

# La importancia de las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*

■ Beatriz García-Morante<sup>1</sup>,  
Joaquim Segalés<sup>1,2</sup> y Marina Sibila<sup>1</sup>

Imágenes cedidas por los autores



## ► Resumen

Desde que *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) fue identificado como agente etiológico de la micoplasmosis porcina y uno de los principales patógenos implicados en la neumonía enzoótica (NE) y en el complejo respiratorio porcino (CRP), se han observado diferencias tanto en la incidencia como en la gravedad de las lesiones pulmonares asociadas con esta infección. Actualmente se sabe que existe variabilidad genética y de virulencia entre las distintas cepas de *M. hyopneumoniae*. Sin embargo, las implicaciones y el efecto concreto que ello puede tener a nivel de campo es en gran medida aún desconocido. En este artículo se revisa el conocimiento existente referente a las distintas cepas de *M. hyopneumoniae*, así como la importancia que ello puede conllevar en el desarrollo de la enfermedad y en el control de la infección a nivel de granja.

Palabras clave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, micoplasmosis porcina, neumonía enzoótica, complejo respiratorio porcino, cepas, virulencia

## ► Summary

### *Mycoplasma hyopneumoniae* strain importance

Since *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) was identified as the etiologic agent of swine mycoplasmosis and one of the main pathogens involved in the enzootic pneumonia (EP) and porcine respiratory disease complex (PRDC), differences have been identified both in incidence and severity of lung lesions associated with such infection. It is known that different virulence and genetic variability do exist among *M. hyopneumoniae* strains. However, the implications and the effect these may have under field conditions is still largely unknown. In the present article, current knowledge on *M. hyopneumoniae* strains and its importance on the development as well as on the control of the disease at farm level is reviewed.

Keywords: *Mycoplasma hyopneumoniae*, swine mycoplasmosis, enzootic pneumonia, porcine respiratory disease complex, strains, virulence

**Contacto con los autores:** <sup>1</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona;

<sup>2</sup>Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. \*E-mail: bea.garcia@cresa.uab.cat

**M**ycoplasma hyopneumoniae (*M. hyopneumoniae*) es un patógeno porcino implicado en distintas enfermedades respiratorias con importantes repercusiones económicas en el sector. La infección exclusiva por *M. hyopneumoniae*, situación que se da en contadas ocasiones, da lugar a la micoplasmosis porcina. Sin embargo, este patógeno es más conocido por su implicación en la neumonía enzoótica (NE), enfermedad en la que participan otras bacterias comensales del tracto respiratorio superior porcino. Cuando además de la infección bacteriana existe implicación vírica, se genera el complejo respiratorio porcino (CRP). En todos los casos se trata de enfermedades que afectan típicamente las fases de transición y engorde (Straw *et al.*, 1999; Sibila *et al.*, 2009).

La infección por *M. hyopneumoniae* puede cursar de forma subclínica o con una tos seca no productiva como principal signo clínico. La forma clínica puede afectar parámetros productivos tales como el índice de conversión o la ganancia media diaria de peso (Straw *et al.*, 1999; Sibila *et al.*, 2009). A nivel pulmonar, la infección por este patógeno suele dar lugar a una neumonía bronquiolo-intersticial que en asociación con otras bacterias pasa rápidamente a bronconeumonía catarral-purulenta. Como se puede apreciar en la *figura 1*, la visión macroscópica habitual de estas lesiones es de consolidación pulmonar cráneo ventral.

A nivel de campo, se han observado dinámicas de infección variables que pueden afectar la gravedad y la frecuencia de las lesiones pulmonares (Vicca *et al.*, 2002). Esta variabilidad se ha atribuido a factores tales como la presencia de coinfecciones, condiciones de manejo y estabulación y, finalmente, a la existencia de distintas cepas de *M. hyopneumoniae* que podrían tener distinta virulencia (Vicca *et al.*, 2002; Maes *et al.*, 2008). El conocimiento que se tiene hoy en día de este último factor es bastante limitado.

Entender la variabilidad entre cepas de *M. hyopneumoniae* es importante para conocer mejor la epidemiología de la infección e intentar obtener un mayor rendimiento de las herramientas de control establecidas. A continuación se revisa el conocimiento existente referente a las distintas cepas de *M. hyopneumoniae*, así como el efecto y potenciales consecuen-

cias que ello puede llegar a conllevar para el sector porcino.

### DIVERSIDAD EN MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE

Los micoplasmas, pertenecientes a la clase *Mollicutes*, se distinguen de otras bacterias por ser de pequeño tamaño y por carecer de pared celular. Debido a la ausencia de esta estructura, no son sensibles a los antibióticos que actúan bloqueando la síntesis de la pared celular, como la penicilina u otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Razin *et al.*, 1998). En 1965, Mare y Switzer en los Estados Unidos y Goodwin en Inglaterra aislaron *M. hyopneumoniae* a partir de pulmones de cerdos con neumonía. Al aislado de Mare y Switzer se le nombró cepa "11" y fue depositado en la ATCC (del inglés, *American Type Culture Collection*), mientras que al aislado de Goodwin se le llamó cepa "J" y fue depositado tanto en la ATCC como en la NCTC (del inglés, *National Collection of Type Cultures*) (Rose, 1979). La ATCC y la NCTC son colecciones de cultivos microbiológicos reconocidas internacionalmente, con su respectivo registro y certificación. Posteriormente y a partir de cerdos inoculados con un homogenizado de pulmón de un cerdo infectado con la cepa "11", se aisló una nueva cepa llamada "232" (Minion *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha postulado que la cepa



Figura 1. Visión dorsal de un pulmón de cerdo con lesiones compatibles con una infección por *M. hyopneumoniae*. Consolidación pulmonar afectando bilateralmente los lóbulos craneales (lóbulo apical, medio y borde lateral craneal del diagramático).

"11" y la cepa "J" podrían ser la misma (Calsamiglia *et al.*, 1999). Aunque esta última cepa es mundialmente reconocida como la cepa tipo (cepa que define y es representativa de una determinada especie bacteriana) (Rose, 1979), es importante mencionar que esta cepa es actualmente no patógena y que se utiliza en muchas de las bacterinas comerciales frente a *M. hyopneumoniae* (Villarreal *et al.*, 2012). A raíz de la variabilidad observada a nivel de campo en cuanto a incidencia y gravedad de lesiones, se empezó a investigar la diversidad de cepas de *M. hyopneumoniae*. Mediante técnicas de genotipado (permiten diferenciar genéticamente los aislados obtenidos a partir de muestras determinadas) tales como la secuenciación y/o el tipaje molecular, hoy en día se sabe que:

■ **A nivel individual:** un mismo animal puede estar coinfectado simultáneamente por varias cepas de *M. hyopneumoniae* (Nathues *et al.*, 2011; Vranckx *et al.*, 2011; Charlebois *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido que esta infección por distintas cepas podría dar lugar a lesiones pulmonares más graves (Villarreal *et al.*, 2009; Vranckx *et al.*, 2011). También se ha descrito que la infección con *M. hyopneumoniae* no impide la colonización posterior con una variante clonal de la cepa o con otra cepa de baja virulencia (Vranckx *et al.*, 2011; Villarreal *et al.*, 2009).

■ **A nivel de granja:** se sabe que puede haber más de una cepa en circulación pero que, en general, el brote de NE está producido por solo una cepa (Nathues *et al.*, 2011). Dentro de los factores de riesgo que podrían contribuir a la introducción de nuevas variantes de *M. hyopneumoniae* en una granja serían los sistemas de producción tradicionales (flujo continuo) y la proximidad a otras granjas (Nathues *et al.*, 2011; Charlebois *et al.*, 2014).

■ **A nivel territorial:** se han descrito diferencias en cuanto a la variedad de cepas circulantes entre países, zonas geográficas e incluso entre granjas de un mismo país. Por el momento no se ha detectado ninguna relación entre cepa y origen geográfico (Dos Santos *et al.*, 2015).

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos a partir de técnicas de genotipado, es común la construcción de dendrogramas filogenéticos (*figura 2*), herramienta que aporta información sobre la semejanza genética entre distintas cepas.

## ARTÍCULOS

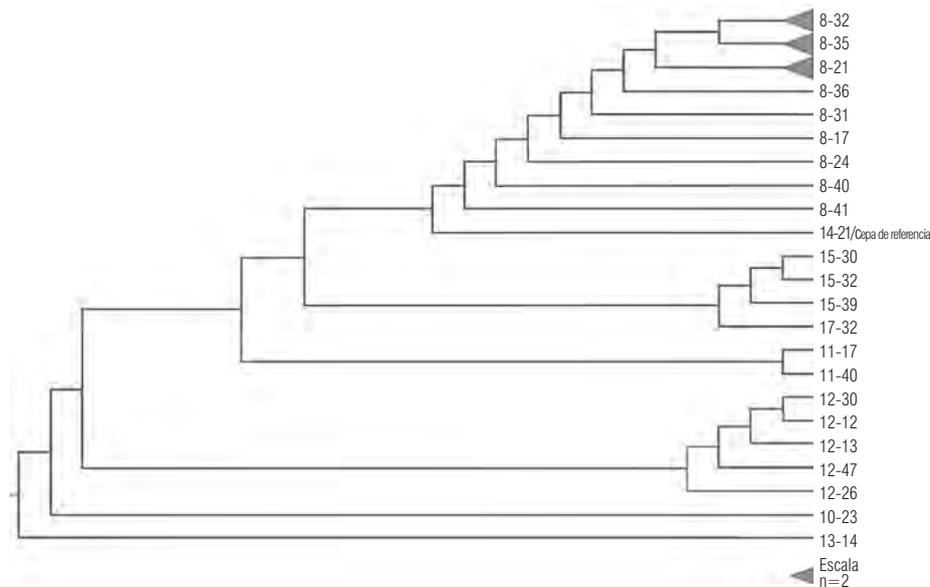


Figura 2. Dendrograma filogenético que muestra la semejanza entre las cepas de *M. hyopneumoniae* aisladas en 25 muestras de pulmón procedentes de 24 granjas españolas. Se identificaron 22 cepas distintas. El triángulo gris representa cepas que han sido identificadas en dos muestras de pulmón procedentes de distintos animales.

Fuente: Dos Santos *et al.*, 2015. Reproducido de la revista *Veterinary Microbiology*, con el permiso de Elsevier.

## VARIABILIDAD DE CEPAS DE *M. HYOPNEUMONIAE*

Una vez demostrada la existencia a nivel del campo de distintas cepas de *M. hyopneumoniae*, se analizaron las diferencias existentes entre ellas (caracterización de las cepas) y aquellos factores que más podrían estar influenciando su capacidad patogénica.

### Caracterización de las cepas de *M. hyopneumoniae*

En muchas especies, las diferencias en patogenicidad u otros aspectos biológicos entre cepas se corresponden con diferencias significativas a nivel del genoma (Pinto *et al.*, 2009). Hoy en día, se ha secuenciado el genoma completo de las cepas “J”, “232” y otras dos cepas aisladas posteriormente a las anteriores, llamadas “7448” y “168” (Minion *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, no se han identificado diferencias genéticas significativas entre la cepa J (actualmente considerada no patógena) y las cepas patógenas “232” y “7448” (Vasconcelos *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2009).

Además de la caracterización a nivel genético, algunas cepas de *M. hyopneumoniae* también se han caracterizado según su virulencia. En un estudio, se aislaron distintas cepas de *M. hyopneumoniae* a partir de pulmones de cerdos con lesiones compatibles con NE que se clasificaron (en

función del grado de las lesiones macroscópicas observadas) en alta, moderada o baja virulencia. A posteriori, mediante una inoculación experimental, se observó que solo las cepas de alta y moderada virulencia presentaban un fragmento de ADN de 5.000 pares de bases (bp) (Vicca *et al.*, 2003). Aunque se especuló que el fragmento en cuestión se podría utilizar como marcador de virulencia, posteriormente no se pudo confirmar (Nathues *et al.*, 2011). Además, este fragmento también fue detectado en la cepa “J”, actualmente no patógena (Calus *et al.*, 2007). De forma similar, en otro estudio observaron que las cepas procedentes de animales con lesiones pulmonares menos graves mostraban un patrón molecular distinto al de las cepas causantes de lesiones neumónicas más graves (Charlebois *et al.*, 2014). Aun así, la asociación directa entre heterogeneidad genética y patogenicidad es un tema que continua siendo controvertido.

### Posibles factores determinantes de la virulencia en cepas de *M. hyopneumoniae*

Ante la posible existencia de cepas de *M. hyopneumoniae* con distinto grado de virulencia, varios estudios han analizado los posibles factores causantes de tales diferencias. A continuación se resumen los principales factores estudiados hasta el momento:

■ **Adhesión:** la infección por *M. hyopneumoniae* se inicia con la adhesión a los cilios del epitelio del tracto respiratorio porcino, dañándolos y causando alteración de la respuesta inmunitaria en la zona (Straw *et al.*, 1999). Por ello, se intentó correlacionar la virulencia de la cepa con su capacidad de adhesión, con la hipótesis de que aquellas cepas más virulentas tendrían mayor capacidad para adherirse al epitelio respiratorio. Tal hipótesis no fue confirmada al no observarse diferencias en cuanto a la adhesión entre cepas de alta y baja virulencia (Meyns *et al.*, 2007). No obstante, recientemente se ha demostrado una mayor expresión *in vitro* de proteínas relacionadas con la adhesión y la colonización del tracto respiratorio porcino en cepas virulentas en comparación con cepas menos virulentas (Li *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009). Aunque este último estudio soportaría la hipótesis anteriormente indicada, se requerirían más estudios para poder demostrarla inequívocamente.

■ **Multiplicación:** se ha descrito que las cepas de alta virulencia tienen mayor capacidad de multiplicación a nivel pulmonar que las cepas de baja virulencia (Woolley *et al.*, 2012). En varios estudios, la cantidad de *M. hyopneumoniae* en pulmón se ha correlacionado positivamente con la gravedad de las lesiones pulmonares. Además, en una infección experimental comparativa, la cepa de alta virulencia se halló no solamente en pulmón, sino también en órganos internos tales como hígado, bazo y riñón. En cambio, la cepa de baja virulencia solo fue detectada en pulmón (Woolley *et al.*, 2012). Aunque la diseminación sistémica de *M. hyopneumoniae* parece ser transitoria y no se ha asociado nunca a presencia de lesiones (Le Carrou *et al.*, 2006; Marois *et al.*, 2007; Woolley *et al.*, 2012; Marchioro *et al.*, 2014), dicho hallazgo cambiaría el paradigma de la patogenia de este microorganismo, hasta el momento considerado un patógeno exclusivamente respiratorio. Por tanto, sería necesario realizar más estudios sobre la potencial diseminación sistémica de la infección por *M. hyopneumoniae*.

■ **Inmunogenicidad:** la respuesta inmunitaria frente a *M. hyopneumoniae* tiene un rol importante en el desarrollo de las lesiones pulmonares y se ha observado que las cepas más virulentas inducen respuestas inmunitarias proinflamatorias locales más potentes (Woolley *et al.*, 2012).

## ARTÍCULOS

■ **Adaptación al medio de cultivo:** mientras que en las cepas de alta virulencia se ha observado una mayor expresión de proteínas relacionadas con la adhesión y la colonización, en las cepas menos virulentas predomina la expresión relacionada con el metabolismo y el crecimiento (Li *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009). Así pues, parece que aquellas cepas que desvían la expresión genética hacia el crecimiento y hacia una mejor adaptación a los medios de cultivo podrían estar perdiendo patogenicidad al dejar en segundo lugar la expresión de ciertos factores de virulencia. Esto concordaría con la reducción de la virulencia de ciertas cepas de *M. hyopneumoniae* debido a su mantenimiento perpetuado en subcultivos. Hay que tener presente que estos estudios se han desarrollado *in vitro* y que la expresión proteica de *M. hyopneumoniae in vivo* podría ser diferente.

Las diferentes características que se han descrito experimentalmente entre cepas de *M. hyopneumoniae* de alta y baja virulencia se muestran resumidas en la *tabla 1*.

### CONSECUENCIAS DE LA VARIABILIDAD EN *M. HYOPNEUMONIAE* EN EL SECTOR PORCINO

La existencia de distintas cepas de un patógeno puede tener grandes repercusiones para el sector porcino a nivel de eficacia

de los métodos de control/prevención (vacunación y tratamiento con antibióticos) y de la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico.

#### Eficacia de las medidas de control/prevención

■ **Vacunación:** la variación antigénica es la habilidad de un organismo unicelular de generar subpoblaciones (cepas) que expresan diferencias en sus componentes de superficie (Citti *et al.*, 2010). En el caso de *M. hyopneumoniae*, se han descrito diferencias antigénicas entre varias cepas (Calus *et al.*, 2007). Este fenómeno podría conllevar que el repertorio de anticuerpos generados frente la cepa vacunal no reconozcan las cepas de campo circulantes en la misma extensión. A pesar de ello, en un estudio experimental se comparó la protección que ofrecía una vacuna homóloga (cepa vacunal idéntica a la inoculada) con una vacuna heteróloga (cepa vacunal distinta a la inoculada) y no se observaron diferencias en cuanto a protección entre los dos tipos de vacuna (Villarreal *et al.*, 2012). Por otro lado, el hecho de que se haya descrito que las cepas más virulentas son aparentemente más inmunogénicas, también podría tener consecuencias en términos de vacunación. En otro estudio experimental, la eficacia de una vacuna comercial fue más elevada en animales infectados con una cepa de alta virulencia

que en los infectados con una de baja virulencia (Villarreal *et al.*, 2011). Este hecho se explica probablemente porque las cepas de alta virulencia inducen un proceso proinflamatorio (y por tanto lesiones) más grave, con más probabilidad de que la vacuna pueda prevenir parte del cuadro lesional.

■ **Antibioterapia:** en la literatura hay varios artículos sobre la adquisición (*in vitro*) de resistencias por parte de diferentes cepas de campo de *M. hyopneumoniae* a macrólidos, lincosamidas y, especialmente, a fluoroquinolonas (Thongkamkoon *et al.*, 2013). Sin embargo, y por el momento, no existe ningún estudio que relacione la variabilidad genética de las cepas con la predisposición a desarrollar resistencias a antimicrobianos.

#### Sensibilidad de las herramientas diagnósticas

En la actualidad existen varias técnicas para el diagnóstico y la monitorización de la infección por *M. hyopneumoniae*, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) las más usadas. Sin embargo, ambas técnicas pueden dar lugar a resultados falsos negativos al no ser capaces de detectar la cepa implicada o los anticuerpos específicos generados frente a una determinada cepa. Es más, se desconoce si el grado de reacción a una

**Tabla 1. Características diferenciales entre cepas de *M. hyopneumoniae* de alta y de baja virulencia que se han descrito en diferentes estudios experimentales.**

	Cepas de alta virulencia	Cepas de baja virulencia
Clinica	Tos más pronunciada e inicio más temprano de los signos clínicos	Sin presencia de tos. Cuando hay tos, ésta es más leve y de inicio más tardío
Parámetros productivos	Afectación variable de la ganancia de peso diaria	En la mayoría de los casos no se ven afectados
Lesiones pulmonares	Mayor porcentaje de animales afectados. Las lesiones son más graves	Menor porcentaje de animales afectados. Las lesiones son menos graves
Seroconversión	Aparición generalmente más temprana de los anticuerpos específicos frente <i>M. hyopneumoniae</i> (seroconversión más próxima al momento de infección)	Aparición generalmente más tardía de los anticuerpos específicos frente <i>M. hyopneumoniae</i> (seroconversión más alejada al momento de infección)
Inmunogenicidad	Producen una respuesta proinflamatoria más potente, implicando una mayor producción de citoquinas e infiltración de células inflamatorias a nivel local	La respuesta proinflamatoria desarrollada es menos potente
Multiplicación	Mayor tasa de multiplicación y posible diseminación a otros órganos internos	Tasa de multiplicación más baja. No se ha descrito diseminación a otros órganos internos
Transmisión	Sin diferencias significativas	
Adhesión	Sin diferencias significativas	
Adaptación al medio de cultivo ( <i>in vitro</i> )	Mayor expresión de proteínas relacionadas con la adhesión y colonización del tracto respiratorio porcino	Mayor expresión de proteínas relacionada con el metabolismo y el crecimiento

técnica serológica realmente se correlaciona con el repertorio de anticuerpos que genera una cepa en concreto, dado que en general estas técnicas detectan proteínas concretas de una cepa específica.

## CONCLUSIÓN

Las enfermedades asociadas a la infección por *M. hyopneumoniae* siguen

siendo un problema importante para la producción porcina mundial. Entre los posibles factores causantes de esta elevada prevalencia, está la existencia de distintas cepas de *M. hyopneumoniae* con distinto grado de virulencia y, quizás, distinta capacidad de mantenerse y transmitirse dentro de la población porcina. Habiéndose confirmado la exis-

tencia de una gran variedad de cepas circulantes e incluso que un cerdo puede estar infectado por más de una cepa simultáneamente, los brotes de NE parecen estar asociados a una única cepa. Sin embargo, hoy en día, la importancia de dicha variabilidad así como las implicaciones para el sector porcino están aún por determinar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Calsamiglia MC. Development and application of molecular diagnostic techniques for *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. Ph.D. Thesis. University of Minnesota. 1999 Jan.
- Calus D, Baele M, Meyns T, de Kruijff A, Butaye P, Decostere A, Haesebrouck F, Maes D. Protein variability among *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *Vet Microbiol*. 2007 Mar 10; 120(3-4):284-91.
- Charlebois A, Marois-Créhan C, Hélie P, Gagnon CA, Gottschalk M, Archambault M. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Vet Microbiol*. 2014 Jan 31; 168(2-4):348-56.
- Citti C, Nouvel LX, Baranowski E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. 2010 Jul; 5(7):1073-85.
- Dos Santos LF, Sreevatsan S, Torremorell M, Moreira MA, Sibila M, Pieters M. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Vet Microbiol*. 2015 Feb 25; 175(2-4):374-81.
- Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the parC gene. 2006 Jun; 50(6):1959-66.
- Li YZ, Ho YP, Chen ST, Chiou TW, Li ZS, Shiuu D. Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochemistry (Mosc)*. 2009 Feb; 74(2): 215-20.
- Liu W, Feng Z, Fang L, Zhou Z, Li Q, Li S, Luo R, Wang L, Chen H, Shao G, Xiao S. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J Bacteriol*. 2011 Feb; 193(4):1016-7.
- Maes D, Segalés J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*. 2008 Jan 25; 126(4): 297-309.
- Marchioro SB, Sácristan RP, Michiels A, Haesebrouck F, Conceição FR, Dellagostin OA, Maes D. Immune responses of a chimeric protein vaccine containing *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and LTB against experimental *M. hyopneumoniae* infection in pigs. *Vaccine*. 2014 Aug 6; 32(36):4689-94.
- Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol*. 2007 Feb 25; 120(1-2):96-104.
- Meyns T, Maes D, Calus D, Ribbens S, Dewulf J, Chiers K, de Kruijff A, Cox E, Decostere A, Haesebrouck F. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Vet Microbiol*. 2007 Feb 25; 120(1-2):87-95.
- 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 Nov; 186(21):7123-33.
- Nathues H, Beilage EG, Kreienbrock L, Rosengarten R, Spersger J. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet Microbiol*. 2011 Sep 28; 152(3-4):338-45.
- Pinto PM, Klein CS, Zaha A, Ferreira HB. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci*. 2009 Dec 21; 7:45.
- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Dec; 62(4):1094-156.
- Rose DL, Tully JG and Wittler RG. Taxonomy of some swine mycoplasmas: *Mycoplasma suis* pneumoniae Goodwin *et al.* 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mare and Switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* Meyling and Friis 1972. *Int J Syst Bacteriol*. 1979 Apr. p.83-91.
- Sibila M, Pieters M, Molitor T, Dominiek M, Haesebrouck F, Segalés J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet J*. 2009 Sep; 181(3):221-31.
- Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Diseases of swine, 8th edition. Iowa State University Press, Ames, 1999.
- Thongkamkoon P, Narongsak W, Kobayashi H, Pathanasophon P, Kishima M, Yamamoto K. *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates and occurrence of fluoroquinolone, macrolides and lincomycin resistance. *J Vet Med Sci*. 2013; 75(8):1067-70.
- Vasconcelos ATR, Ferreira HB, Bizarro CV, *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 Aug; 187(16):5568-5577.
- Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, de Kruijff A. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002 Sep; 49(7):349-53.
- Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruijff A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol*. 2003 Dec 30; 97, 177-190.
- Villarreal I, Maes D, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine*. 2011 Feb 17; 29, 1731-1735.
- Villarreal I, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F, Maes D. Effect of challenge of pigs previously immunised with inactivated vaccines containing homologous and heterologous *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *BMC Vet Res*. 2012 Jan 6; 8:2.
- Vranckx K, Maes D, Calus D, Villarreal I, Pasmans F, Haesebrouck F. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *J Clin Microbiol*. 2011 May; 49(5):2020-3.
- Vranckx K, Maes D, Sácristan Rdel P, Pasmans F, Haesebrouck F. A longitudinal study of the diversity and dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pig herds. *Vet Microbiol*. 2012 May 4; 156(3-4):315-21.
- Woolley LK, Fell S, Gonsalves JR, Walker MJ, Djordjevic SP, Jenkins C, Earmens GJ. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Vet Microbiol*. 2012 Dec 28; 161(1-2):186-95.