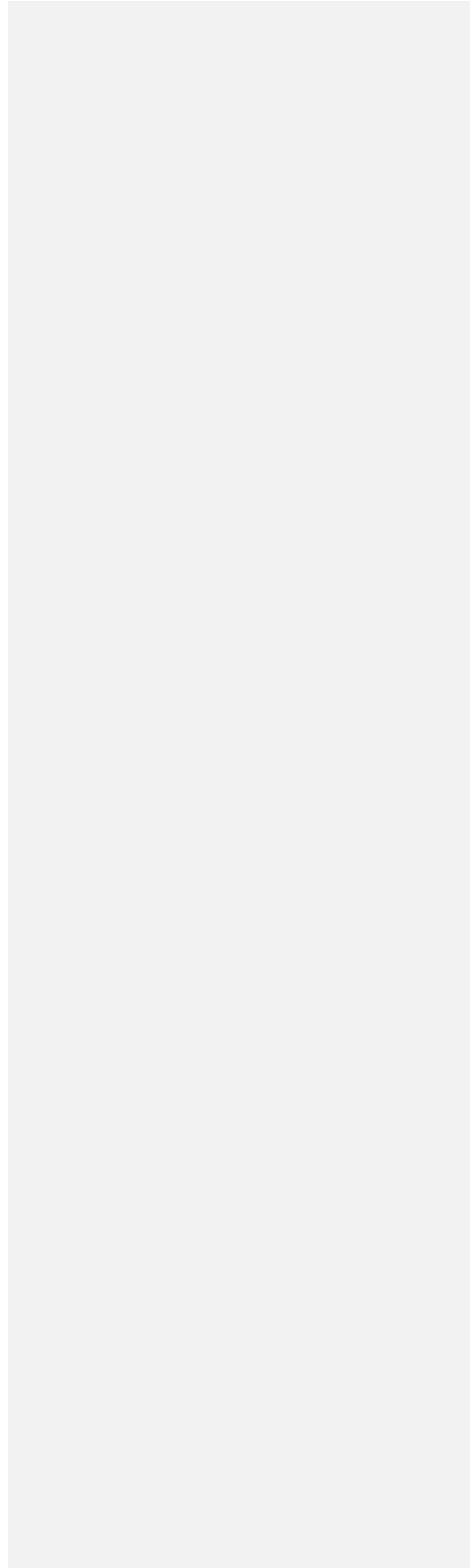


**Detección, Identificación y genotipificación de micoplasmas
en procesos respiratorios**

|





Detección, Identificación y genotipificación de micoplasmas en procesos respiratorios

Autores principales: Evelyn Lobo Rivero, DrC.
Lic. Yaima Bugher Pulgaron, M.Sc.

Otros autores: Ivette Espinosa, Anisleidy Pérez, Arianna Duque, Siomara Martínez, Joan Peña.

Colaboradores: Ondina León, Odalys Uffo, Evelio Castellon, Marisela Santos, Gysleibis Miranda, Lucas Miranda, Jorge Timenetsky, José B. Poveda.

**Laboratorio Acreditado y de Referencia de la OIE para el Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB), Grupo Biología Molecular
Dirección de Salud Animal
Mayabeque, 2016**

I. Presentación

1.1.- Título: NEUMONIA ENZOOTICA PORCINA EN CUBA. DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DE MICOPLASMAS ASOCIADOS A ESTA ENFERMEDAD.

Autores principales: Evelyn Lobo¹ y Yaima Burgher¹

Otros autores: Ivette Espinosa², Anisleydis Pérez¹, Arianna Duque¹, Siomara Martínez¹, Joan Peña²

Colaboradores: Ondina León³, Odalys Uffo³, Evelio Castellon¹, Marisela Santos¹, Gysleibis Miranda², Lucas Miranda⁴, Jorge Timenetsky⁴, José B. Poveda⁵

¹**MYCOLAB**, Laboratorio Acreditado y de Referencia de la OIE para el Diagnóstico de Micoplasmas. Departamento de Microbiología-epidemiología, Dirección de Salud Animal, Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

²Laboratorio de Bacteriología Animal, Departamento de Microbiología-epidemiología, Dirección de Salud Animal, Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

³Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

⁴Laboratorio para el diagnóstico de micoplasmas, Dpto de Microbiología, Universidad de Sao Paulo, Brasil

⁵Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), División de Epidemiología y Medicina Preventiva, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias.

RESUMEN

Los trastornos respiratorios constituyen uno de los problemas infecciosos más frecuentes que afectan a la porcicultura intensiva. Entre ellos se encuentra la neumonía enzoótica porcina (NEP), enfermedad respiratoria crónica, que provoca importantes pérdidas económicas en la industria porcina de todo el mundo. Esta entidad se caracteriza por una alta morbilidad con grave impacto en los parámetros productivos del cerdo, pues disminuye la ganancia media diaria, la eficiencia de conversión y aumenta los costos por el empleo de medicamentos y medidas de manejo adicionales. Aunque en su etiopatogenia participan varios micoplasmas porcinos, *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyp*) es el agente etiológico fundamental considerado, en la actualidad, un patógeno emergente a nivel mundial. En nuestro país el diagnóstico de la NEP se realiza sobre la base del examen clínico de cerdos en explotaciones porcinas (tecnificadas y/o privadas) y en el caso de los mataderos, por observación de neumonía de tipo intersticial. Sin embargo, los síntomas clínicos ni las lesiones anatomopatológicas son patognomónicas y por tanto no ofrecen confirmación de la enfermedad ni el descarte por diagnóstico diferencial con otro tipo de neumonías como la producida por la influenza porcina que frecuentemente afectan a la especie. De igual manera, se desconoce la presencia de micoplasmas porcinos en la isla así como sus características. Por lo antes expuesto **los objetivos** de esta investigación estuvieron encaminados a desarrollar metodologías diagnósticas para la detección e identificación de micoplasmas porcinos asociados a la NEP; caracterizar el genotipo de las cepas circulantes y realizar estudios de epidemiología molecular. Como resultado de este estudio se informa por primera vez, en Cuba, infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Ureaplasma diversum* en cerdos (de la categoría ceba procedentes de unidades con crianza intensiva) con trastornos respiratorios y lesiones compatibles con la neumonía enzoótica. La presencia de estas especies quedó demostrada por PCR en tiempo final, PCR en tiempo real y secuenciación. El análisis de la región intergénica del 16S-23S rRNA y de la secuenciación del rRNA 16S de las especies estudiadas, demostraron la variabilidad existente entre ellas y la identificación de genotipos predominantes en diferentes provincias de la isla. De igual manera se realizó la clasificación fenotípica, en términos de virulencia, de cepas de *M. hyopneumoniae* en base al polimorfismo del rRNA 16S. La detección e identificación de *Ureaplasma diversum* a partir de lesiones neumónicas, constituye el primer reporte internacional de su presencia en cerdos ya que se considera un patógeno del humano. Este hallazgo tiene importancia desde el enfoque de "una salud" por las implicaciones del cerdo como reservorio de patógenos con posibilidad de mantenimiento en el ambiente y transmitirse al humano. En el orden práctico, estos resultados permiten incorporar nuevos elementos al programa de control de los trastornos respiratorios del cerdo al confirmar la presencia de la enfermedad en el país así como demostrar la existencia de varios genotipos de micoplasmas circulantes. Posibilita, además, contar con una metodología diagnóstica para la detección e identificación de estas especies e implantar medidas para su control con el consiguiente impacto en los índices bioproductivos, así como se describen nuevas especies infectando a cerdos con problemas respiratorios. De igual manera es un punto de partida para el estudio de algunas especies por su potencial zoonótico. Las contribuciones de este trabajo se visualizan en diversas revistas internacionales y nacionales: Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, (2015) v. 52, n. 4, p. 310-318; Infection, Genetics and Evolution 2014; Brazilian Journal of Microbiology (2011) 42: 1517-8382; Biotecnología Aplicada (2011) Vol. 28; Revista de Salud Animal 35 (1), 69. 2013. Posibilitó la realización de tres trabajos de cursos de la Facultad de Med. Veterinaria y tributan a una tesis de doctorado. Los resultados fueron presentados en 6 eventos internacionales. Se cuenta con avales de la

Dirección Nacional de Sanidad Animal (DSA), del Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP), de expertos internacionales en la temática, entre otros.

2. Aporte científico personal de cada autor al resultado

Evelyn Lobo Rivero.Líder de proyecto internacional CAPES-MES: *“Epidemiología molecular y susceptibilidad antimicrobiana de micoplasmas patógenos asociados a la neumonía enzoótica porcina. Fortalecimiento de las capacidades diagnósticas como parte de los programas de control de esta enfermedad en Cuba”* y coordinador de etapas del proyecto nacional *Fortalecimiento de capacidades diagnóstica para entidades de interés en el porcino del programa nacional de salud animal y vegetal*(PNSAV-MINAG) bajo los cuales se obtienen los resultados. Concibió los diseños, montaje y validación de las metodologías diagnósticas utilizadas en este trabajo, Participó en los muestreos de las investigaciones, así como en el análisis científico-práctico de los resultados. Es autor y coautor de las publicaciones y eventos presentados así como de los Reportes de Primeros Hallazgos. Fue tutor de la tesis de Grado y tutor de una tesis doctoral en ejecución. **30%**

Yaima Burgher Pulgaron.Trabajó en el diseño y montaje de los experimentos relacionados con el diagnóstico por PCR y secuenciación de las muestras analizadas. Participó en los estudios de caracterización de los aislados y en la discusión de todos los resultados. Es autor y coautor de las publicaciones y eventos presentados. Estos resultados formaran parte de su Tesis de doctorado. **25%**

Ivette Espinosa Castaño. Trabajó en el diseño y montaje de los experimentos relacionados con el diagnóstico por PCR para la detección de micoplasmas porcinos. **20%**

Siomara Martínez. Participó en la discusión de los resultados y en la orientación de las investigaciones. **15%**

Arianna Duque Ortiz. Participó en los experimentos relacionados con la toma de muestra en los mataderos y procesamiento para la detección de micoplasmas por PCR. **15%**

Anisleydis Pérez. Trabajó en la preparación de muestreos y en el procesamiento de muestras provenientes de mataderos y unidades porcinas. **10%**

Joan Peña. Trabajó en el procesamiento de muestras para su secuenciación y análisis de secuencias. **10%**

Colaboradores

Ondina León³, Odalys Uffo³, Evelio Castellon¹, Marisela Santos¹, Gysleibis Miranda², Lucas Miranda⁴, Jorge Timenetsky⁴, José B. Poveda⁵

¹**MYCOLAB**, Laboratorio Acreditado y de Referencia de la OIE para el Diagnóstico de Micoplasmas. Departamento de Microbiología-epidemiología, Dirección de Salud Animal, Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

²Laboratorio de Bacteriología Animal, Departamento de Microbiología-epidemiología, Dirección de Salud Animal, Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

³Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

⁴Laboratorio para el diagnóstico de micoplasmas, Dpto de Microbiología, Universidad de Sao Paulo, Brasil

⁵Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), División de Epidemiología y Medicina Preventiva, Universidad de Las Palmas de Gran Canarias.

Autor para la correspondencia: Evelyn Lobo Rivero Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apdo. 10, San José de Las Lajas 32700, Mayabeque, Cuba.
correo electrónico: elobo@censa.edu.cu

3. Comunicación corta

La eficiencia económica de la cadena productiva del cerdo se ve afectada por enfermedades reconocidas mundialmente con un impacto económico negativo en los indicadores bioproductivos de la especie. Entre estas enfermedades los trastornos respiratorios constituyen uno de los principales problemas que afectan a la crianza porcina intensiva y semi-intensiva mundial. Estos también tienen acción directa sobre los costos de producción por concepto de mortalidad, tratamientos, disminución en la ganancia diaria de peso y aumento del tiempo necesario para alcanzar el peso al sacrificio con la consiguiente afectación económica. A nivel mundial se reconoce, dentro de los trastornos respiratorios del cerdo, a la neumonía enzoótica porcina (NEP) como una enfermedad respiratoria crónica que se caracteriza por una baja mortalidad pero alta morbilidad con grave impacto en los parámetros productivos en los cerdos, disminuyendo la ganancia media diaria y eficiencia de conversión. Los síntomas clínicos son de tipo respiratorio y desde el punto de vista anatomopatológico produce una neumonía intersticial pero en ambos casos no son patognomónicos lo cual dificulta su diagnóstico y su diferenciación de otros tipos de neumonías como las producidas por el virus de la influenza porcina.

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico fundamental de la NEP. Los micoplasmas presentan inconvenientes en su diagnóstico ya que son organismos nutricionalmente fastidiosos y pueden demorar alrededor de 30 días para observar crecimiento en cultivos microbiológicos, otros por su parte no crecen en medios artificiales por lo que se hace necesario el desarrollo y aplicación de ensayos moleculares para detectar, identificar y caracterizar estos microorganismos. En Cuba, los problemas respiratorios, presentes en la industria porcina, constituyen la segunda causa de muerte, de tipo infecciosa, con un 13.7%. El diagnóstico se realiza sobre la base del examen clínico, de los cerdos, en las explotaciones porcinas y en los mataderos por observación de las lesiones macroscópicas en pulmones. En el caso específico de la NEP no tiene manifestaciones patognomónicas (ni clínicas ni anatomopatológicas) por lo que cursa de manera silente. Por otra parte, no se cuenta con una metodología diagnóstica que permita conocer si se encuentran circulando especies de micoplasmas porcinos asociados a esta enfermedad, de igual manera se desconoce los genotipos que pueden estar presentes en la isla.

La emergencia y re-emergencia de agentes microbianos en el contexto de enfermedades complejas como los procesos respiratorios, está relacionada con la influencia de determinados factores que ejercen presiones selectivas sobre la distribución de los patógenos. Estos factores pueden variar en función del área geográfica, la edad del animal y las condiciones de manejo, resulta necesario contar con métodos actualizados, sensibles y rápidos para abordar el diagnóstico de estas enfermedades que permitan trazar estrategias de control y prevención para la aplicación de un programa efectivo.

A partir de estos antecedentes, los **objetivos** de estas investigaciones estuvieron encaminados a 1) Desarrollar una metodología diagnóstica para la detección de micoplasmas porcinos en el país. 2) Determinar la presencia de especies de micoplasmas asociados a la NEP en Cuba y 3) Realizar estudios de caracterización genotípica de las cepas detectadas mediante estudios de la región intergénica del 16S-23S del RNAr y la secuenciación.

RESULTADOS.

I.- DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PCR EN TIEMPO FINAL PARA LA DETECCIÓN DE MICOPLASMAS A PARTIR DE EXUDADOS DIRECTOS EN PULMONES DE CERDOS. Se desarrolló un sistema de PCR en tiempo final para la detección de *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis*, a partir de muestras de exudados directos en pulmones de cerdo. El desarrollo de esta tecnología posibilita su utilización en el esclarecimiento y diagnóstico de la NEP, y su empleo en el diagnóstico diferencial con muestras procedentes de cuadros respiratorios porcinos. De ahí que los ensayos desarrollados y evaluados en este trabajo fueron aplicados en la detección de micoplasmas en muestras clínicas de campo obtenidas en situaciones de brotes respiratorios y en animales de matadero, sin sintomatología aparente. *Mycoplasmas hyorhinis in different regions of Cuba. Diagnosis in Brazilian Journal of Microbiology (2011) 42: 1517-8382 y Detection of pathogens in pigs with pneumonia in different regions of Cuba in Biotecnología Aplicada Vol. 28. (2011).*

II.- DETECCIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EN DIFERENTES PROVINCIAS DE LA ISLA. Se realizó un muestreo al azar enfocado a la detección de pulmones neumónicos. Se trabajaron un total de 280 pulmones (35 por provincias), de cerdos con lesiones típicas de NEP procedentes de las provincias de Pinar del Río, La Habana; Matanzas; Cienfuegos, Villa Clara, Ciego de Ávila, Santi Spiritus y

Con formato: Español (España)

Camagüey. A partir del ensayo de PCR en tiempo final desarrollado, fue posible detectar la presencia de este agente en todas las provincias. Se detectó *M.hyopneumoniae* en el 14.29 % del total de las muestras trabajadas, estando esto en correspondencia con lo reportado a nivel internacional. Estos **resultados confirman la presencia de *M. hyopneumoniae***, en muestras de pulmón procedentes de diferentes provincias y su relación como agente etiológico primario de la NEP en Cuba. Contribuyendo este resultado al esclarecimiento de la etiología de la NEP y es un punto de partida para estudios epidemiológicos profundos acerca de la enfermedad en el país. ***Biotecnología Aplicada* Vol. 28. (2011). Detection of pathogens in pigs with pneumonia in different regions of Cuba. Se cuenta con certificado de paternidad de Primer Hallazgo, otorgado por el Consejo Científico Veterinario de Cuba**

Con formato: Español (España)

III.- DETECCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y VARIABILIDAD GENÉTICA DE *M. hyopneumoniae* PRESENTE EN PULMONES DE CERDOS APARENTEMENTE SANOS Y CON CUADRO NEUMÓNICO. Las diferencias moleculares entre cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhyop*) presentes en pulmones de cerdos con neumonía han sido estudiadas y reportadas por varios autores, sin embargo estudios comparativos relativos a la presencia de *Mhyop* en pulmones aparentemente sanos y con neumonía no habían sido realizados previamente. El objetivo de este estudio fue la detección, cuantificación y análisis molecular de cepas de *Mhyop* en muestras procedentes de pulmones sin y con lesiones neumónicas. Para la detección de *Mhyop* se utilizó un algoritmo diagnóstico basado en el empleo de PCR multiplex, PCR en Tiempo Real y la amplificación múltiple de VNTR. La caracterización molecular de las cepas se realizó mediante el análisis de número de copias de VNTR en las regiones P97R1 (reconocida la principal citoadhesina de *Mhyop* relacionada con la patogenidad), P146R3, H2R1 e H4 asociadas a otras proteínas que pudieran estar relacionadas al proceso de adhesión a las células como pre requisito para infestación en esta especie. Como resultado, ***M. hyopneumoniae* fue detectado en muestras tanto de pulmones sin alteraciones aparentes como neumónicas; este es el primer estudio reportado en la literatura que muestra la presencia de *Mhyop* en pulmones de cerdos sin lesiones macroscópicas.** La cantidad de *Mhyop* en las muestras positivas varió en dependencia del ensayo utilizado, el mayor número de muestras positivas fue identificado cuando se utilizó la amplificación múltiple VNTR combinado con electroforesis de capilares. El PCR en Tiempo Real, detectó 4.9×10^4 copias de genoma/mL de *Mhyop* en pulmones aparentemente sanos y 3.9×10^6 copias de genoma/mL de *Mhyop* en pulmones neumónicos. El análisis del número de copias de VNTR demostró una elevada variabilidad genética de las cepas de *Mhyop* presentes tanto en pulmones neumónicos como en los aparentemente sanos. Las cepas con tres copias de VNTR en P97R1 solo fueron detectadas en pulmones neumónicos, lo cual avala la virulencia de las cepas detectadas, en cuanto a las cepas con 40 y 43 copias de VNTR en P146R3 solo fueron detectadas en pulmones aparentemente sanos. En este sentido se confirma la suposición de que otras adhesinas como la P146 están involucradas en el proceso de adhesión. Análisis del número de copias VNTR mostraron la alta variabilidad genética de las cepas de *M. hyopneumoniae* detectada en animales sanos y enfermos de diferentes o del mismo rebaño. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 52, n. 4, p. 310-318 (2015). Detection, quantification and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* from apparently healthy and pneumonic swine.**

Con formato: Español (España)

IV.- MUTACIONES PUNTUALES EN EL ARNr 16S PERMITEN LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS DE *M. HYOPNEUMONIAE* DE VIRULENCIA VARIABLE. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE PCR CONVENCIONAL PARA LA DIFERENCIACIÓN DE CEPAS VIRULENTAS Y NO VIRULENTAS. Las cepas de *M. hyopneumoniae* han sido clasificadas en cepas de alta, media, baja o ninguna virulencia, de acuerdo a los resultados obtenidos en inoculaciones experimentales. La identificación de marcadores moleculares que permitan la diferenciación de las cepas en dependencia de su grado de virulencia constituye un aporte significativo al diagnóstico de esta entidad y al estudio de su epidemiología y relación con los procesos respiratorios del cerdo. En este trabajo se realizó la secuenciación directa en muestra clínica y análisis del gen que codifica para el ARNr 16S de 14 cepas de *M. hyopneumoniae* cubanas (9 muestras de pulmones neumónicos y 5 muestras procedentes de cerdos aparentemente sanos). Asimismo, se realizó la secuenciación del gen del ARNr 16S de 2 aislados de *M. hyopneumoniae* de baja y elevada virulencia, procedentes de la Universidad de Ghent, Bélgica. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon entre sí y con las secuencias de las cepas de referencia virulentas y no virulentas depositadas en la base de datos GenBank. Se identificaron 3 mutaciones puntuales que permitieron la clasificación de las cepas de *M. hyopneumoniae* en dependencia de su grado de virulencia, de la siguiente manera: CT-alta virulencia, CA-baja virulencia y TT- no virulencia. **Este estudio constituye el primer reporte de clasificación fenotípica en términos de virulencia de cepas de *M. hyopneumoniae* en base al polimorfismo del ARNr 16S.** Siguiendo la clasificación anteriormente propuesta en base a la relación genotipo-fenotipo virulento, se puede sugerir que en las muestras tomadas a partir de pulmones neumónicos de los cerdos incluidos en

este estudio se encuentran presente cepas de *M. hyopneumoniae* de baja virulencia, mientras que en los pulmones aparentemente sanos se encuentran cepas no virulentas. Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias nucleotídicas constituyen un punto de partida para el desarrollo de metodologías moleculares que permitan la detección diferencial de cepas virulentas de *M. hyopneumoniae* en muestras de campo de manera rápida. Esto permitirá enfocar el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* hacia la detección de cepas realmente virulentas, lo que contribuirá a la toma de decisiones y medidas terapéuticas sobre bases objetivas.

V.- DETECCION DE *Mycoplasma hyorhinis* EN EL OCCIDENTE Y CENTRO DE LA ISLA. La utilización del PCR Real Time permitió detectar que el 66% de las muestras trabajadas resultaron positiva a *M. hyorhinis* y un 19.84% resultaron infecciones mixtas con *M. hyopneumoniae* evidenciando una alta positividad de las muestras a *M. hyorhinis*, aspecto que complejiza futuros programas de control para estas entidades. Como resultado de la PCR en tiempo final, para la detección de *M. hyorhinis*, se observó la amplificación de una banda de 364pb en el 44.8 % del total de las muestras testadas, evidenciando muestras positivas en todas las provincias, la diferencia de los porcentos en relación a muestras positivas entre ambas técnicas, estuvo dado por la sensibilidad de cada uno de estos ensayos. Conociendo la alta incidencia a partir de lesiones pulmonares y la posibilidad de que cepas de *M. hyorhinis* puedan producir lesiones similares a las observadas en la NEP, puede ser esto un punto de partida para ampliar los estudios de correlación entre la ubicación de la lesión, incidencia y patogenicidad de este agente en nuestras condiciones. La amplificación de la región intergénica (RIG) del 16S-23S RNAr de *M. hyorhinis*, demostró la variabilidad existente entre cepas de esta especie. A partir de estos resultados **se reportó la presencia de *M. hyorhinis* asociado a procesos respiratorios y se evidenció su elevada variabilidad.** Los resultados obtenidos a partir de la presencia y estudios de la RIG, contribuyen al conocimiento de la epidemiología molecular de la NEP en Cuba. *Brazilian Journal of Microbiology* (2011) 42: 1517-8382. *Mycoplasmas hyorhinis* in different regions of Cuba. *Diagnosis y certificado de paternidad de Primer Hallazgo, otorgado por el Consejo Científico Veterinario de Cuba*

Con formato: Español (España)

VI.- PRESENCIA DE *Ureaplasma* EN MUESTRAS DE PULMÓN CON LESIONES TÍPICAS DE LA NEUMONÍA ENSZOOTICA PORCINA. PRIMER REPORTE EN EL PAÍS. En las muestras procedentes de Pinar del Río, Matanzas y Camagüey, fue detectada la presencia de *Ureaplasma spp* las mismas fueron estudiadas mediante amplificación y secuenciación de la región 16S del RNAr. Como resultado de este estudio se identificó un 87% de homología con *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 27815, *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 700970, y *Ureaplasma urealyticum* serovar 10 str. ATCC 33699, cepas que afectan al humano. Cuando las secuencias de los aislados cubanos se compararon entre sí se observó que existían un 100% de homología entre ellos, lo que refleja su identidad como una misma cepa circulante. Según la literatura consultada no se tiene antecedentes de aislamiento de esta especie en pulmones de cerdos con lesiones típicas de la Neumonía enzootica, los ureaplasmas se asocian a problemas urogenitales en el humano, **por lo que este resultado es el primer reporte de la presencia de esta especie en muestras de pulmones de cerdo con procesos neumónicos.** *Revista de Salud Animal* 35 (1), 69. (2013). *Detection of Ureaplasma spp. in pig lungs with lesions consistent with swine enzootic pneumonia, from the western and central regions of Cuba y certificado de paternidad de Primer Hallazgo, otorgado por el Consejo Científico Veterinario de Cuba*

VII.- PRESENCIA DE *Ureaplasma diversum* EN PULMONES DE CERDOS CON LESIONES NEUMÓNICAS COMPATIBLES CON LA NEP. Como continuidad del trabajo anterior las muestras que resultaron positivas a *Ureaplasma spp*. Se le realizó ensayos de PCR-especie específica para la identificación *U. urealyticum*, *U. parvum* y *U. diversum*. **Como resultado de este estudio se identificó en el 100 % de las muestras trabajadas a *U. diversum*.** Las muestras fueron secuenciadas y el estudio filogenético utilizando el método Bayesiano confirma los resultados anteriores, obtenidos por PCR, que muestran un 100% de relación de los aislados cubanos con la especie *U. diversum*. **Estos resultados confirman los anteriores sobre la presencia, por primera vez, de esta especie en cerdos afectados con trastornos respiratorios llamando la atención que no fue detectado en muestras de cerdos y pulmones aparentemente sanos.** Esta investigación es un punto de partida para otros estudios relacionados con la participación de esta especie en la etiopatogenia de la NEP y su carácter zoonótico. *Infection, genetics and evolution.* (2014) *Ureaplasma diversum* in pneumonic lungs of swine. Impact Factor: 3.02 · DOI: 10.1016/j.meegid.2013.07.003 · Source: PubMed

La **originalidad e impacto científico** de este trabajo está dada por su contribución al conocimiento sobre:

- ✓ Por primera vez se utiliza un conjunto de metodologías diagnósticas para la detección de especies micoplasmas porcinos asociados a la NEP confirmando la presencia de la enfermedad en el país.
- ✓ Se confirma la presencia de *M. hyopneumoniae* y su relación como agente etiológico primario de la NEP. Esta especie también se detectó en muestras de pulmones sin alteraciones siendo este el primer estudio que muestra la presencia de *Mhyop* en pulmones de cerdos sin lesiones macroscópicas
- ✓ Este estudio constituye el primer reporte de clasificación fenotípica en términos de virulencia de cepas de *M. hyopneumoniae* en base al polimorfismo del ARNr16S.
- ✓ Los resultados de este trabajo sugieren que la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S pudiera ser empleado como marcador molecular para la diferenciación de cepas de campo de *M. hyopneumoniae* virulentas y no virulentas.
- ✓ Los resultados obtenidos permitirán desarrollar metodologías de diagnóstico rápido basado en PCR en tiempo Real para la detección de las cepas de *M. hyopneumoniae* que representen un verdadero interés veterinario. De esta manera, se podrán tomar medidas objetivas que permitan un control eficiente de la Neumonía Enzootica Porcina en las granjas.
- ✓ Se detectó la circulación de *M. hyorhinis* asociado a la NEP. La detección de esta especie de importancia veterinaria, constituye primeros reportes para el país y los conocimientos obtenidos, contribuyen al conocimiento de la etiología de esta entidad en Cuba
- ✓ Los estudios de genotipificación realizados a aislados cubanos de micoplasmas porcinos, demostraron las características y variabilidad de los mismos aspectos importantes en un programa de control para estas entidades.
- ✓ Se detectó, secuenció e identificó *Ureaplasma diversum* a partir de pulmones de cerdo con lesiones de la NEP, lo que constituye el primer reporte de la presencia de esta especie afectando a cerdos Este hallazgo tiene importancia desde la perspectiva de "una salud" por las implicaciones del cerdo como reservorio de patógenos con posibilidad de mantenimiento en el ambiente y transmitirse al humano
- ✓ Estos trabajos permitieron la formación de personal tanto de pre como de post-grado, tributando a trabajos de cursos y tesis de doctorado, de igual manera a la capacitación de personal especializado vinculado a la porcicultura

Bibliografía (selección)

- **Pieters, M.,** Pijoan, C., Fano, E., Dee, S. (2008); An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. Vet. Microbiol. VETMIC-4136; No of Pages 6
- **Ramírez, A.S.;** Naylor C.J.; Pitcher D.G.; Bradbury, J.M.: (2008) : High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian micoplasmas offers potential use as a diagnostic tool Veterinary Microbiology 128: 279–287
- **Lin, J.H.;** Chen, S.P.; Yeh, K.S.; Weng C.N. (2006): *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. Veterinary Microbiology (115) pp: 111–116
- **De Francesco, M.A.,** Negrini, R., Pinsi, G., Peroni, L., Manca, N., 2009. Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28 (6), 641–646.