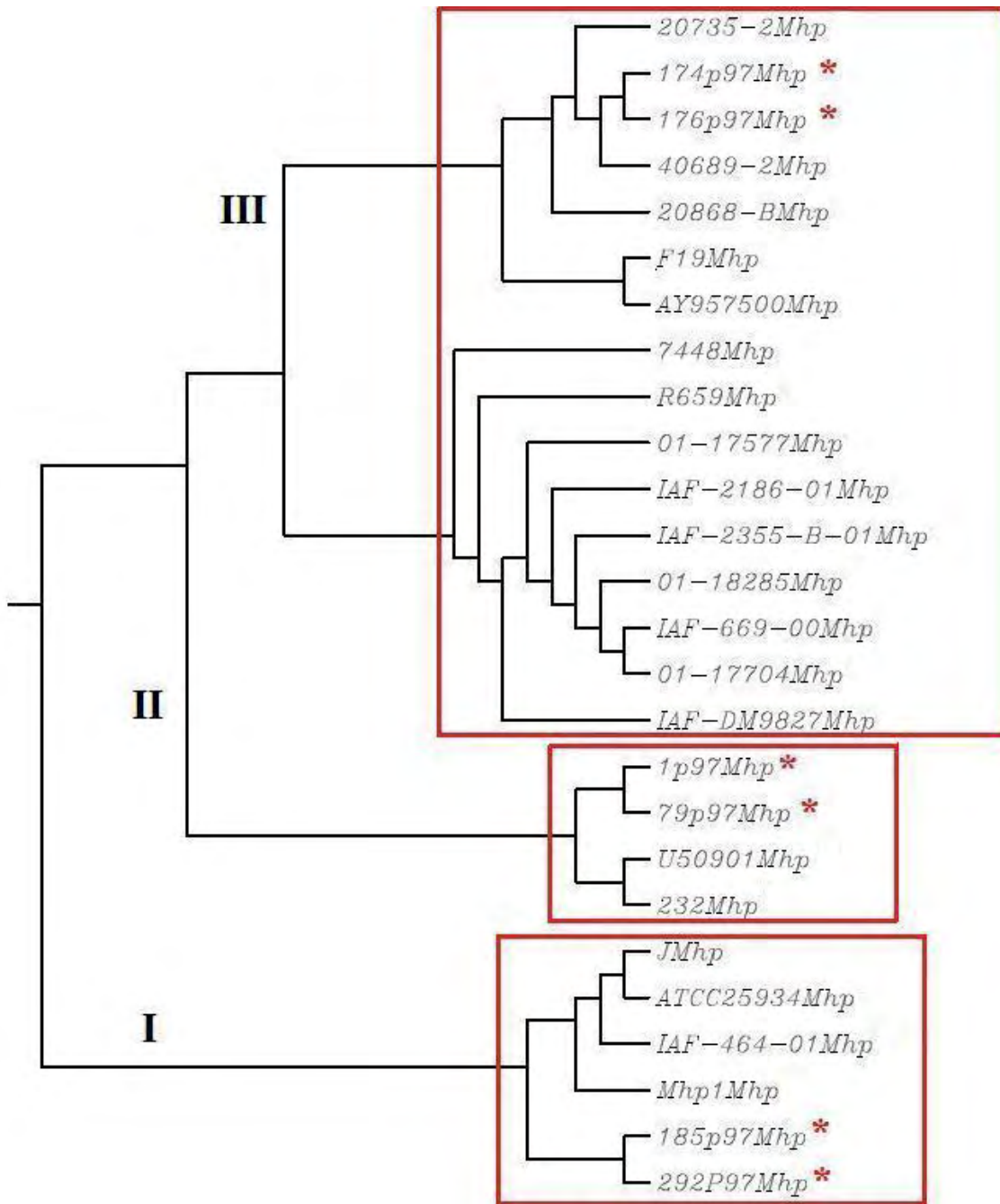
**Figura 10.- Alineación de las secuencia de nucleótidos de la adhesina P97 de R1 y R2 de *M. hyopneumoniae* mexicanos, comparada con la cepa J de referencia (*ClustalW*). Cepa J (Universidad de Guelph, Canadá) = Jp97Mhp; \*= nucleótidos idénticos; --- = regiones discontinuas.**





En la Figura 11, el filograma (ClustalW), muestra las relaciones y distancias genéticas entre las secuencias de nucleótidos del fragmento amino-terminal de la adhesina P97 que incluye las regiones R1 y R2 de las cepas en *GenBank*, y los *M. hyopneumoniae* mexicanos. En el filograma se observan tres grupos principales: el primero está conformado por un grupo compacto que incluye a los aislados 292P97 y 185P97 de México; Mhp1 de EUA; IAF-464-01 de Canadá; y J Mhp y ATCC25934 de Brasil. El segundo también es un grupo compacto e incluye las secuencias 232 y U50901 de EUA; y 1P97 y 79P97 de México. El tercer grupo muestra mayor divergencia y está constituido por dos subgrupos. El primer subgrupo incluye las secuencias 7448 de Brasil; R659 de China; y 01-17577, IAF-2355-B-0, 01-18285, IAF-2186-0, IAF-669-00, 01-1770, IAF-DM9827 de Canadá. El segundo subgrupo está representado por las secuencias F19 de China; AY957500 de Australia; 20735-2, 20868-B y 40689-2 de Canadá; y 176P97 y 174P97 de México.

Figura 11.-Filograma (*ClustalW*), de la secuencia de nucleótidos del fragmento amino-terminal de la adhesina P97 (R1 y R2) Las distancias genéticas están representadas por la longitud de los brazos y las relaciones entre las secuencias por el agrupamiento de las mismas.



Secuencias de las cepas obtenidas de *GenBank* y \*= secuencias mexicanas

En la Figura 12 se muestra el filograma de R1 a partir de las secuencias de nucleótidos de las variantes reportadas en *GenBank* y de las secuencias mexicanas (*ClustalW*). Se observó que las secuencias **AKPVA** y **AKPEA** tienen una mayor frecuencia; lo cual sugiere que una de estas dos podría ser la secuencia ancestral, el filograma sugiere que **AKPEA** es la más antigua. Mientras que analizando por medio de un filograma (*ClustalW*) las secuencias de nucleótidos de **AKPVA** y **AKPEA** exclusivamente, encontramos que ambas aparentan ser igual de antiguas. Sin embargo, **AKPVA** muestra una menor variación en sus secuencias de nucleótidos comparado con las de **AKPEA**, lo cual sugiere que **AKPVA** evolucionó paulatinamente de **GCTAAACCAGTAGCA**: esto podría indicar que **AKPVA** es la secuencia más antigua y que dio origen a **AKPEA** y al resto de las variantes encontradas hasta ahora (Figura 13).

Figura 12.- Filograma de la secuencia de nucleótidos de las variantes de RI (*ClustalW*). Cada color representa una variante, las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran del lado derecho.

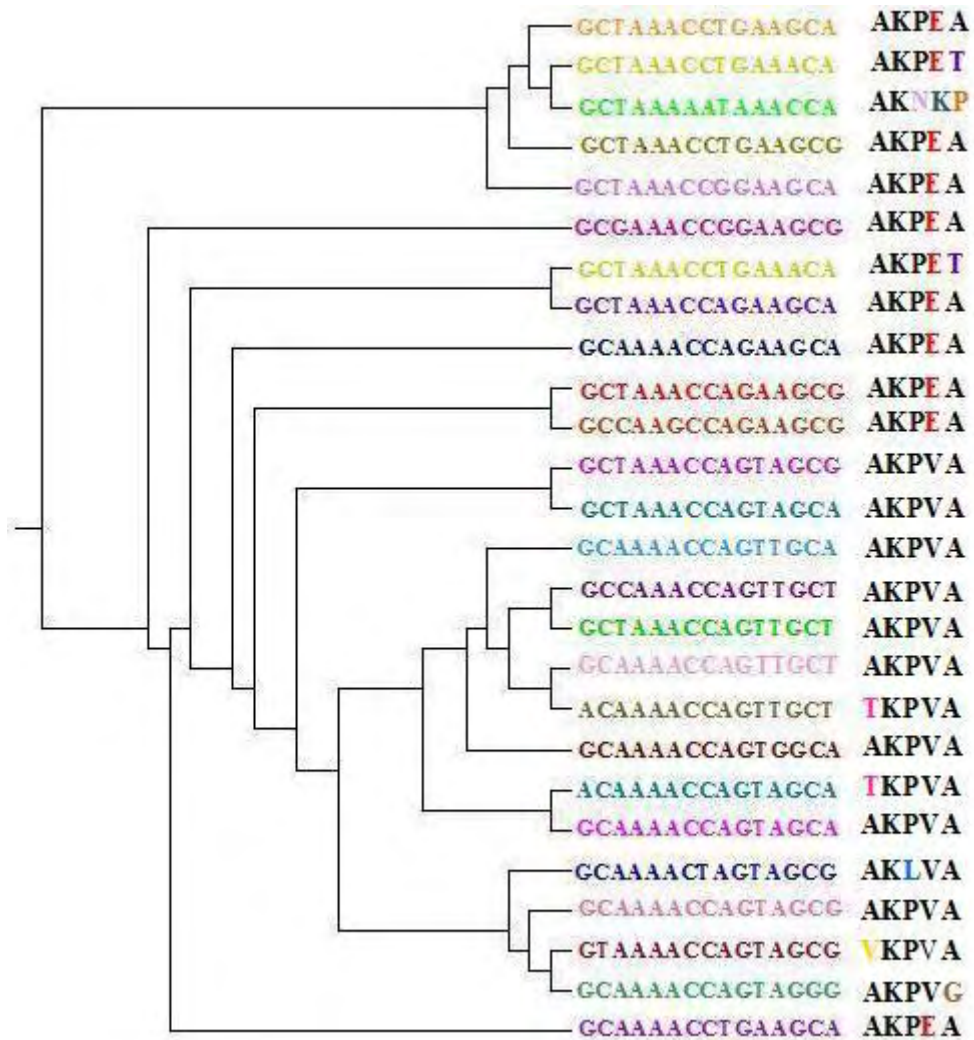
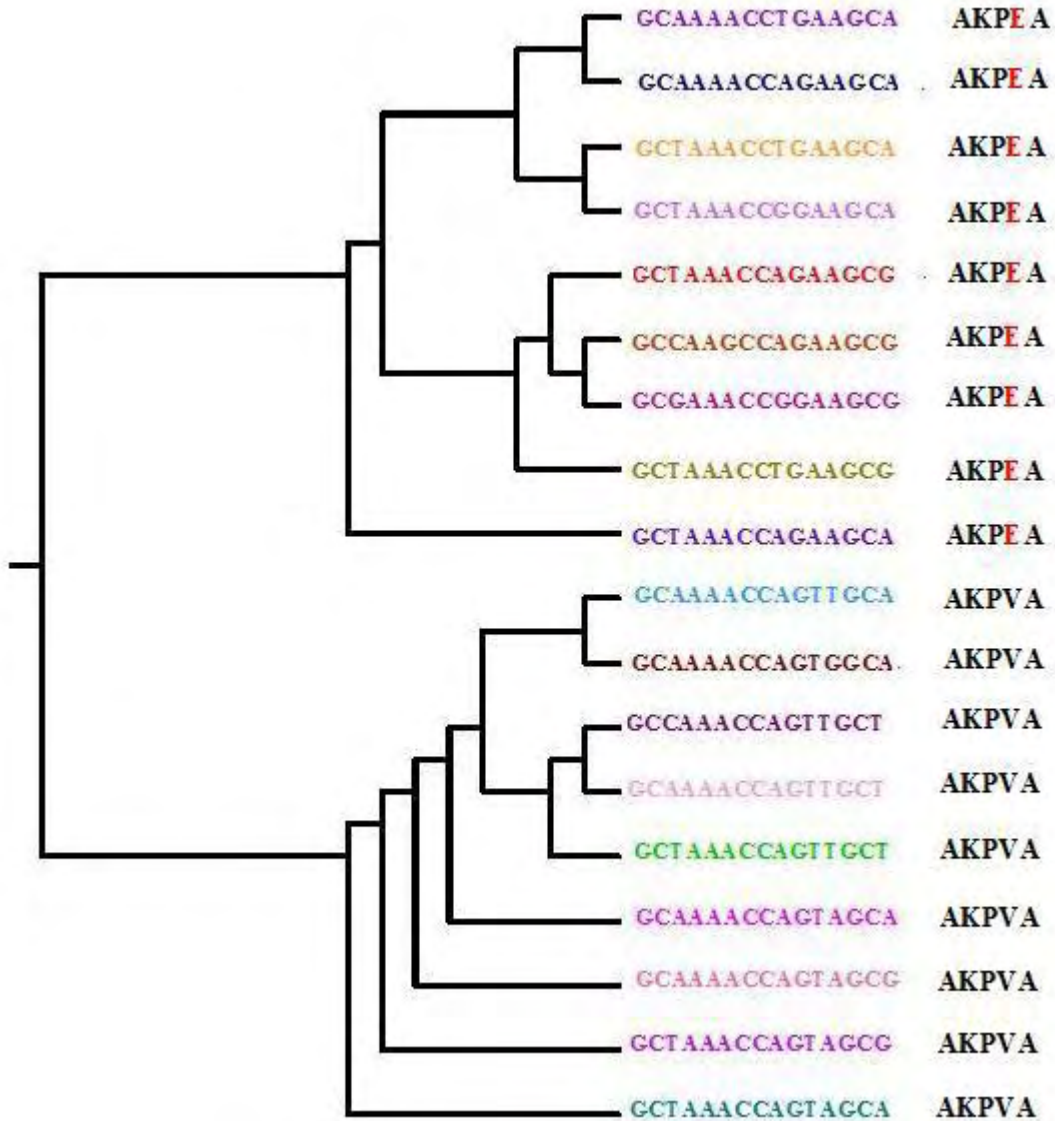


Figura 13.- Filograma de la secuencia de nucleótidos de las variantes **AKPVA** y **AKPEA** de R1 (*ClustalW*). Cada color representa una variante, las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en la parte superior.

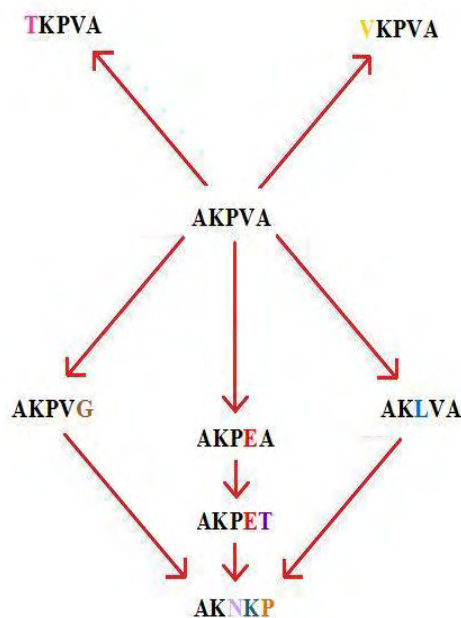


En la Figura 14 se muestra la evolución las variantes de R1 siguiendo la hipótesis de que **AKPVA** es la secuencia raíz de R1, encontrando que **AKPEA**, **VKPVA**, **AKLVA**, **AKPVG** y **TKPVA** solo difieren en un aminoácido, mientras que **AKPET** difiere en dos y **AKNKP** difiere en tres. Esto sugiere que **AKPEA**, **VKPVA**, **AKLVA**, **AKPVG** y



**TKPVA** evolucionaron directamente de **AKPVA**; mientras que **AKPET** evolucionó de **AKPEA**, y finalmente, que **AKNKP** podría haber evolucionado de **AKPET**, **AKPVG** o **AKLVA**.

Figura 14. Evolución de R1 a partir de **AKPVA**. Cada variante de R1 difiere de la adyacente sólo en un aminoácido, excepto **AKNKP**. El cambio de aminoácido se señala en color.



En la Figura 15 se aprecia el filograma, a partir de las secuencias de nucleótidos de las variantes de R2 reportadas en *GenBank* y de los aislados mexicanos (*ClustalW*). La variante más frecuente fue GAPNQGKKAЕ, lo que sugiere que es la secuencia ancestral, seguida de **GTPNQGKKAЕ**. El análisis del filograma de las dos secuencias más frecuentes de R2 (*ClustalW*), sugiere que GAPNQGKKAЕ es la secuencia ancestral (Figura 16)

Figura 15.- Filograma de la secuencia nucleótidos de las repeticiones de R2 (*ClustalW*).  
 Cada color representa una variante, los aminoácidos correspondientes se muestran del lado derecho.

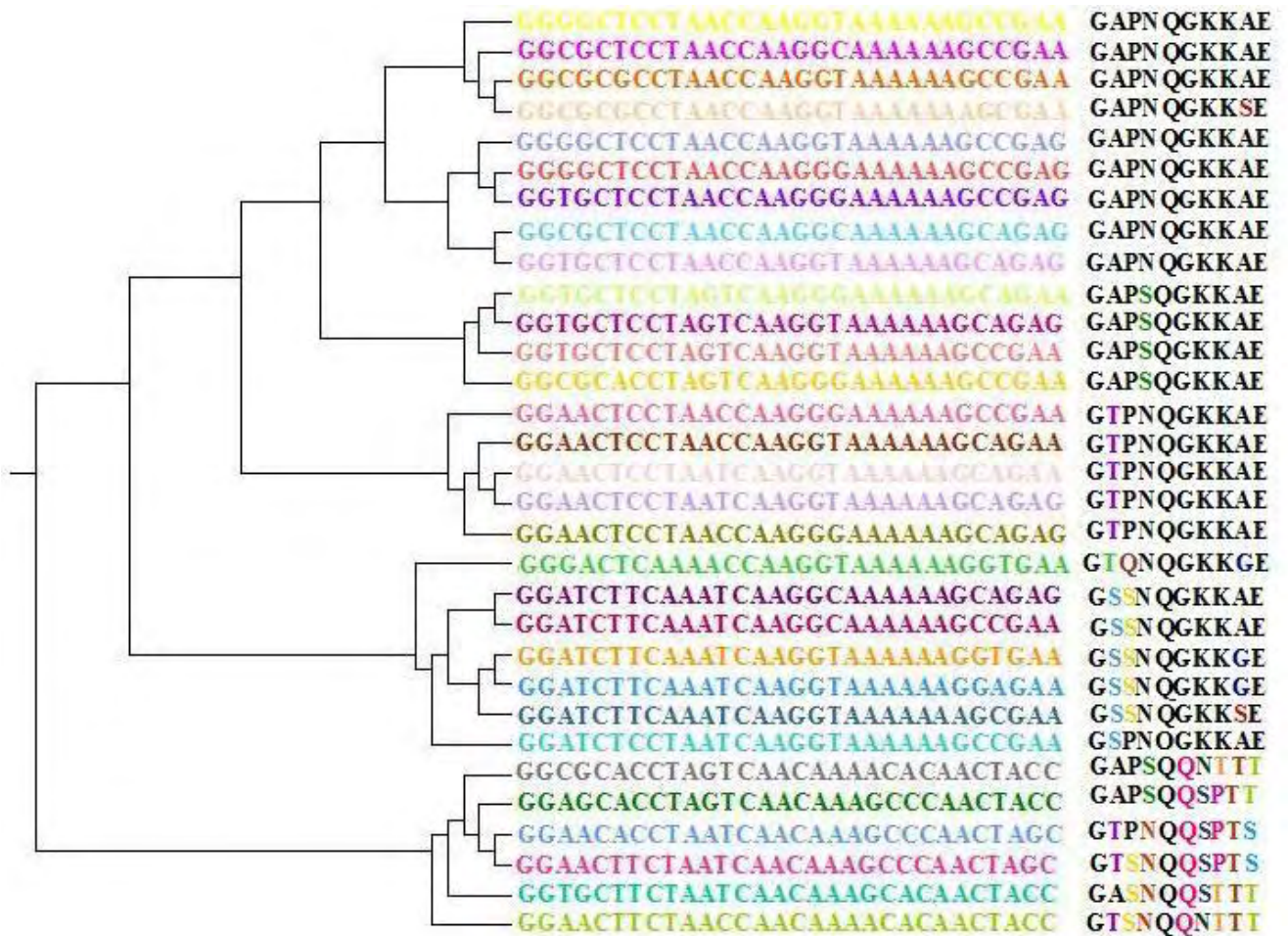
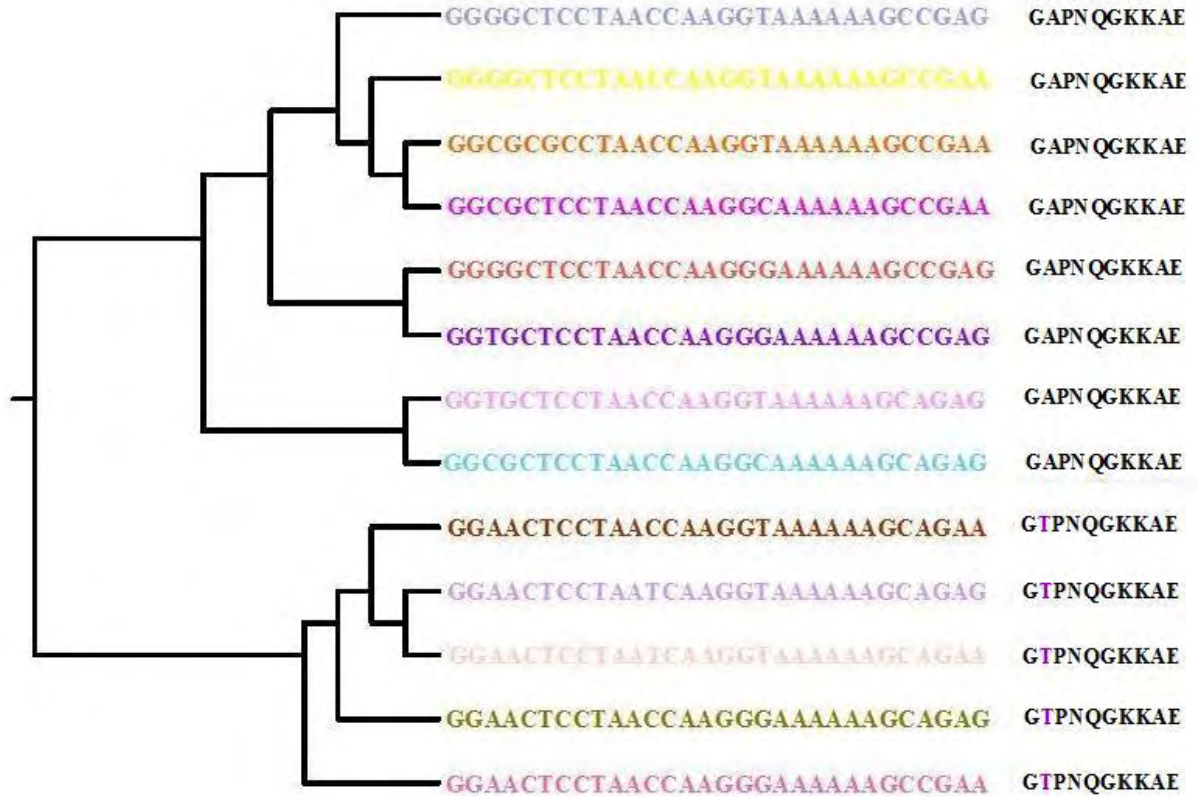
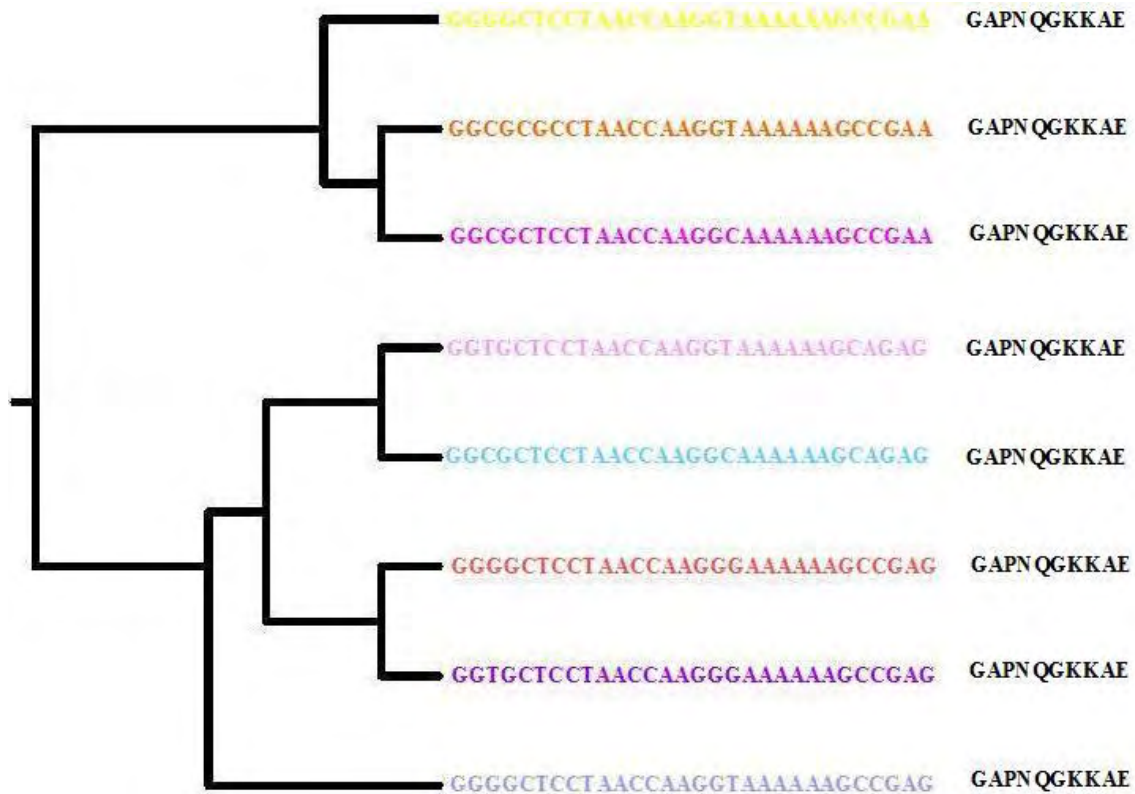


Figura 16.- Filograma por de la secuencia de nucleótidos de las variantes **GAPNQGKKAE** y **GTPNQGKKAE** de R2 (*ClustalW*). Cada color representa una variante, los aminoácidos correspondientes se muestran del lado derecho.



En la Figura 17 se muestra el filograma las secuencias de nucleótidos de **GAPNQGKKAE** (*ClustalW*), el cual, sugiere que **GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAG** es la secuencia más antigua y que dio origen al resto de las variantes encontradas hasta ahora.

Figura 17.- Filograma de las secuencias codificantes de la variante **GAPNQGKKAE** de R2 (*ClustalW*)

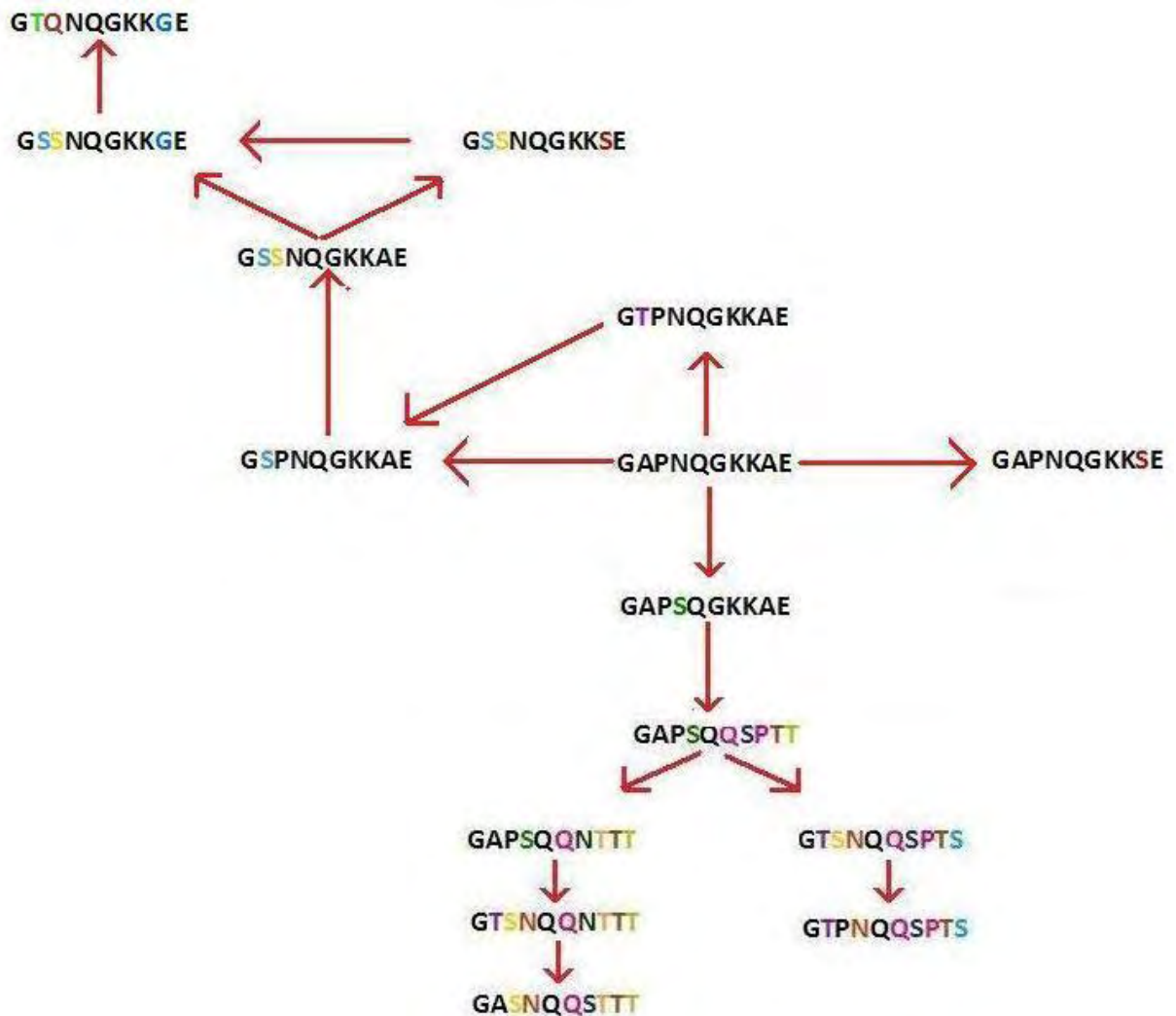


Se compararon las variantes de R2 siguiendo la hipótesis de que **GAPNQGKKAE** es la secuencia raíz de R2, encontrando que **GSPNQGKKAE**, **GTPNQGKKAE**, **GAPNQGKKSE** y **GAPSQGKKAE** sólo difieren en un aminoácido, mientras que **GSSNQGKKAE** difiere en dos; **GTQNQGKKGE**, **GSSNQGKKGE**, y **GSSNQGKKSE** difieren en tres; **GAPSQQNTTT** y **GAPSQQSPTT** difieren en seis; **GTPNQQSPTS** y **GASNQQSTTT** difieren en siete; **GTSNQQSPTS** y **GTSNQQNTTT** difieren en ocho.

Esto sugiere que **GSPNQGKKAE**, **GTPNQGKKAE**, **GAPNQGKKSE** y **GAPSQGKKAE** derivaron directamente de **GAPNQGKKAE**; mientras que **GSSNQGKKAE** evolucionó a través de **GSPNQGKKAE**; **GSSNQGKKGE** y

**GSSNQGKKSE** evolucionaron a través de **GSSNQGKKAE**. Cabe hacer notar que tanto **GSSNQGKKGE** y **GSSNQGKKSE** como **GSPNQGKKAE** y **GTPNQGKKAE** sólo difieren en un aminoácido en la misma posición, por lo que la posibilidad de que se hayan derivado una de otra no se descarta. El resto de las variantes difieren en más de un aminoácido de su secuencia adyacente, por lo que su origen es menos claro, de cualquier manera, se indica la ruta evolutiva más probable (Figura 18).

Figura 18.- Evolución de R2 a partir de **GAPNQGKKAE**. Cada variante de R2 difiere de la raíz en los aminoácidos marcados con diferente color.





## Discusión

Las adhesinas de algunos micoplasmas han sido caracterizadas como P1 de *M. pneumoniae*; MgPa de *M. genitalium*; GapA de *M. gallisepticum*; P40 de *M. agalactiae* y P97 de *M. hyopneumoniae*. Existen diferencias en el mecanismo empleado para la adhesión de los micoplasmas, así como en las proteínas involucradas<sup>23</sup>. La adhesina ciliar P97 de *M. hyopneumoniae*, se une a los glicolípidos sulfatados de las células ciliadas, permitiendo a la bacteria iniciar la colonización en el huésped y posteriormente la pérdida de cilios en el epitelio de la tráquea, bronquios y bronquiolos; predisponiendo a infecciones secundarias. Similarmente, la proteína P159 que reside en la superficie del micoplasma, se une a heparina al igual que P97, por lo que podría actuar como adhesina, lo cual sugiere que *M. hyopneumoniae* utiliza ambas proteínas para unirse a las células eucariotas<sup>49</sup>. La unión de *M. hyopneumoniae* al epitelio ciliar, involucra el secuestro de heparina, glicosaminoglicanos sulfatados, que sirven como sitios de unión universal para diversas proteínas de unión a heparina del huésped, incluyendo glicoproteínas de adhesión (vitronectina y fibronectina), inflamatorias (MCP-3, PF-4 y MIP-1 $\alpha$ ) e inmunomoduladoras (IFN $\gamma$ ) y FGF. Esta estrategia permite a la bacteria incrementar la invasión al epitelio mientras que inhibe la quimiotaxis inducida por quimiocinas<sup>55</sup>.

En la adhesina P97 la región responsable de la adhesión es la secuencia repetitiva R1 A/TKPE/VA/T651<sup>6, 21, 22, 23, 52, 53</sup>. El número mínimo de repeticiones requeridas, para la actividad funcional en la adherencia a los cilios, es de ocho<sup>52</sup>. La cepa J de *M. hyopneumoniae* tiene 9 copias de R1, sin embargo se han reportado cepas patógenas con más de 15 copias (0118285, 0117704, 0117577, IAF2355B01, IAF218601, IAF606900 y R659) el incremento en el número de repeticiones aumenta la afinidad a la heparina haciendo más apto a *M. hyopneumoniae* para su establecimiento, mantenimiento y diseminación<sup>48</sup>. El objetivo de este estudio fue caracterizar las regiones R1 y R2 de la adhesina P97 de *M. hyopneumoniae* mexicanos y determinar si difieren de los reportados en otros países. En este estudio realizamos un análisis de las 22 secuencias de *p97* disponibles en el *GenBank* (Apéndice III); sin embargo, no se consideraron las cepas PMS VNTAR y 7422 VNTAR, por tener errores en su secuencia a nivel de R1 y R2<sup>47</sup>. De acuerdo a las variantes reportadas en la literatura o en *GenBank*, las regiones repetitivas R1 y R2 varían en secuencia y en el número de repeticiones entre las diferentes cepas y contienen los

aminoácidos A/TKPE/VA/T y GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S respectivamente<sup>6, 22, 21, 52, 53</sup> (Apéndice V). De manera similar, en nuestro estudio encontramos variación en las regiones R1 y R2 de *p97* de *M. hyopneumoniae* mexicanos (Figura 10).

En la alineación por medio de *ClustalW*, se observaron regiones conservadas a lo largo de la secuencia de nucleótidos, sin embargo, también se observan regiones donde las bases difieren, así como huecos que reflejan variación del número de repeticiones de R1 y R2. Las regiones conservadas presentes en las secuencias del gen *p97* de *M. hyopneumoniae* pueden contribuir a formar el soporte para R1 y R2, se ha probado la participación de R1 en la adhesión y se ha sugerido que R2 podría ser utilizado como distractor para evadir al sistema inmune<sup>52</sup>.

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos a nivel de R1, describiéndose la variante nueva **AKLVA** en los aislados 1P97 y 79P97, mientras que el número de repeticiones en R1 fue de 4 a 17 copias. En el resto de las secuencias se observaron variantes de R1 ya reportadas, con 10 copias en 174P97 y 176P97, y con 11 copias en 185P97 y 292P97. Se ha reportado que la región R2 no interviene en la adhesión a las células ciliadas<sup>52</sup>; sin embargo la proteína se expresa durante la infección, y se ha reportado que ésta región es requerida junto a R1 para unirse a heparina lo cual sugiere una participación en el proceso<sup>48</sup>. Una alternativa es que posiblemente actúe como distractor de la respuesta inmune del huésped<sup>52</sup>. Las repeticiones en R2 constan de 10 aminoácidos; las secuencias reportadas en *GenBank* presentan variación entre cepas y el número varía de 3 a 6 repeticiones. En nuestro estudio, el *M. hyopneumoniae* mexicano 292P97 presentó 5 repeticiones con una nueva variante **GAPNQGKKSE** de R2. El resto de los *M. hyopneumoniae* mexicanos presentaron 5 repeticiones en R2 (1P97, 79P97, 174P97, 176P97, 185P97) con secuencias iguales a la 232 y a la U50901 previamente reportadas (Apéndice III).

Proteínas en diferentes eucariotes y procariotes que tienen repeticiones múltiples en tándem de longitud variable, se caracterizan por tener funciones de adhesión en diferentes células, como es el caso de la pertactina, proteína de membrana externa expresada en *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*<sup>56, 57, 58, 59, 60</sup>. De manera similar, como ocurre en R1 y R2 de *M. hyopneumoniae* y en la pertactina de *Bordetella*, la presencia del aminoácido prolina en estas repeticiones ha sido asociada a adhesión<sup>57</sup>. Cabe mencionar

que la nueva secuencia de R1, **AKLVA**, presente en los *M. hyopneumoniae* mexicanos 1P97 y 79P97 cambia dicho aminoácido en una repetición, aunque las 3 repeticiones restantes contienen prolina. La proteína de superficie de *Anaplasma marginale*, MPS1a, y la mucina de *Ehrlichia ruminantium*, están involucradas en la adhesión a receptores específicos de células de garrapatas y el huésped mamífero, estas proteínas contienen repeticiones en número variable, caracterizadas por su elevado contenido de serina/treonina (17.5/43.7 % y 40/43.9 % respectivamente)<sup>61, 62</sup>. *M. pulmonis* expresa la proteína VsaA que contiene dominios repetitivos que se cree están involucrados en las interacciones micoplasma-célula huésped estas repeticiones carboxilo terminal, han sido asociadas a la resistencia al complemento<sup>63</sup>. El análisis de las diferentes repeticiones reportadas, ejemplifican la importancia de las repeticiones en tándem y la presencia de algunos aminoácidos para la adhesión; el polimorfismo en las secuencia, así como la variación el número de repeticiones contribuyen a la diversidad de estas proteínas<sup>62, 63, 64</sup>.

La variación en la secuencia, así como en el número de repeticiones de R1 y R2 encontrado en *M. hyopneumoniae*, podría implicar la existencia de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune que facilite la persistencia del microorganismo produciendo infección crónica<sup>57</sup>. Por otra parte, la función de la adhesina debe ser preservada a pesar de los cambios en los aminoácidos, que podrían afectar la estructura de la proteína directamente o por un efecto conformacional en la región; por lo que debe estar sujeta a una alta presión de selección.

Las regiones R1 y R2 se pudieron haber originado por re-arreglos genómicos o recombinación; sin embargo los segmentos con repeticiones de A/T que son comunes en *M. hyopneumoniae* no siempre están asociados a re-arreglos genómicos, por lo que es probable que también estén relacionados a procesos de recombinación. Los micoplasmas en general presentan un genoma dinámico; esta inestabilidad puede afectar la expresión del gen y función de la proteína, por lo que estas bacterias patógenas deben contar con un loci de contingencia como R1 y R2 de P97, donde las repeticiones de A/T podrían tener una participación en recombinación o re-arreglos genéticos. La contracción o expansión de estas secuencias de repeticiones simples, durante la replicación del genoma, incrementa la variación genética de la población, lo que podría facilitar la evasión de la respuesta inmune del huésped porcino<sup>65</sup>.



Previamente, se han utilizado las regiones R1 y R2 de P97, así como otros genes con regiones repetitivas de *M. hyopneumoniae* con fines de tipificación a través de las técnicas VNTR, AFLP, RFLP y RAPD<sup>66</sup>. La variabilidad de R1 y R2 de P97 observada en este estudio y en otros, sugiere que es posible utilizar las regiones R1 y R2 para tipificar *M. hyopneumoniae* por las técnicas mencionadas o bien directamente por secuenciación del fragmento que incluye R1 y R2 como se hizo en este estudio.

Las repeticiones **AKPVA** y **AKPEA** son las más numerosas de R1 y al menos una copia de cada una está presente en los aislados reportados en *GenBank* (Apéndice III) y en las secuencias nacionales (Figura 12). Por otra parte, la repetición **GAPNQGKKAE** es la más numerosa y posiblemente ancestral de R2, sin embargo, no se encuentra en los aislados 20868-B, 40689-2, 20735-2, F19, R659 reportados en *GenBank* (Apéndice III) ni en la 292P97 de *M. hyopneumoniae* mexicano, donde se encontró la variante nueva **GAPNQGKKSE**. La variante **GAPNQGKKAE** se deriva de diferentes secuencias de nucleótidos, que podrían representar los segmentos más antiguos de donde se han derivado las otras variantes (Figura 12 y 13).

La secuencia de R1, **AKPVA**, es probablemente la más ancestral, considerando su frecuencia y presencia en las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* en *GenBank* y mexicanas, así como el análisis de los filogramas, mientras que en R2 es **GAPNQGKKAE**; resultando interesante que estas secuencias coexisten en las cepas J, ATCC25934, IAF-464-01, Mhp1 y 185P97, que forman el grupo más antiguo. Por otra parte, el 292P92 es muy similar a 185P97 solo varía en R2 en un aminoácido y forma parte del grupo ancestral. (Figura 11). El encontrar un *M. hyopneumoniae* mexicano, 185P97, con estas secuencias sugiere que en México existen *M. hyopneumoniae* ancestrales, intermedios como 1P97, 79P97, así como más recientes en evolución como 174P97 y 176P97.

Las secuencias de R1: **AKPVA** y **AKPEA** fueron observadas más frecuentemente en los *M. hyopneumoniae* existiendo nueve variantes en sus secuencias de nucleótidos para cada una de ellas hasta ahora. Debido a que de **AKPVA** se puedan derivar cinco variantes de R1 con un sólo aminoácido diferente, mientras que de **AKPEA** solo se pueden derivar dos variantes sugiere que **AKPVA** es la secuencia ancestral primaria de R1; mientras que el

análisis de sus nueve secuencias de nucleótidos reveló que **GCTAAACCAGTAGCA** podría ser la secuencia ancestral más primitiva.

Por otra parte, la secuencia **GAPNQGKKA**E de R2 es la que se encontró con mayor frecuencia en los aislamientos y puede ser codificada por ocho variantes de su secuencia de nucleótidos hasta ahora. Debido a que de **GAPNQGKKA**E se puedan derivar cuatro variantes de R2 con sólo un aminoácido diferente, sugiere que podría ser la secuencia ancestral primaria de R2; mientras que el análisis de sus ocho secuencias reveló que **GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAG** podría ser la secuencia ancestral más primitiva.

Es necesaria la caracterización de un número mayor de variantes de *M. hyopneumoniae*, así como la utilización de otros genes para obtener una mejor perspectiva de la evolución del microorganismo. Por otra parte, es necesario evaluar por ensayos de adhesión *in vitro* si existen diferencias en la capacidad de adhesión de las variantes de R1 y R2 de P97 de *M. hyopneumoniae*. El análisis de la estructura de la adhesina P97, así como de su función en la adherencia al epitelio respiratorio ciliado puede ayudar a proveer mayor información acerca de los mecanismos de patogénesis de *M. hyopneumoniae*.

## Conclusiones

### Variantes en secuencia de aminoácidos

En *GenBank* están reportadas las 7 secuencias diferentes de aminoácidos en R1: **AKPE**A, **AKP**E**T**, **TKP**V**A**, **AKN**K**P**, **AKP**V**A**, **VKP**V**A**, **AKP**V**G**. En dos secuencias mexicanas 1P97 y 79P97 se encontró una secuencia nueva de R1: **AKL**V**A**. Este descubrimiento cambia la secuencia conocida **A/TKPE/VA/T** a **A/TKP/LE/VA/T**.

En *GenBank* están reportadas 14 secuencias diferentes de aminoácidos en R2: **GAPNQGKKA**E, **GTPNQGKKA**E, **GSPNQGKKA**E, **GSSNQGKKG**E, **GAPSQGKKA**E, **GSSNQGKKA**E, **GTQNQGKKG**E, **GSSNQGKKS**E, **GAP**S**Q****N****T****T****T**, **GAP**S**Q****S****P****T****T**, **GTPNQSPTS**, **GAS****N****Q****S****T****T****T**, **GTSNQSPTS**, **GTSNQN****T****T****T**. En la muestra de 292P97 mexicana, se encontró la secuencia nueva de R2: **GAPNQGKKS**E. Este descubrimiento cambia la secuencia conocida **GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/TE/K/T/S** a **GA/E/S/TPN/SQG/QK/N/SK/T/PA/T/SE/K/T/S**.

### **Número de repeticiones**

En *GenBank* se han reportado *M. hyopneumoniae* con un número de repeticiones en R1 de: 4, 8, 9, 10, 11, 12, 15 y 17. Similarmente, en este estudio encontramos *M. hyopneumoniae* con 11, 10 y 4 repeticiones.

En *GenBank* se ha reportado *M. hyopneumoniae* con un número de repeticiones en R2 de: 3, 4, 5, 6; similarmente, en este estudio encontramos 5 repeticiones en R2 de todos *M. hyopneumoniae* mexicanos.

### **Variantes en la secuencia de nucleótidos**

En *GenBank* se han reportado 25 variantes en la secuencia de nucleótidos en R1. En este estudio encontramos 1 nueva secuencia de R1 en las muestras 1P97 y 79P97. En *GenBank* se han reportado 30 variantes en la secuencia de nucleótidos en R2. En este estudio encontramos una nueva secuencia de R2 en la muestra 292P97.

La secuencia de R1: **AKPVA** es probablemente la más ancestral y de las 9 secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, **GCTAAACCAGTAGCA** podría ser la secuencia más primitiva. Por otra parte, la secuencia **GAPNQGKKA**E es probablemente la más ancestral de R2 y de las 8 secuencias de nucleótidos que codifican para la misma **GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAG** podría ser la secuencia más primitiva.

## Bibliografía

---

- <sup>1</sup> Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev.* 2003; 83: 417–432.
- <sup>2</sup> Lemcke RM, Leach RH. Editor Gibbs BM. Methods for the identification of mycoplasmas. Identification methods for microbiologist. The society for applied bacteriology technical series No. 2. 1968; 125-136.
- <sup>3</sup> Minion FC, Adams C, Hsu T. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun.* 2000; 68:3056-3060.
- <sup>4</sup> Rivera JA, Cedillo ML, Gil C. Some biological features of Mollicutes. *Rev Latinoamericana Microbiol.* 2002; 44:53 – 57.
- <sup>5</sup> Hnатов LL, Keeler CL Jr, Tessmer LL, Czymmek K, Dohms JE. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-kilodalton protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun.* 1998; 66:3436-3442.
- <sup>6</sup> Zhang Q, Young TF, Ross RF. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun.* 1995; 63:1013–1019.
- <sup>7</sup> Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of “*Candidatus Mycoplasma haemofelis*”, “*Candidatus Mycoplasma haemomuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemonuris*”, “*Candidatus Mycoplasma haemosuis*” and “*Candidatus Mycoplasma wenyonii*”. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51:891-899.
- <sup>8</sup> Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62:1094–1156.
- <sup>9</sup> International Committee on Systematic Bacteriology—Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. Minutes of the meetings, 21 and 28 July 1998, Sydney, Australia. *Int J Syst Bacteriol.* 2000; 50:1393–1397.

- 
- <sup>10</sup> Stemke GW, Laigret F, Grau O, Bove JM. Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42:220-225.
- <sup>11</sup> Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, Cleary BJ, Swartzell SM, Mahairas GG. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Strain 232, the Agent of Swine Mycoplasmosis. *J Bacteriol.* 2004; 186:7123-7133.
- <sup>12</sup> Vasconcelos AT, Ferreira HB , Bizarro CV, Bonatto SL, Carvalho MO, Pinto PM, *et al.* Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J Bacteriol.* 2005; 87:5568-5677.
- <sup>13</sup> Taylor DJ. Pig diseases. Enzootic pneumonia. 7<sup>th</sup> Edition. Great. Britain, St. Edmundsbury Press Ltd. 1999; 180-190.
- <sup>14</sup> Ross RF. Mycoplasma Disease. From Diseases of Swine. 8<sup>th</sup> Edition. Iowa State University Press. 2000; 495-501.
- <sup>15</sup> Caron J, Ouardani M, Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 Genes. *J Clin Microbiol.* 2000a; 38:1390–1396.
- <sup>16</sup> Caron J, Sawyer N, Ben abdel Moumen B, Cheikh Saad Bouh K, Dea S. Species-specific monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000b; 7:528–535.
- <sup>17</sup> Chung TL, Farh L. Chen YL, Shiuan D. Molecular cloning and characterization of a unique 60 kDa/72 kDa antigen gene encoding enzyme I of the phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system (PTS) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Biochem.* 2000; 128: 261-269.

- 
- <sup>18</sup> Chen YL, Wang SN, Yang WJ, Chen YJ, Lin HH, Shiuan D. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun.* 2003; 71:1155–1160.
- <sup>19</sup> Schmidt JA, Browning GF, Markham PF. *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein is a lipolytic enzyme with a preference for shorter-chain fatty acids. *J Bacteriol.* 2004; 186:5790–5798.
- <sup>20</sup> Meens J, Selke M, Gerlach GF. Identification and immunological characterization of conserved *Mycoplasma hyopneumoniae* lipoproteins Mhp378 and Mhp651. *Vet Microbiol.* 2006; 116:85–95.
- <sup>21</sup> Hsu T, Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun.* 1998; 66:4762-4766.
- <sup>22</sup> Zhang Q, Young TF, Ross RF. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect Immun.* 1994a; 62:4367-4373.
- <sup>23</sup> Whithear KL and Browning GF. *Mycoplasma*. Edited by Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 3<sup>th</sup> Edition. Iowa. 2004; 397-414.
- <sup>24</sup> Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J, Minion FC. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infect Immun.* 2004; 72:2791-2802.
- <sup>25</sup> Kim MF, Heidari MB, Stull SJ, McIntosh MA, Wise KS. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect Immun.* 1990; 58:2637-2643.
- <sup>26</sup> Vicca J, Stakenborg T, Maesa D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol.* 2003; 97:177–190.

- 
- <sup>27</sup> Okada M, Asai T, Futo S, Mori Y, Mukai T, Yazawa S, Uto T, *et al.* Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.* 2005; 105:251–259.
- <sup>28</sup> Ameri-Mahabadi M, Zhou EM, Hsu WH. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17:61–64.
- <sup>29</sup> Ameri-Mahabadi M, Zhou EM, Hsu WH. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *J Vet Diagn Invest.* 2006; 18:198–201.
- <sup>30</sup> Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli*-expressed P46 and P65 membranous proteins for specific immunodetection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of infected pigs. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10:459-68.
- <sup>31</sup> Baumeister AK, Runge M, Ganter M., Feenstra AA, Delbeck F, Kirchhof H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1984-1988.
- <sup>32</sup> Moorkamp L, Nathues H, Spergser J, Tegeler R, Beilage E. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *Vet J.* 2007. Article in press.
- <sup>33</sup> Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest.* 1999; 11:246–251.
- <sup>34</sup> Kurth KT, Hsu T, Snook ER, Thacker EL, Thacker BJ, Minion FC. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J Vet Diagn. Invest.* 2002; 14:463–469.

- 
- <sup>35</sup> Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, *et al.* Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet Microbiol.* 2004; 102:55–65.
- <sup>36</sup> Stipkovits L, Miller D, Glavits R, Fodor L, Burch D. Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can J Vet Res.* 200; 65:213-222.
- <sup>37</sup> Vicca J, Maes D, Jonker L, de Kruif A, Haesebrouck F. Efficacy of in-feed medication with tylosin for the treatment and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *Vet Rec.* 2005; 156:606-610.
- <sup>38</sup> Carrou JL, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon A V. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:959–1966.
- <sup>39</sup> Tzivara A, Kritas SK, Bourrie AR, Alexopoulos C, Kyriakis SC. Efficacy of an inactivated aqueous vaccine for the control of enzootic pneumonia in pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Rec.* 2007; 160:225-229.
- <sup>40</sup> Chen JR, Liao CW, Simon JT, Weng M, Weng CN. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion with *Pseudomonas* exotoxin: in vivo evaluation of specific IgG response in mice and pigs. *Vet Microbiol.* 2001; 80:347-357.
- <sup>41</sup> Thurmond MC, Holmberg CA, Luiz DM. Evaluation of a digitonin disk assay to discriminate between acholeplasma and mycoplasma isolates from bovine milk. *Cornell Vet.* 1989; 79:71-81.
- <sup>42</sup> Chen AY, Fry SR, Faulkner JF, Daggard G, Mukkur TKS. Evaluation of the immunogenicity of the P97R1 adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae* as a mucosal vaccine in mice. *J Med Microbiol.* 2006; 55:923-929.



- 
- <sup>43</sup> Rochedo F, Nunes A, Dellagostin OA. 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. *Vaccine*. 2006; 24:5734-5743.
- <sup>44</sup> Friis NF. Some recommendations concerning the primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. *J Nordisk Vet Medicin*. 1975; 27: 337-339.
- <sup>45</sup> Divecchia L, Somerson NI. Tetrazolium Reduction as a Measure of Metabolic Activity for Glass-Adherent *Mycoplasma pneumoniae*. *Applied microbiol*. 1973; 26:298-302.
- <sup>46</sup> Gopalkrishna V, Verma H, Kumbhar NS, Tomar RS, Patil PR. Detection of mycoplasma species in cell culture by PCR and RFLP based method: Effect of BM-cyclin to cure infections. *Indian J Med Microbiol*. 2007; 25:364-8.
- <sup>47</sup> de Castro LA, Rodrigues T, Satomi S, Ramenzoni M, Deon J, Zaha A *et al*. Variable number of tandem amino acid repeats in adhesion-related CDS products in *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vet Microbiol*. 2006; 116:258–269.
- <sup>48</sup> Jenkins C, Wilton JL, Minion FC, Falconer L, Walker MJ, Djordjevic SP. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun*. 2006; 74:481-487.
- <sup>49</sup> Burnett TA, Dinkla K, Rohde M, Chhatwa GS, Uphoff C, Srivastava M, *et al*. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Molec Microbiol*. 2006; 60: 669–686.
- <sup>50</sup> Zhang Q, Young TF, Ross RF. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun*. 1994b; 62:1616–22.
- <sup>51</sup> Hsu T, Artiushin S, Minion FC. Cloning and functional analysis of the p97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Bacteriol*. 1997; 179:1317-1323.

- 
- <sup>52</sup> Wilton JL, Scarman AL, Walker MJ, Djordjevic SP. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiol.* 1998; 144:1931-1943.
- <sup>53</sup> Adams C, Pitzer J, Minion FC. In vivo expression analysis of the p97 and p102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun.* 2005; 73:7784–7787.
- <sup>54</sup> Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edition, ed. Clod Spring Harbor Laboratoy, USA, 1989.
- <sup>55</sup> Duensing TD, Wing JS, van Putten JP. Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. *Infect Immun.* 1999; 67:4463-4468.
- <sup>56</sup> Williamson MP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J.* 1994; 297:249-260.
- <sup>57</sup> Boursaux-Eude C , Guiso N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 2000; 68:4815-4817.
- <sup>58</sup> Register KB. Comparative sequence analysis of *Bordetella bronchiseptica* pertactin gene (*prn*) repeat region variants in swine vaccines and field isolates. *Vaccine.* 2004; 23: 48–57.
- <sup>59</sup> Shin E-K, Jung R, Hahn T-W. Polymorphism of pertactin gene repeat regions in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs. *J Vet Med Sci.* 2007; 69:771-774.
- <sup>60</sup> Chen R, Schmidmayr W, Kramer C, Chen-Schmeisser U, Henning U. Primary structure of major outer membrane protein II\* (ompA protein) of *Escherichia coli* K-12. *Proc Nati Acad Sci.* 1980; 77:4592-4596.
- <sup>61</sup> de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet Microbiol.* 2003; 91:265–283.

---

<sup>62</sup> de la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Barbet AF, Blouin EF, Kocan KM. Adhesion of outer membrane proteins containing tandem repeats of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (*Rickettsiales: Anaplasmataceae*) to tick cells. *Vet Microbiol.* 2004; 98:313–322.

<sup>63</sup> Simmons WL, Denison AM, Dybvig K Resistance of *Mycoplasma pulmonis* to complement lysis is dependent on the number of Vsa tandem repeats: shield hypothesis. *Infect Immun.* 2004; 72:6846-51.

<sup>64</sup> Kassai-Jäger E, Ortutay C, Tóth G, Vellai T, Gáspári Z. Distribution and evolution of short tandem repeats in closely related bacterial genomes. *Gene.* 2007. Article in press.

<sup>65</sup> Mrázek J. Analysis of distribution indicates diverse functions of simple sequence repeats in mycoplasma genomes. *Mol. Biol. Evol.* 2006; 23:1370–13.

<sup>66</sup> Stakenborg T, Vicca J, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F, Butaye P. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods.* 2006; 66:263-75.

## APÉNDICE I

### Protocolo de extracción de ADN por método de CTAB/Fenol:

1.- Se resuspende el sobrenadante del tejido pulmonar homogenizado en 1 ml de TE en un tubo de 1.5 ml. Se centrifugará por 5 minutos a 10 000 g.

2.- Se resuspende la pastilla en 567  $\mu$ l de TE buffer hasta quedar homogénea; se le adiciona 30  $\mu$ l de SDS al 10% y 1.5  $\mu$ l de proteinasa K<sup>v</sup> (40mg/ml), se mezcla suavemente en vortex e incuba a 37 °C durante 1 hora.

3.-Se adiciona 100  $\mu$ l de 5M NaCl<sup>w</sup> y 80  $\mu$ l de sol. CTAB/NaCl, se mezcla e incuba a 65 °C/10 minutos en un baño María.

Con este paso comienza a remover polisacáridos y otras macromoléculas contaminantes.

4.- Se adiciona un volumen igual de Cloroformo/alcohol isoamílico<sup>x</sup>, se mezcla y centrifuga por 5 min a 10 000 g. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo; si se dificulta se remueve primero con un palillo estéril la capa de interfase.

5.- Se adiciona un volumen igual de Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcla y centrifuga por 5 min a 10 000 g. Se remueve la interfase si es necesario.

6.- Se adiciona 600  $\mu$ l de isopropanol<sup>y</sup>, se mezcla suavemente y se deja precipitar el ADN. Se transfiere el precipitado, agregando 1 ml de etanol al 70% para su lavado. Se seca a temperatura ambiente por 12 hrs.

Se centrifuga por 3-5 min a 10 000 g para obtener un rápido precipitado.

7.- Finalmente se resuspende la pastilla en 50-100  $\mu$ l de TE dependiendo del tamaño y se refrigera el ADN.

---

<sup>v</sup> Invitrogen.

<sup>w</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>x</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>y</sup> J.T. Baker.

## APÉNDICE II

Soluciones:

### **Cloruro de Sodio 5M (NaCl)<sup>z</sup>**

292g NaCl

Disolver en 1,000 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave

### **Buffer TAE: Tris- ácido acético-Etilen dinitrilo tetra acetato disódico (EDTA)<sup>aa</sup>**

24.2 g Tris base

5.71 ml Ácido acético glacial (0.2M) (CH<sub>3</sub>COOH)

37.2 g EDTA (NaC<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)

Disolver en 1, 000 ml de agua destilada y esterilizar en autoclave

### **Gel de agarosa**

Disolver y calentar agarosa en buffer TE para una solución al 1%.

### **Solución de Bromuro de Etidio<sup>bb</sup> 10mg/ml**

### **Solución de CTAB/NaCl**

Disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada

Adicionar 10 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)<sup>cc</sup>

Mezclar a 65° C en baño María

Ajustar volumen final a 100 ml

Esterilizar en autoclave

### **Fenol equilibrado<sup>dd</sup>**

Temporizar el fenol a temperatura ambiente

Añadir 8-hidroxiquinoleína hasta una concentración final de 0.1% (0.1 g por cada 100 ml).

Adicionar un volumen de Tris-HCl 1 M pH 8, agitando constantemente hasta que el fenol alcance un pH cercano a 8.

Cuando esté equilibrado el fenol, retirar la fase acuosa (3-4 h) y adicionar un volumen de Tris-HCl 0.1 M hasta que el fenol tenga un pH de 8.

Almacenar en oscuridad con una capa acuosa de Tris-HCl 0.1 M más 2% de β-mercaptoetanol, pH 8 a 4° C.

### **Sulfato Dodecil de Sodio (SDS)<sup>ee</sup> 10% pH 7.2**

---

<sup>z</sup> J.T. Baker.

<sup>aa</sup> J.T. Baker.

<sup>bb</sup> Researchs Organics.

<sup>cc</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>dd</sup> SIGMA Aldrich.

Disolver 100g de SDS en 900 ml de H<sub>2</sub>O

**Cloroformo<sup>ff</sup>-Alcohol Isoamílico<sup>gg</sup>**

Mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

**Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico**

Mezclar 25 partes de fenol, 24 de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

**TRIS 1M<sup>hh</sup>**

Para preparar 200ml tomar 24.23 g de TRIS Ultra-Pure<sup>TM ii</sup>, disolver en 200ml de H<sub>2</sub>O y ajustar el pH a 8 con un potenciómetro.

**EDTA 0.5M**

Para 200ml, disolver 37.22g de EDTA<sup>jj</sup>, en 200ml de H<sub>2</sub>O y ajustar el pH con un potenciómetro.

**TRIS-Acetato-EDTA 50X (TAE)**

242g de TRIS Ultra-Pure<sup>TM</sup>, 51.1 ml de ácido Acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M  
pH 8

**TRIS-Acetato-EDTA (TE)**

Para preparar 1000μl, agregar 10μl de solución TRIS 1M pH 8 y 2μl de EDTA 0.5M  
pH 8.5; aforar a 1000μl (998μl) con H<sub>2</sub>

---

<sup>ee</sup> SIGMA Aldrich.

<sup>ff</sup> J.T. Backer.

<sup>gg</sup> J.T. Backer.

<sup>hh</sup> Invitrogen.

<sup>ii</sup> Invitrogen.

<sup>jj</sup> J.T. Backer

**APÉNDICE III**

<b>Cepas <i>M. hyopneumoniae</i></b>	<b>No. de Acceso Genbank</b>	<b>País de origen</b>
<b>232</b>	<b>AE0117332</b>	<b>EUA</b>
<b>J</b>	<b>AE017243</b>	<b>Brasil</b>
<b>ATCC25934</b>	<b>AY512905</b>	<b>Brasil</b>
<b>F19</b>	<b>AY380565</b>	<b>China</b>
<b>Mhp1</b>	<b>U27294</b>	<b>EUA</b>
<b>R659</b>	<b>AY380564</b>	<b>China</b>
<b>AY957500 ciliary adhesin</b>	<b>AY957500</b>	<b>Australia</b>
<b>U50901 ciliary adhesin</b>	<b>U50901</b>	<b>EUA</b>
<b>01-18285</b>	<b>AY512901</b>	<b>Canadá</b>
<b>01-17704</b>	<b>AY512900</b>	<b>Canadá</b>
<b>01-17577</b>	<b>AY512899</b>	<b>Canadá</b>
<b>IAF-DM9827</b>	<b>AY512898</b>	<b>Canadá</b>
<b>IAF-2355-B-01</b>	<b>AY512897</b>	<b>Canadá</b>
<b>IAF-2186-01</b>	<b>AY512896</b>	<b>Canadá</b>
<b>IAF-669-00</b>	<b>AY512895</b>	<b>Canadá</b>
<b>20735-2</b>	<b>AY512902</b>	<b>Canadá</b>
<b>7448</b>	<b>AE017244</b>	<b>Brasil</b>
<b>IAF-464-01</b>	<b>AY512894</b>	<b>Canadá</b>
<b>20868-B</b>	<b>AY512903</b>	<b>Canadá</b>
<b>40689-2</b>	<b>AY512904</b>	<b>Canadá</b>
<b>PMS VNTAR</b>	<b>DQ3864751</b>	<b>Brasil</b>
<b>7422 VNTAR</b>	<b>DQ3864761</b>	<b>Brasil</b>
<b>232 (mhp494)</b> p110 proteína de membrana	<b>AAV27918</b>	<b>EUA</b>
<b>J (MHJ0212)</b>	<b>NC_007295</b>	<b>EUA</b>
<b>J y 232 (mhprRNA-16S)</b>	<b>NC_006360</b>	<b>EUA</b>
<b>232 (pr1)</b>	<b>NC_006360</b>	<b>EUA</b>
<b>Mhp Veracruz 1 P97</b>	<b>EU395827</b>	<b>México</b>
<b>Mhp Jalisco 79 P97</b>	<b>EU395828</b>	<b>México</b>
<b>Mhp Jalisco 176 P97</b>	<b>EU395829</b>	<b>México</b>

<b>Mhp Jalisco 174 P97</b>	<b>EU395830</b>	<b>México</b>
<b>Mhp Michoacan 292 P97</b>	<b>EU395831</b>	<b>México</b>
<b>Mhp Puebla 185 P97</b>	<b>EU395832</b>	<b>México</b>

#### **APÉNDICE IV**

##### **Nomenclatura de aminoácidos**

<b>A</b>	Alanina
<b>V</b>	Valina
<b>L</b>	Leucina
<b>I</b>	Isoleucina
<b>P</b>	Prolina
<b>M</b>	Metionina
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>W</b>	Triptofano
<b>G</b>	Glicina
<b>S</b>	Serina
<b>T</b>	Treonina
<b>C</b>	Cisteina
<b>N</b>	Asparagina
<b>Q</b>	Glutamina
<b>Y</b>	Tirosina
<b>D</b>	Ácido Aspartico
<b>E</b>	Ácido Glutamico
<b>F</b>	Lisina
<b>R</b>	Arginina
<b>H</b>	Histidina



## APÉNDICE V

Secuencia de nucleótidos R1 y R2 del gen *p97* de la adhesina de *Mycoplasma hyopneumoniae* GenBank (números de acceso en apéndice III). Cada color representa las variantes en la secuencia de nucleótidos.

### 232 *M. hyopneumoniae*

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTGGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TGCCCTAGCCCCAGCAGCAAAAACCGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGGCTAAACCAGAAAACAACAAAACC  
AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCA  
AAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACCCAGTAG  
CGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACCCAGTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGA  
AGACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACA  
CCGGAATTAATGTATTTTGTAGACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAGAAAATAATAAGGAAC  
TAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAGTCAAGGTAAGTCAAGGTAAGTCAAGG  
ACTTAGCCACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCA  
GGTAAAAAAGCAGAAAGGCGCGCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGAAAAAAG  
CAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAAAGCCCACTACCGA

### J *M. hyopneumoniae*

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCAAAAACCTGAAGCAGCTAAACCT  
TGAAACAACAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCA  
AAACCAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATT  
TCCCAATGGCTTTTGTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAAT  
TAATGTATTTTGTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAAGTATAGATAAA  
ACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAGTCAAGGTAAGTCAAGGTAAGTCAAGGTAAGT  
ACCAATGATGACCGAGGGATCTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAA  
AGCCGAAAGGCGACCTAGTCAAGGGAAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAAGCCGAAAGG  
GCACCTAGTCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGTGTCTTCAATCAACAAAGCACAACCTACCGA

### R659 *M. hyopneumoniae*

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACC  
AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGGCT  
AAACCTGAAGCAGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAG  
CAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCCAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATTAT  
AAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTGTAGAACTAG  
TTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAAGTATAGACAAAACCTGTTTTAAATCTTCAATA  
TCAATTCAGGAAGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGA  
TCTTCAAAATCAAGGTAAAAAAGGTGAAAGGAACTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCAGAGGGTGTCTCCTAGTC  
AAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTTCTAACCAACAAAACACAACCTACCGA

### F19 *M. hyopneumoniae*

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACC  
AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACCCAGTAGCGGCT  
AAACCTGAAGCAGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAG  
CAGCAAAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCCAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATTAT  
AAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTGTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAA  
GAACAAAAATAATAAAGGAAGTATAGACAAAACCTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGT  
AGCTAGTGATCAATATCAGAAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAAATCAAGGTAAAAA  
GGTGAAAGGAACTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCAGAGGGTGTCTCCTAGTCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAA  
CTTCTAACCAACAAAACACAACCTACCGA

### Mhp1 *M. hyopneumoniae*

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACC

GGAAGCAGCAAAAACAGTAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCAGCTAAACCGGAAGCAGCA  
AAACCAGTTGCTGCCAAGCCAGAAAGCGCAAAAACAGTAGCAGCAAAAACAGTTGCTACTAATACTAATA  
CTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTA  
TAAATTAGAAATATACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAATA  
GTTTCATCAAAGCGAGTATGAAGACCAAAAAATAAATAAGGAAGTATGATAAAAAGTGTTTTAAATCTTCAAT  
ATCAATTCCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGG  
GACTCAAAAACCAAGGTAAAAAGGTGAAAGAACTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGT  
CAAGGGAAAAAGCAGAAAGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAGCCGAAAGAACACCTAATCAACAAAGCC  
CAACTAGCGA

**AY957500 ciliary adhesin *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCGCGCAAAACCGGAAGCGGTAAAACAGTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACC  
TGAAGCAGCAAAAACAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACAGTAGCAGCTAAACCGGAAGCAGCA  
AAACCAGTTGCTGCCAAGCCAGAAAGCGCAAAAACAGTAGCAGCAAAAACAGTTGCTACTAATACTAATA  
CTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATA  
TACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAAGTACTTCATCAAAGC  
GAATATGAAGAACAATAAATAAAGGAAGTATGATAAAAAGTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGG  
AAATCAAGGTAAGTACTAGTGAACAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAATCA  
AGGTAAAAAGGAGAAAGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAACCAAGGTAAAAAA  
GCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAGGGCGCACCTAGTCAACAAAACACAACCTACCGA

**20735-2 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACC  
AGTTGCAAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGGGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACAGTTGCTACT  
AATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAG  
AATACTACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAAGTACTTCATCA  
AAGCGAGTATGAAGACCAAAAAATAAATAAGGAAGTATGATAAAAAGTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTC  
CAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGGACTCAA  
ACCAAGGTAAAAAGGTGAAAGAACTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAAAGGTGCTCCTAGTCAAGGTAA  
AAAAGCCGAAAGAACACCTAATCAACAAAGCCCAACTAGCGA

**20868-B *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCGGCTAAACCTGAAACACAAAACAGTTGCTACT  
AATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTA  
GTTATAAATTAGAAATATACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGA  
ACTAGTTTCATCAAAGCGAATATGAAGAACAATAAATAAGGAAGTATGATAAAAAGTGTTTTAAATCTT  
CAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCG  
AGGGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGGAAAAAGCCGAGGGTGCTCC  
TAGTCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAAGAACTTCTAACCAACAA  
AACACAACCTACCGA

**IAF-DM9827 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TGCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAAACAGTAGCGGCTAAAAATAAACCAAAAAGACTATTTCCCA  
ATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAAATATACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATG  
TATTTTLAGAAGTACTTCATCAAAGCGAATATGAAGAACAATAAATAAGGAAGTATGATAAAAAGTGT  
TTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCA  
ATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGGAAAAAGCCG  
AGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAAGAACTTCT  
AACCAACAAAACACAACCTACCGA

**IAF-464-01 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAAACC  
AGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCA  
ATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAAATATACTGACGAAAAATAAATAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATG

TATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAATAATAAAGGAAC TAGATAAAAACGT  
TTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAACTTAGCCACCCA  
ATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAAGCCGAA GGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAAGCAG  
AGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAAC TACCGA

**40689-2 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACC  
AGTTGCA GCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCA GCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCA GCT  
AAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCA GCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCT ACTAATACTGGCT  
TTTCTCTTGCAAATAAACCAAAAGAACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATATAAATTAGAATATACTGA  
CGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTAT  
GAAGACCAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCA  
AGGTAAC TAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGACTCAAACCAAGGTAA  
AAAAGGTGAA GGAACCTCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAG GGTGCTCCTAGTCAAGGGAAAAAAGCAGAA  
GGAACCTCTAACCAAGGAAAAAGCCGAA GGAACACCTAATCAACAAAGCCCAACTAGCGA

**U50901 ciliary adhesin *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTGGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TGCTCAGCCCCAGCAGCAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAACAACCAAACC  
AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCA GCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCA  
AAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAG  
CGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCT ACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGA  
AGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACA  
CCGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAGAAATAATAAAGGAAC  
TAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGACCAATATCAGAA  
ACTTAGCCACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCTTAACCAA  
GGTAAAAAAGCAGAAAGCGCGCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA GGAACCTCTAACCAAGGAAAAAAG  
CAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAAGCCCAACTACCGA

**01-18285 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCA GCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCT ACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAAGCAGAG GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA GGAACCTCTAACCAACAAAACACAA  
CTACCGA

**01-17704 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCA GCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTTGCT ACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTGTATATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAAGCAGAG GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA GGAACCTCTAATCAACAAAGCCCAA  
CTAGCGA

**01-17577 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCA GCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG

CAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAAC'TTCTAACCAACAAAACACAA  
CTACCGA

**IAF-2355-B-01 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAATAAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAAC'TTCTAACCAACAAAACACAA  
CTACCGA

**IAF-2186-01 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAATAAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAAC'TTCTAACCAACAAAACACAA  
CTACCGA

**IAF-669-00 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAATAAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACC  
AGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCT  
AAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAG  
CAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTTGCTACTAATAC  
TGGCTTTTCACTTACAAATAAACCCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATAT  
ACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCG  
AGTATGAAGAACAATAAATAAAGGAACTAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGA  
AGTCAAGGTAGCTAGTGATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAA  
GGCAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAAC'TTCTAACCAACAAAACACAA  
CTACCGA

**7448 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAATAAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACC  
AGTAGCAGCAAAACCAGTTGCAGCAAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCT  
AAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAA  
ATAAACCAAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACCTGACGAAAAATAAATT  
AAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTTAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAATAA  
ATAAATAAAGGAACTAGACAAAACCTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAGCTAGTG  
ATCAATATCAGAAGCTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAGCAGAGGG  
GGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAGGGTGCTCCTAACCAAGGGAAAAAGCCGAGGGTGCTCCTAGT  
CAAGGTAAAAAGCCGAAGGAAC'TTCTAACCAACAAAACACAACTACCGA

**ATCC25934 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCAAAACCTGAAGCAGCTAAACC  
TGAAACAACAAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCAGTAGCAGCAGCAAACCAGTAGCAGCA  
AAACCAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAGAAGACTATT  
TCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAAT  
TAATGTATTTTLAGAAGTAGTTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAATAATAAGGAAGTAGATAAA  
ACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAAACTTAGCC  
ACCAATGATGACCGAGGGATCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAA  
AGCCGAAAGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAAGCCGAAAGGC  
GCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACCGA

**>PMS VNTAR *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCAGAACTACTAAACC  
TGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCCTGAAGCAGCT  
AAACCTGTAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACCAGTAG  
CAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACCAGTAGCACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAGA  
AGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACA  
CCGGAAATTAATGTATTTTLAGAAGTAGTTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAATAATAAGGAAC  
TAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAA  
ACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGSGAACTCCTAATCAAGGTAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAATCAA  
GGCAAAAAAGCCGAAAGGCACTCCTAATCAAGGGAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAATAAGCCGAAAGGC  
CACCTCAACAAAGCACAACCTACCGA

**>7422 VNTAR *Mhp***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACC  
TGTAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCTAAACCTGTAGCAGCT  
AAACCAGAAGCAGCTAAACCTGTAACTAATACTAATACTAATGCTAAACCTGTAGCACTAATACTAATA  
CTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATT  
AGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAAGTAGTTTCAT  
CAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAATAATAAGGAAGTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAAT  
TCCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAGGGATCTCC  
TAATCAAGGTAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAATCAAGGCAAAAAAGCCGAAAGGCGCACCTAGTCAAGGG  
AAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAAGCCGAAAGGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCAG  
AGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACCGA

**Secuencia de nucleótidos R1 y R2GenBank (números de acceso en apéndice III)**

**Jp97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCAGTAGCAGCAAAACCTGAAGCAGCTAAACC  
TGAAACAACAAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCAGTAGCAGCAGCAAACCAGTAGCAGCA  
AAACCAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAGAAGACTATT  
TCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAAT  
TAATGTATTTTLAGAAGTAGTTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAATAATAAGGAAGTAGATAAA  
ACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAAACTTAGCC  
ACCAATGATGACCGAGGGATCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAA  
AGCCGAAAGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCCGAAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAAGCCGAAAGGC  
GCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACCGA

**1p97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGCTAAACCTGAAGCAGCAAACC  
AGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAGAAGACTAT  
TTCCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAA  
TTAATGTATTTTLAGAAGTAGTTTCATCAAAGCGAGTATGAAGACCAAAAAATAATAAGGAAGTAGATAA  
AACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAC TAGTGAACAATATCAGAAACTTAGC

CACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAA  
AAGCAGAAAGGCGCGCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGG  
AGCACCTAGTCAACAAAGCCCAACTACCGA

**79p97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAATAAAAGGTATAT  
TACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCT  
AGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTAT  
TTCCAATGGCTTTTAGTTATAAATTAGAATATACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAA  
TTAATGTATTTTAGAAGTACTTCAATCAAGGAGTATGAAGACCAAAAAATAAAGGAACCTAGATAA  
AACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGC  
CACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAA  
AAGCAGAAAGGCGCGCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGG  
AGCACCTAGTCAACAAAGCCCAACTACCGA

**174p97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAATAAAAGGTATAT  
TGCCTCAGCCCCAGCGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGCTAAACCAGAAGCGCTAAACCT  
AGTAGCAGCTAAACCAGAAGCGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCAGCT  
AAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAC  
CAAAAGAAGACTATTTCCAATGGCTTTTAG  
TTATAAATTAGAATATACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAA  
CTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGACCAAAAAATAAAGGAACCTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTC  
AATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGA  
AGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAAGGCGCGCT  
AACCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAA  
GCCCAACTACCGAATTACTATACT

**176p97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAATAAAAGGTATAT  
TGCCTCAGCCCCAGCGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGCTAAACCAGAAGCGCTAAACCT  
AGTAGCAGCTAAACCAGAAGCGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCAGCT  
AAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAC  
CAAAAGAAGACTATTTCCAATGGCTTTTAG  
TTATAAATTAGAATATACTGACGAAAAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAA  
CTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGACCAAAAAATAAAGGAACCTAGATAAAACTGTTTTAAATCTTC  
AATATCAATTCAGGAAGTCAAGGTAAGTACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGA  
AGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAAGGCGCGCT  
AACCAAGGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGAGCACCTAGTCAACAAA  
GCCCAACTACCGAATTACTATACT

**185p97 *M. hyopneumoniae***

CGTAAAGANGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAATAAAAGGTATAT  
TGCCTCAGCCCCAGCGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGCTAAACCAGAAGCGGCTAAACCT  
AGTAGCAGCTAAACCAGAAGCGGCTAAACCAGAAGCGCTAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCA  
AAACCAGTTGCAAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTAATACTA  
ATACTGGTACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAACGAAGACTATTTGCCAATGGCTTTTLAGTTATAA  
ATTAGAAGATACTGACGAATATAAATTAAGCCTACCAACACCGGATGTTAATGTATTTTLAGAACTAGTT  
CATCAGAGCGAGTATGAAGACCTAATAATGGTACTGGATCTAGCTGAAACTGTTTTAAATCTTCAATATC  
AATTCAGGAAGTCAAGGTAGTACTAGTGACCAATATCATAAACTTAGCCCTCCGATGATGACCGATGGATC  
TTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAAGGCGCGCTAACCAA  
GGTAAAAAAGCCGAAAGGAACTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAGGGAGCTCCTAGTCAACAAAGTCCAA  
CTACCGA

**292P97 *M. hyopneumoniae***

ACAAAAGAAGGTAAAAAGAGAAGAGTAGATAAAAAAGTTAAGGAATTAGATAATAAAATAAAAGGTATAT  
TGCCTCAGCCCCAGCGCTAAACCAGAAGCAGCAAACCTAGTAGCGCTAAACCAGAAGCGGCTAAACCT  
AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCAGCTAAACCTGAAGCAGCA  
AAACCAGTTGCAAGCTAAACCTGAAGCAGCAAACCTAGTTGCTACTAATACTAATACTAATACTGGCTTTT  
CACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCAATGGCTTTTLAGTTATAAATTAGAATATACTGACGA  
AAATAAATTAAGCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTATTTTLAGAACTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAA

GACCAAAAAATAATAAAGGAACTAGATAAACTGTTTTAAATCTTCAATATCAATTCCAGGAAGTCAAGG  
 TAACTAGTGACCAATATCAGAACTTAGCCACCCAATGATGACCGAAGGATCTTCAAATCAAGGTAAAAA  
 AAGCGAAGGAACTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAAGCGCGCCTAACCAAGGTAAAAAAGCGAAGGA  
 ACTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAAAGCGCGCCTAGTCAACAAAGCCCAACTACC GA

## APÉNDICE VI

### Variantes de la secuencia de nucleótidos R1

GCAAAACCTGAAGCA	GCTAAACCTGAAGCG	GCCAAGCCAGAAGCG
GCTAAACCGGAAGCA	GTAAAACCAGTAGCG	GCGAAACCGGAAGCG
GCAAAACCAGTAGGG	ACAAAACCAGTTGCT	GCAAAACCAGTTGCA
GCAAAACCAGTTGCT	GCTAAACCAGTAGCG	GCAAAACCAGTAGCA
GCTAAACCTGAAGCA	GCAAAACCAGAAGCA	GCTAAACCAGTAGCA
GCAAAACCAGTGGCA	GCAAAACCAGTAGCG	GCCAAACCAGTTGCT
GCTAAACCAGTTGCT	GCTAAACCTGAAACA	GCTAAACCAGAAGCA
GCTAAAAATAACCA	GCTAAACCAGAACA	ACAAAACCAGTAGCA

Figura 6.- Variantes de la secuencia de nucleótidos R1

GCAAAACTAGTAGCG	GCTAAACCAGAAGCG
-----------------	-----------------

Figura 7.- Variantes R1 nuevas

### Variantes de la secuencia de nucleótidos R2

GGCGCACCTAGTCAACAAAACACAACCTACC	GGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAAGCAGAG
GGTGCTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCCGAG	GGAACACCTAATCAACAAAGCCCAACTAGC
GGGGCTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCCGAG	GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA
GGGACTCAAACCAAGGTAAAAAAGGTGAA	GGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAG
GGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAGCCGAA	GGATCTTCAAATCAAGGCAAAAAGCAGAG
GGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGGTGAA	GGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGCGAA
GGATCTTCAAATCAAGGTAAAAAAGGAGAA	GGATCTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCCGAA
GGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAA	GGAACCTCCTAACCAACAAAACACAACCTACC
GGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCAGAG	GGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAAGCAGAA
GGAACCTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCAGAG	GGAACCTCCTAACCAAGGGAAAAAAGCCGAA
GGAGCACCTAGTCAACAAAGCCCAACTACC	GGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCCGAA
GGCGCGCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA	GGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCAGAG
GGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAAGCCGAA	GGTGCTCCTAGTCAAGGGAAAAAAGCAGAA
GGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAAGCCGAA	GGTGCTCCTAACCAAGGTAAAAAAGCAGAG
GGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACC	GGAACCTCCTAATCAACAAAGCCCAACTAGC

Figura 8.- Variantes R2 GenBank

GGCGCGCCTAACCAAGGTAAAAAAGCCGAA
--------------------------------

Figura 9.- Variantes R2 de secuencia de nucleótidos mexicanas

## APÉNDICE VII

**Alineación de las secuencia de nucleótidos de la adhesina P97de R1 y R2, de las cepas de *M. hyopneumoniae* en GenBank, secuencias mexicanas. Cepa J (Universidad de Guelph, Canadá) = Jp97Mhp; Sombreado = secuencias mexicanas; \*= nucleótidos idénticos; --- = regiones discontinuas.**

<b>JMhp</b>	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
ATCC25934Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
IAF-DM9827Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
20868-BMhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
7448Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
AY957500ciliaryadhesinMhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
232Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
U50901Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
IAF-2186-01Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
IAF-669-00Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
IAF-2355-B-01Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
01-17577Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
01-18285Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
01-17704Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
R659Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
F19Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
IAF-464-01Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
20735-2Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>Ip97Mhp</b>	-----TTCGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>79p97Mhp</b>	-----TCTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>176p97Mhp</b>	-----TTCTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>174p97Mhp</b>	-----TTTCTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>292p97Mhp</b>	-----CTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
<b>185p97Mhp</b>	-----CGTAAAGANGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
Mhp1Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
40689-2Mhp	ATTAGACGATAATCTTCAGTATTCATTTGAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTACAAAAGAAGGTAAAAGAGAAGAAGTAGATAAAAAAGTTAAAGAATTA
	*****
<b>JMhp</b>	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCCAGTAGCAGCAAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAACAA
ATCC25934Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCCAGTAGCAGCAAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAACAA
IAF-DM9827Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCCAGAAGCAGCAAAACCCAGTAGCGGC-----TAAACCCAGAAGCAG
20868-BMhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCCAGAAGCAGCAAAACCCAGTAGCGGC-----TAAACCCAGAAGCAG
7448Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCCAGTAGCGGCTAAACCCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCCAGTAGCAG



Apéndice VII. Continua.

AY957500ciliaryadhesinMhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCGCGCAAAACCGGAAGCGGTAAACCACTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAG
232Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCAGCAAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
U50901Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCAGCAAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
IAF-2186-01Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
IAF-669-00Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
IAF-2355-B-01Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
01-17577Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
01-18285Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
01-17704Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGG
R659Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTGGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
F19Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
IAF-464-01Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTGTGCTA
20735-2Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGC-----TAAACCGAAGCAG
1p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCTAGTAGCGGCTAAAC-----
79p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCTAGTAGCGGCTAAAC-----
176p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
174p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
292p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
185p97Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTGCTCAGCCCCAGCGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
Mhp1Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCTGAAGCGGCTAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCAG
40689-2Mhp	GATAATAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTGTGCA
	***** **
JMhp	CAAAACCACTAGCAGC-----TAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCAAAACCACTAGCAGC-----
ATCC25934Mhp	CAAAACCACTAGCAGC-----TAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCAAAACCACTAGCAGC-----
IAF-DM9827Mhp	CAAAACCACTAGCGGC-----TAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAA-----
20868-BMhp	CAAAACCACTAGCGGC-----TAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCTGAAACAA-----
7448Mhp	CAAAACCACTGTCAGC-----AAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCTG-----A
AY957500ciliaryadhesinMhp	CAAAACCACTAGCAGC-----TAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTGTGCTGCCAAGCCAGA
232Mhp	CTAAACCTGAAGCAGC-----TAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
U50901Mhp	CTAAACCTGAAGCAGC-----TAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
IAF-2186-01Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
IAF-669-00Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
IAF-2355-B-01Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
01-17577Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
01-18285Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
01-17704Mhp	CTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCGAGA
R659Mhp	CTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCACTAGCAGCTAAACCTGA
F19Mhp	CTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCACTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCACTAGCAGCTAAACCTGA

Apéndice VII. Continua.

IAF-464-01Mhp	CTAA-----TA-----	-----
20735-2Mhp	CAAAACCAAGTTGCAGC-----	TAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGGGGCTAAACCTGAAGCAGC-----
1p97Mhp	-----	TGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAA-----
79p97Mhp	-----	TGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAA-----
176p97Mhp	CTAAACCAAGAAGCGGC-----	TAAACC-----AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCTGA
174p97Mhp	CTAAACCAAGAAGCGGC-----	TAAACC-----AGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCTGA
292p97Mhp	CTAAACCTGAAGCAGC-----	TAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCTGA
185p97Mhp	CTAAACCAAGAAGCGGC-----	TAAACCAAGAAGCGGCTAAACCAAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCTGA
Mhp1Mhp	CAAAACCAAGTAGCAGC-----	TAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCAGCTAAACCGGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCTGCCAAGCCAGA
40689-2Mhp	CTAAACCAAGAAGCAGC-----	AAAACC-----AGTTGCAGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCAAGA
JMhp	-----	AAAACCAAGTTGCTACTAA-----TAC--TAAT
ATCC25934Mhp	-----	AAAACCAAGTTGCTACTAA-----TAC--TAAT
IAF-DM9827Mhp	-----	-----
20868-BMhp	-----	AAAACCAAGTTGCTACTAA-----TAC--TAAT
7448Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAA-----	-----TAC--TAAT
AY957500ciliaryadhesinMhp	AGCGGCAAAACCAAGTAGCAGCAA-----	-----ACCAGTTGCT
232Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
U50901Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
IAF-2186-01Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
IAF-669-00Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
IAF-2355-B-01Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
01-17577Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
01-18285Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
01-17704Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGTAGCGGCTAAACCAAGA-----	-----AGCAGCAAAACCA
R659Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCTAAACCTGAAGCAGCCAAACCAAGTTGCTACTAAT	-----
F19Mhp	-----	AGTTGCTACTAAT
IAF-464-01Mhp	-----	-----
20735-2Mhp	-----	AAAACCAAGT-----
1p97Mhp	-----	TACTAATAC-----TAATACTAATACT---
79p97Mhp	-----	TACTAATAC-----TAATACTAATACT---
176p97Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAATAC-----	-----TAATACTAATACT---
174p97Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAATAC-----	-----TAATACTAATACT---
292p97Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAATAC-----	-----TAATACTAATACT---
185p97Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCTACTAATAC-----	-----TAATACTAATACTAAT
Mhp1Mhp	AGCGGCAAAACCAAGTAGCAGCAAAACCAAGT-----	-----TGCTACTAATACTAAT
40689-2Mhp	AGCAGCAAAACCAAGTTGCAGCTAAACCAAG-----	-----AAGCAGCAAAACCAAGT

Apéndice VII. Continua.

JMhp	ACTAATACT-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
ATCC25934Mhp	ACTAATACT-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
IAF-DM9827Mhp	-----AAATAAACCAAAAGAACTATTTCCCAATGGCTTTT
20868-BMhp	ACTAATACT-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
7448Mhp	ACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
AY957500ciliaryadhesinMhp	ACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
232Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
U50901Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
IAF-2186-01Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
IAF-669-00Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
IAF-2355-B-01Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
01-17577Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
01-18285Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
01-17704Mhp	GTTGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
R659Mhp	ACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
F19Mhp	ACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
IAF-464-01Mhp	-CTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
20735-2Mhp	--TGCTACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
1p97Mhp	-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
79p97Mhp	-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
176p97Mhp	-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
174p97Mhp	-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
292p97Mhp	-----GGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
185p97Mhp	ACTAATACTGGTACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTGCCAATGGCTTTT
Mhp1Mhp	ACTAATACTAATACTGGCTTTTCACTTACAAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
40689-2Mhp	--TGCTACTAATACTGGCTTTTCTGTGCAATAAACCAAAAGAAGACTATTTCCCAATGGCTTTT
	*****
JMhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
ATCC25934Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
IAF-DM9827Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGACAAAACTGTTTT
20868-BMhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGACAAAACTGTTTT
7448Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGACAAAACTGTTTT
AY957500ciliaryadhesinMhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
232Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
U50901Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
IAF-2186-01Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
IAF-669-00Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT
IAF-2355-B-01Mhp	TAA GCCTAAAAACACCGGAAATTAATGTA TTTTTTGAAGCTAGTTCATCAAAGCGAGTATGAAGAACAAAAAATAATAAGGAACTAGATAAAACTGTTTT



## Apéndice VII. Continua.

185p97Mhp	AAATCTTCAATATCAATTCCAGGAAAGTCAAGGTAGCTAGTGACCAATATCATAAACTTAGCCTCCCGATGATGACCGATGGATCTTCAAAATCAAGGTAAA
Mhp1Mhp	AAATCTTCAATATCAATTCCAGGAAAGTCAAGGTAACTAGTGACCAATATCAGAAACTTAGCCACCCAAATGATGACCGAGGGGACTCAAACCAAGGTAAA
40689-2Mhp	AAATCTTCAATATCAATTCCAGGAAAGTCAAGGTAACTAGTGACCAATATCAGAAACTTAGCCACCCAAATGATGACCGAGGGGACTCAAACCAAGGTAAA
	***** **
<b>JMhp</b>	<b>AAAGCCGAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCCGAAGGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCCGAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCCGAAG</b>
ATCC25934Mhp	AAAGCCGAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCCGAAGGCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCCGAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCCGAAG
IAF-DM9827Mhp	AAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGAAAAAGCCGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAG
20868-BMhp	AAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGAAAAAGCCGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAG
7448Mhp	AAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAGGGTGCTCCTAACCAAGGAAAAAGCCGAGGGTCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAG
AY957500ciliaryadhesinMhp	AAAGGAGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAGG
232Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
U50901Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
IAF-2186-01Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
IAF-669-00Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
IAF-2355-B-01Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
01-17577Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
01-18285Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
01-17704Mhp	AAAG-----CAGAGGGGGCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
R659Mhp	AAAGGTGAAGGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
F19Mhp	AAAGGTGAAGGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACTTCTAACCAA-----
IAF-464-01Mhp	AAAG-----CCGAAGGCGCTCCTAACCAAGGCAAAAAGCAGAGGGTCTCCTAATCAA-----
20735-2Mhp	AAAGGTGAAGGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTAATCAA-----
1p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
79p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
176p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
174p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
292p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGG
185p97Mhp	AAAAGCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGTAAAAAGCAGAGGGCGCCTAACCAAGGTAAAAAGCCGAAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCAGAGG
Mhp1Mhp	AAAGGTGAAGGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCCGAAG
40689-2Mhp	AAAGGTGAAGGAACCTCCTAATCAAGGTAAAAAGCAGAGGGTGCTCCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGAACCTCCTAACCAAGGAAAAAGCCGAAG
	*** **
<b>JMhp</b>	<b>GCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA</b>
ATCC25934Mhp	GCGCACCTAGTCAAGGGAAAAAGCAGAGGGTGCTTCTAATCAACAAAGCACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
IAF-DM9827Mhp	GAAC-----TTCTAACCAACAAAACACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
20868-BMhp	GAAC-----TTCTAACCAACAAAACACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
7448Mhp	GAAC-----TTCTAACCAACAAAACACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
AY957500ciliaryadhesinMhp	GCGCA-----CCTAGTCAACAAAACACAACCTACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
232Mhp	GAGCA-----CCTAGTCAACAAAAGCCCCAATACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA
U50901Mhp	GAGCA-----CCTAGTCAACAAAAGCCCCAATACCGAATTAACCTAATTACCTTCCTGAATTAGGTA

Apéndice VII. Continua.

IAF-2186-01Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
IAF-669-00Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
IAF-2355-B-01Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
01-17577Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
01-18285Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
01-17704Mhp	-----	CAAAGCCCA	ACTAGC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
R659Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
F19Mhp	-----	CAAAACACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
IAF-464-01Mhp	-----	CAAAGCACA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
20735-2Mhp	-----	CAAAGCCCA	ACTAGC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA	TAGGTA
1p97Mhp	GAGCA-----	CCTAGTCAA	CAAAGCCCA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACTCC-----	
79p97Mhp	GAGCA-----	CCTAGTCAA	CAAAGCCCA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACTC-----	
176p97Mhp	GAGCA-----	CCTAGTCAA	CAAAGCCCA	ACTACC	GAATTA	ACT--	ATACT-----	
174p97Mhp	GAGCA-----	CCTAGTCAA	CAAAGCCCA	ACTACC	GAATTA	ACT--	ATACTCCC-----	
292p97Mhp	GCGCG-----	CCTAGTCAA	CAAAGCCCA	ACTACC	GAATTA	ACTAATT	ACCT-----	
185p97Mhp	GAGCT-----	CCTAGTCAA	CAAAGTCCA	ACTACCGA				
Mhp1Mhp	GAACA-----	CCTAATCAA	CAAAGCCCA	ACTAGC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA
40689-2Mhp	GAACA-----	CCTAATCAA	CAAAGCCCA	ACTAGC	GAATTA	ACTAATT	ACCTTC	CTGAA

\*\*\*\*