

# DIVERSIDADE GENÉTICA DE MYCOPLASMA SYNOVIAE NO BRASIL

DENIS WILLIAN DA SILVA<sup>1</sup>  
ALINE PADILHA DE FRAGA<sup>2</sup>  
NILO IKUTA<sup>3</sup>  
EDMUNDO KANAN MARQUES<sup>4</sup>  
VAGNER RICARDO LUNGE<sup>5</sup>

## RESUMO

*Mycoplasma synoviae* (MS) é um agente infeccioso que acomete galinhas e perus, podendo causar doença respiratória crônica e sinovite infecciosa com graus variados de manifestações clínicas. Esta espécie possui diferentes cepas que podem ser caracterizadas por técnicas de análise genética. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade de um gene específico (*vlhA*) em amostras de MS de granjas de produção de aves de diferentes locais do Brasil. Amostras de traquéias foram obtidas de aves de 35 lotes de granjas positivas para MS de diferentes estados do país. DNA total destas amostras foi extraído pela metodologia de sílica e após foi realizada dupla amplificação de uma região variável (284 a 341 pares de bases - pb) da extremidade 5' do gene *vlhA* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (nested-PCR). As amostras positivas foram sequenciadas e analisadas comparativamente para a construção da árvore filogenética e avaliação do tamanho de uma região interna específica (PRR). Os resultados demonstraram a ocorrência de 16 diferentes sequências de aminoácidos nas 35 amostras avaliadas e a análise filogenética mostrou a ocorrência de 8 diferentes clados. A sequência de aminoácidos da respectiva cadeia polipeptídica também apresentou diversidade entre as amostras. A região variável PRR foi a que apresentou maior polimorfismo e as amostras foram classificadas em 5 tipos previamente caracterizados (A, C, D, E e F) e um novo tipo (G) encontrado em amostras de granjas do estado do Rio Grande do Sul. Estes resultados demonstraram que as amostras de MS de granjas de produção avícola do Brasil apresentam diversidade no gene *vlhA*.

**Palavras-chave:** *Mycoplasma synoviae*, *vlhA*, hemaglutinina, PCR, DNA.

## ABSTRACT

*Mycoplasma synoviae* (MS) is an infectious agent that affects chickens and turkeys, causing chronic respiratory disease and infectious synovitis with different clinical manifestations. This species has different strains that can be characterized

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

<sup>3</sup> Professor do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA

<sup>4</sup> Professor de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético Molecular

<sup>5</sup> Professor-Orientador do Curso de Medicina Veterinária/ULBRA (lunge@ulbra.br)

by genetic analysis. The objective of this study was to analyze the diversity of one specific gene (*vlhA*) in MS samples of poultry farms from different Brazilian states. Trachea samples were obtained from 35 flocks of MS positive farms from 7 different states. Total DNA was extracted from these samples by the methodology of silica and amplification of a region of variable size (284-341 base pairs-bp) of the *vlhA* gene was carried out by nested polymerase chain reaction (nested-PCR) technique. Positive samples were sequenced and comparatively analyzed for phylogenetic analysis and determination of the number of the amino acid residues in the proline rich region (PRR). The results demonstrated the occurrence of 16 different amino acid sequences among the 35 samples and 8 different clades were observed in the phylogenetic analysis. The amino acid sequence analysis also showed diversity among the samples. Polymorphism was observed in the PRR and the samples were classified into 5 types previously identified (A, C, D, E and F) and one new type (G). This new type was found in 2 industrial poultry flocks from the Rio Grande do Sul state. These results showed that MS samples from industrial poultry flocks in Brazil presented diversity in the *vlhA* gene.

**Keywords:** *Mycoplasma synoviae*, *vlhA*, hemagglutinin, PCR, DNA.

## INTRODUÇÃO

*Mycoplasmas* são pequenos procariotos que não possuem parede celular. Essas bactérias são classificadas no gênero *Mycoplasma* que pertence à classe Mollicutes (divisão Tenericutes) (KLEVEN, 2008). *Mycoplasma synoviae* (MS) é um importante patógeno que acomete galinhas e perus podendo causar uma diversidade ampla de sinais clínicos, mas que está associado principalmente à doença respiratória crônica e sinovite infecciosa. Estas doenças podem levar à queda na produção e na eclodibilidade de ovos, baixa eficiência alimentar, altas taxas de mortalidade e condenação de carcaças, resultando em perdas econômicas importantes nas granjas avícolas (NASCIMENTO; PEREIRA, 2009).

Característica importante do MS é a hemaglutinação de eritrócitos de galinhas e perus. Antígenos de hemaglutinina são usados em testes sorológicos de inibição de hemaglutinação (SARP, soroglutinação rápida em placas) na detecção laboratorial de MS (KLEVEN, 2008). A triagem por SARP é amplamente utilizada na rotina de laboratórios avícolas, porém esta técnica normalmente não detecta infecções subclínicas (KLEVEN, 2001). A identificação de MS por cultura tem se mostrado inviável, já que este teste é demorado e muitas vezes inconclusivo, e a detecção direta de regiões do genoma deste patógeno pela reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) tem sido a principal alternativa na análise laboratorial. Existem diversas metodologias de PCR para detecção de MS, envolvendo diferentes procedimentos analíticos. Estes testes detectam diferentes genes alvo, inclusive o gene que codifica a hemaglutinina: *vlhA* (HAMMOND et al., 2009).

A hemaglutinina é uma lipoproteína de superfície formada por duas partes (uma porção N-terminal

denominada MSPB e outra C-terminal identificada como MSPA) geradas a partir da clivagem da poliproteína precursora *VlhA* (NOORMOHAMMADI et al., 1998). Esta lipoproteína tem um papel essencial na infecção, pois está envolvida diretamente na aderência do MS à célula hospedeira (BENCINA et al., 1999). A síntese desta proteína ocorre a partir de um único promotor do gene *vlhA* que está localizado ao lado de um grande número de pseudogenes em uma região de aproximadamente 69.000 pares de bases no genoma do *Mycoplasma synoviae* (MAY; BROWN, 2011). A região mais próxima da extremidade 5' do gene *vlhA* está presente como uma única cópia no cromossomo que não recombina com pseudogenes, enquanto a região da extremidade 3' pode ser eventualmente substituída pela sequência de um pseudogene. Desta forma, a recombinação do gene *vlhA* com qualquer um dos pseudogenes pode gerar uma nova variante gênica e conseqüentemente variantes antigênicas. Devido a este mecanismo genético, existe uma grande diversidade de hemaglutininas em cepas de MS de diferentes localidades (NOORMOHAMMADI et al., 2000).

A caracterização da sequência de DNA do gene *vlhA* que codifica a região N-terminal da proteína hemaglutinina (MSPB) tem sido útil na tipificação de amostras de campo de MS em outros locais do mundo (BENCINA et al., 1999; BENCINA et al., 2001; HONG et al., 2004; HAMMOND et al., 2009). Esta região mais conservada do gene *vlhA* apresenta uma boa diversidade para caracterização de MS devido à uma porção de tamanho variável conhecida como região rica em prolina (PRR, *proline rich region*) (HAMMOND et al., 2009). O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade da porção que codifica MSPB do gene *vlhA* de amostras de MS presentes nas granjas de produção de aves de diferentes locais do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram obtidas amostras de traquéias e/ou *swabs* de traquéias de galinhas (10 amostras por lote) de 35 granjas de produção avícola de 7 diferentes estados brasileiros (Tabela 1). Essas amostras foram previamente analisadas por uma empresa de análises laboratoriais (Simbios Biotecnologia) e apresentaram resultado positivo na detecção de MS pela técnica de PCR.

### Extração e amplificação por PCR

As amostras de galinhas foram submetidas à extração de DNA em *pools* (até 10 *swabs* de traqueias por tubo) pela metodologia de sílica (BOOM et al., 1990). Os DNAs extraídos foram submetidos à amplificação pela técnica de *nested*-PCR (dupla amplificação), tendo como alvo a região 5' do gene *vlhA* que codifica a porção N-terminal da proteína (MSPB). Na primeira amplificação foram utilizados os *primers* (iniciadores) MS-F1 (5'-ATT AGC AGC TAG TGC AGT GGC-3') e MS-R1 (5'-CAG CGC TAG TTT TTG TTT TTT GG-3') e na segunda amplificação (*nested*) os *primers* MS-F2 (5'-GGT GAT CAA ACT CCA GCA CC-3') e MS-R3 (5'-AGT AAC CGA TCC GCT TAA TGC-3') que delimitam uma região de tamanho variável no genoma (284 a 341 pares de bases, conforme a cepa de MS). Para cada reação foi utilizado um *Master Mix* (mistura máster) com água e os seguintes reagentes em concentrações padronizadas: tampão de reação, cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), enzima *Taq Polimerase* (5U/ $\mu$ L), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e o respectivo par de *primers* (MS-F1 e MS-R1 utilizados na primeira amplificação, MS-F2 e MS-R3 utilizados no *nested*). Em cada tubo de reação foram utilizados 2  $\mu$ L de amostra de DNA (a partir do material extraído na primeira amplificação e amplicon no *nested*) em um volume final de 30  $\mu$ L de reação. Em todos os experimentos de amplificação foram utilizados controles positivo (DNA da cepa vacinal MS-H) e negativo (água). As amplificações foram realizadas em termociclador com as mesmas condições na primeira e segunda amplificação: um ciclo de 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 40 segundos, 72°C por 60 segundos e um ciclo de 72°C por 5 minutos no final. As amostras foram então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, para visualização do tamanho dos fragmentos amplificados (amplicons).

### Sequenciamento

As amostras positivas (presença de amplicon de 284 a 341 pares de bases no gel de poliacrilamida) foram

submetidas a sequenciamento das duas fitas de DNA. Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amplicon, utilizando-se os iniciadores senso (MS-F2) e antisenso (MS-R3). Em todos os casos, os DNAs-moldes (15 – 30ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do iniciador e 4  $\mu$ L do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) em um volume final de 20  $\mu$ L.

As reações de sequenciamento foram realizadas em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Carlsbad, Estados Unidos) com uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 40 ciclos de 95°C por 10s, 57,5°C por 30s e 72°C por 240s. As amostras foram purificadas pelo protocolo de etanol/EDTA/acetato de sódio e duas lavagens do *pellet* (sedimento) com etanol 96% e 70%, respectivamente. Os produtos precipitados foram diluídos em formamida Hi-Di, desnaturados a 95°C por 2 min, resfriados em gelo por 2 min e eletroinjetados no sequenciador automático ABI 3130 XL *Genetic Analyzer* de 16 capilares (36 cm) e polímero POP 7 (Applied Biosystems, Carlsbad, Estados Unidos).

Os dados do sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v1.0.1* com os parâmetros *Dye Set "Z"*. Após foram analisados os eletroferogramas com o software *Sequencing Analysis v.5.3.1* (Applied Biosystems, Carlsbad, Estados Unidos) avaliando-se os seguintes parâmetros: dados brutos (*raw data*), eletroferograma, EPT e valor de qualidade (QV, *quality value*) das bases sequenciadas. As sequências senso e antisenso obtidas de cada fragmento amplificado foram comparadas para produzir uma sequência consenso com o programa *SeqMan* e editadas com o programa *EditSeq* (DNASTAR Inc., Madison, Estados Unidos), preservando a região interna e retirando a sequência dos *primers*.

### Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos

As sequências das amostras de MS do presente estudo foram analisadas comparativamente com as seguintes sequências de cepas de referência obtidas no banco de dados Genbank: WVU 1853 (AM998371), B 13/96/P1 (AJ580987), B48/05 (FM164344), B11/85 (FM164346), B91/96/798 (FM164349), B142/02 (AJ580989), B44/04 (FM164369), B38/96/1764 (AJ580985), J15/85 (FM164346), B 133/99/5 (AJ580983) e B95/04/K261 (FM164372). Ainda foram selecionadas para o alinhamento as sequências de nucleotídeos da cepa vacinal MSH (AB501271) e uma sequência de *Mycoplasma gallisepticum* (U90714).

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas utilizando o método *ClustalW* no programa *MegaAlign* (DNASTAR Inc., Madison, Estados Unidos). As amostras do presente estudo e as sequências de referência foram analisadas comparativamente. Posteriormente as amostras foram também alinhadas no programa *BioEdit* para análise pelo método *Neighbour-Joining* com 2000 repetições e construída a árvore filogenética no programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011). Na análise dos agrupamentos na árvore filogenética, foram considerados como consistentes apenas os que tiveram um número de repetições (*bootstraps*) superior a 60.

As sequências de aminoácidos foram alinhadas e analisadas também com o método *ClustalW* usando o programa *MegaAlign* (DNASTAR, Lasergene Inc., Estados Unidos). Além disso, o polimorfismo de tamanho da região rica em prolina (PRR, *proline rich region*), situado entre os aminoácidos 25 e 73 em relação à proteína VlhA da cepa de referência WVU 1853 (HONG et al., 2004), foi avaliado visualmente. As amostras foram classificadas em grupos denominados A, B, C, D, E e F conforme descrito anteriormente (BENCINA et al., 2001; HONG et al., 2004; HAMMOND et al., 2009).

## RESULTADOS

### Amplificação e diversidade de sequência de nucleotídeos do gene *vlhA*

Todas as amostras de DNA das 35 granjas apresentaram amplificação do gene *vlhA* de MS. Os tamanhos de fragmentos amplificados (*amplicons*) variaram entre 284 e 341 pares de base (bp, *bases pairs*), sendo que 7 amostras apresentaram tamanho de 284 bp, 5 de 297 bp, 12 de 324 bp, 2 de 332 bp, 6 de 335 bp e 3 de 341 bp (Tabela 1).

A análise comparativa das sequências revelou a existência de diversidade no fragmento do gene *vlhA* analisado em amostras de MS de diferentes granjas industriais no Brasil, com a observação de inserções/deleções (INDELS) e de mutações de ponto. Em comparação com a cepa de referência WVU1853, 3 amostras tiveram o mesmo tamanho de fragmento (341 bp), enquanto as demais apresentaram deleções de tamanhos variáveis. Estas deleções localizavam-se na extremidade 5' do fragmento amplificado, justamente na porção que codifica a PRR, e variaram de tamanho entre 6 e 57 bp. O tamanho da região que codifica para a PRR foi estimado entre 57 e 114 bp, sendo que o fragmento de 114 bp é equivalente à região PRR do gene *vlhA* da

cepa de referência WVU1853 (Tabela 1). Também foram observadas mutações de ponto em diferentes locais de toda a sequência amplificada (dados na mostrados).

A análise filogenética revelou que as 32 amostras apresentaram 16 sequências diferentes que agruparam em 8 diferentes clados (identificados de C1 a C8) mais 3 amostras isoladas (SB552, SB4905 e ID4646) (Figura 1). Em apenas um destes clados (C3), amostras de MS de granjas do Brasil (ID5672, ID5785 e ID5786) apresentaram 100% de similaridade com uma das cepas de referência (WVU1853). Os demais clados e amostras isoladas não apresentaram identidade com cepas de referência, embora em alguns casos a similaridade de nucleotídeos foi acima de 90% e conseqüentemente a distância na árvore filogenética foi menor, inclusive com a formação de ramos próximos com as cepas de referência (como C5 com J15-85, C7 com B13-96-P1 e SB552 com B91-96-798 e B142-02). Já a classificação em grandes grupos não foi consistente (valores de *bootstrap* abaixo de 50), provavelmente devido ao pequeno tamanho do fragmento analisado e presença de INDELS.

Os clados formados também apresentaram relação com a origem das amostras. Em geral, amostras de MS de lotes de uma mesma granja agruparam em um mesmo clado. O C3 é composto por amostras da granja Industrial da empresa I do estado de Goiás, o C5 por amostras de lotes (Lote 266, Lote 270, Lote 271 e Lote 274) da empresa IV do estado do Ceará, e o C7 por amostras de lotes (Aviários 07, 09, 10 e 14) da empresa IX do estado de São Paulo. Em duas situações, diferentes *pools* de amostras coletados dos mesmos lotes apresentaram inclusive a mesma sequência de MS ("Lote 270" da empresa IV do Ceará, "Aviário 07" da empresa IX de São Paulo). Entretanto, também foram observadas amostras de MS de uma mesma granja em clados distintos. As amostras da empresa I de Goiás foram encontradas em 4 clados (C2, C3, C6 e C8), as da empresa IV do estado do Ceará em 2 clados (C5 e C6) e da empresa IX de São Paulo em 2 clados (C6 e C7). Além disso, 2 *pools* de amostras coletados do mesmo lote ("Aviário 09" da empresa IX de São Paulo) apresentaram diferentes sequências de MS, demonstrando a provável ocorrência de mais de uma cepa de MS em um mesmo lote.

### Análise da sequência de aminoácidos e classificação em tipos

A sequência parcial de aminoácidos da região N-terminal da proteína VlhA (conhecida como MSPB) também demonstrou diversidade. As amostras de MS do Brasil apresentaram similaridade entre 85,9 e

100%. Curiosamente, a menor similaridade (85,9%) ocorreu entre amostras de uma mesma empresa, mas que eram de diferentes granjas (ID4646 e ID5672). A região variável PRR foi a que apresentou maior polimorfismo, principalmente devido às deleções de diferentes tamanhos observados em relação à sequência WVU1853. Conforme o número de resíduos de aminoácidos e consequentemente do tamanho da região PRR, as amostras foram classificadas em diferentes tipos (Tabela 1). Foram encontradas 3 (8,6%) amostras do tipo A, 11 (31,4%) do C, 5 (14,3%) do D, 7 (20,0%) do E e 7 (20,0%) do F. Além disso, foram observadas 2 (5,7%) amostras (SB5653 e SB5654) com um total de 35 resíduos de aminoácidos (correspondente a 105 nucleotídeos) na PRR que foram classificadas no novo tipo G, pois não existia nenhum tipo previamente descrito com este número de resíduos. Estas amostras foram obtidas de 2 lotes de uma mesma empresa (X) do estado do Rio Grande do Sul.

## DISCUSSÃO

Os primeiros estudos, realizados com técnicas de hibridização DNA-DNA, demonstravam uma baixa heterogeneidade genética entre isolados de MS (YOGEV et al., 1988). Posteriormente foi verificado que a região do genoma que codifica a hemaglutinina apresenta uma grande variabilidade de sequências entre cepas (BENCINA et al., 2001). A diversidade do gene que codifica para esta proteína (*vlhA*) foi observada em estudos distintos utilizando isolados de MS de diferentes origens geográficas. Estes isolados foram classificados em grupos com base na análise das sequências e no tamanho da sequência de nucleotídeos do fragmento amplificado ou da região do motivo PRR (HONG et al., 2004; HAMMOND et al., 2009).

As amostras de MS obtidas de lotes do Brasil e analisadas no presente estudo demonstraram um elevado polimorfismo do gene *vlhA*, com a formação de clados distintos na árvore filogenética e a obtenção de amplicons com diferentes tamanhos. A análise comparativa das sequências demonstrou a ocorrência de 3 bactérias com o mesmo padrão da cepa WVU1853, entretanto as demais 32 sequências não agruparam com nenhuma cepa de referência, incluindo a cepa vacinal MS-H (Figura 1). A ocorrência de 16 sequências distintas demonstra uma elevada diversidade do gene *vlhA* nas amostras de MS caracterizadas. Esta diversidade também foi observada em 3 outros estudos prévios. Bencina et al. (2001) compararam sequências de 30 cepas de MS de frangos e perus e demonstraram 11 tipos diferentes de sequências *vlhA*. Hong et al. (2004) encontraram 14 diferentes

grupos entre 43 cepas da mesma espécie. A maioria das cepas em ambos os estudos eram originadas nos EUA e Eslovênia. Já Hammond et al. (2009) analisaram 41 cepas, com origem no Reino Unido e Hungria, que foram classificadas em 12 grupos.

Bencina et al. (2001) propuseram a tipificação das cepas de MS e classificação em diferentes grupos e subgrupos com base na análise do número de resíduos de aminoácidos da PRR. A utilização deste critério permitiu a observação de diversos grupos classificados em até 6 tipos principais (A, B, C, D, E e F) em estudos subsequentes (HONG et al., 2004, HAMMOND et al., 2009). No presente estudo, 33 amostras de MS foram classificadas em 5 destes tipos previamente caracterizados (A, C, D, E e F), sendo que o único tipo não encontrado foi o B. Em estudos prévios, o tipo B também não foi encontrado em amostras de MS isoladas de lotes de aves nos últimos anos. Até hoje apenas duas amostras de referência (K1968 e K48621, isoladas no estado do Colorado nos Estados Unidos no século passado) foram identificadas com 45 aminoácidos na PRR (HONG et al., 2004). A frequência dos demais tipos no presente estudo (em primeiro C, seguida dos tipos E e F, D e A) também foi bastante similar à encontrada nos trabalhos prévios, que identificaram predominância de C, depois E/F e, em índices menores, A e D (HONG et al., 2004, HAMMOND et al., 2009). Também foram encontradas duas amostras de MS no presente estudo que apresentaram 35 resíduos de aminoácido na PRR. Como ainda não havia nenhum tipo com este tamanho, o presente trabalho propõe a inclusão de um novo tipo (G). A descoberta de novos tipos não é inesperada, principalmente devido à característica de recombinação desta região do genoma. Embora a extremidade 5' do gene *vlhA* normalmente não recombinem com os pseudogenes, a proximidade da região de recombinação pode levar a situações eventuais com a geração de novas variantes gênicas. Foi provavelmente esta situação que fez com que esta região N-terminal (MSPB) também apresente diversidade, embora seja bem menor que a região C-terminal (MSPA) (NOORMOHAMMADI et al., 2000).

Em conclusão, o presente trabalho demonstra que existe diversidade genética nas amostras de MS presentes em lotes de produção avícola industrial no Brasil. Especificamente o gene *vlhA* é altamente variável e novas pesquisas devem ser realizadas para avaliar se existe relação entre a diversidade deste gene e patogenicidade. Estudos anteriores já mostraram que a lipoproteína de superfície codificada por este gene (*VlhA*) está diretamente envolvida na interação entre MS e as células do hospedeiro e que determinadas cepas (como por exemplo a K1968, que possui 45 aminoácidos

na PRR) parecem ser mais patogênicas que as demais (LOCKABY et al., 1998). A análise da sequência deste gene também deve ser uma estratégia importante em estudos epidemiológicos moleculares de MS em aves, podendo indicar rotas de disseminação e focos de transmissão deste patógeno. Além disso, a observação

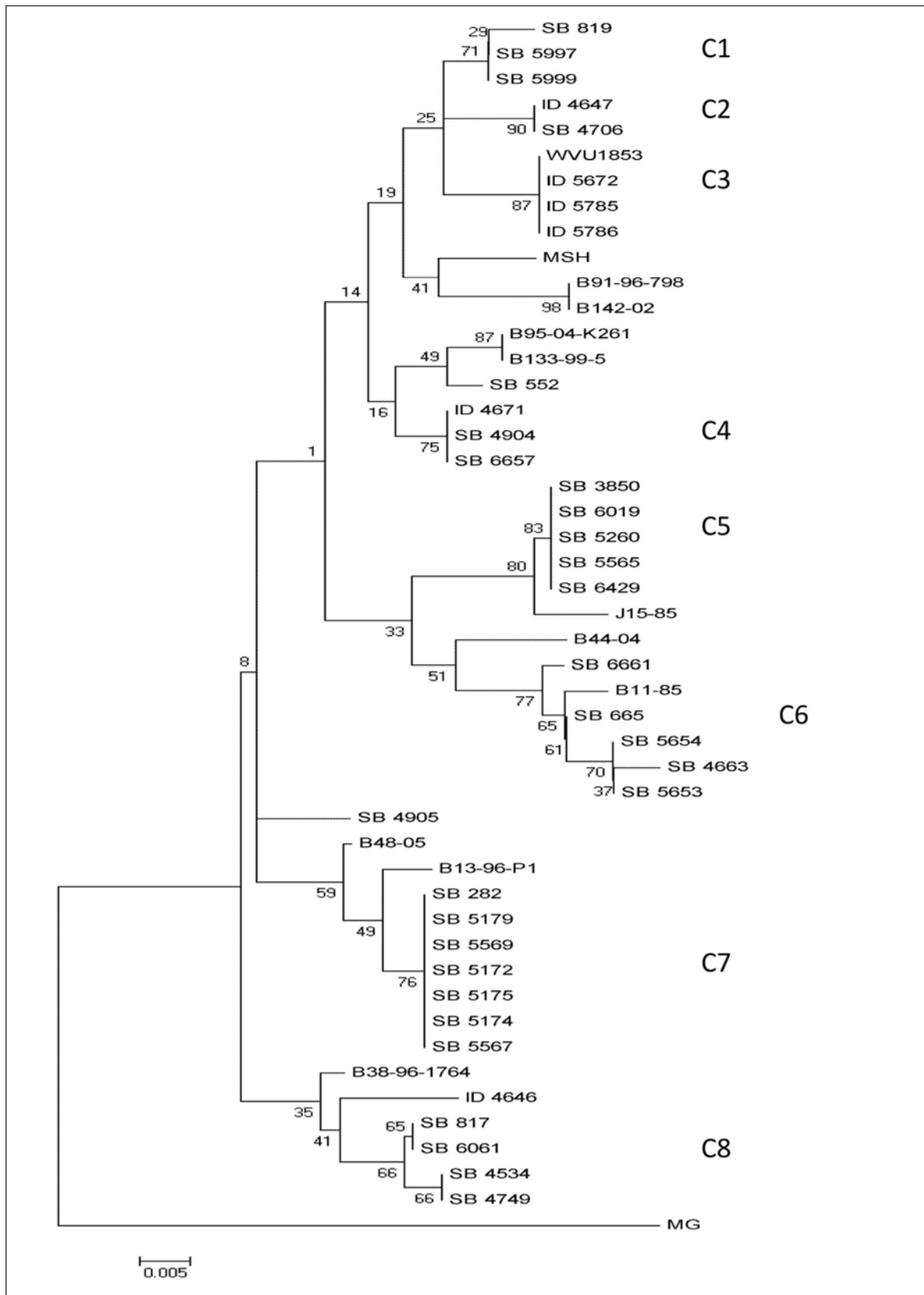
de que todas as amostras de MS possuem sequência do gene *vlhA* diferente da cepa vacinal MS-H também aponta para a possibilidade de desenvolvimento de teste laboratorial de biologia molecular para a diferenciação da cepa vacinal de amostras de campo, o que seria bastante útil no monitoramento de programas de vacinação.

**Tabela 1.** Dados referentes às amostras de *Mycoplasma synoviae*.

Amostra	Empresa	Granja	Estado	Ano	Material	Amplicon (nt) <sup>1</sup>	PRR (nt) <sup>2</sup>	PRR (aa) <sup>3</sup>	Tipo <sup>4</sup>
ID5672	I	Industrial	GO	2010	Swab de traqueia	341	114	38	A
ID5785	I	Industrial	GO	2010	Swab de traqueia	341	114	38	A
ID5786	I	Industrial	GO	2010	Swab de traqueia	341	114	38	A
ID4647	I	Granja I - I2	GO	2010	Swab de traqueia	324	96	32	C
ID4671	I	Granja G - G5	GO	2010	Swab de traqueia	324	96	32	C
SB4663	I	Granja C - C7	GO	2010	Swab de traqueia	324	96	32	C
SB665	IV	Lote 263 - Galpão 02	CE	2010	Traqueia	324	96	32	C
SB6661	IX	Lote 41A	SP	2011	Swab de traqueia	324	96	32	C
SB819	V	Lote 4493/10	SP	2010	Traqueia	324	96	32	C
SB4706	VI	Lote 03/06/10	SP	2010	Traqueia	324	96	32	C
SB4904	VIII	Nova Recria	AL	2010	Traqueia	324	96	32	C
SB5997	XI	Lote M10 - 20921	RS	2010	Swab de traqueia	324	96	32	C
SB5999	XI	Lote M10 - 20827	RS	2010	Swab de traqueia	324	96	32	C
SB6657	XI	M11 - 650 - 1023	RS	2011	Swab de traqueia	324	96	32	C
ID4646	I	Granja I - I1	GO	2010	Swab de traqueia	297	69	23	D
SB6061	I	Granja 53	GO	2010	Swab de traqueia	297	69	23	D
SB817	V	Lote 4473/10	SP	2010	Traqueia	297	69	23	D
SB4534	VI	Aviários 7-B-13-15	SP	2010	Traqueia	297	69	23	D
SB4749	VII	Lote RG 2388/10	PR	2010	Traqueia	297	69	23	D
SB552	III	Lote G	DF	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB3850	IV	Lote 266	CE	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB5260	IV	Lote 270	CE	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB5565	IV	Lote 271	CE	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB6019	IV	Lote 270	CE	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB6429	IV	Lote 274	CE	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB4905	VIII	Ana Luzia	AL	2010	Traqueia	284	57	19	E
SB282	II	ATL 024/10 - D	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5172	IX	Aviário 07	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5174	IX	Aviário 09	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5175	IX	Aviário 10	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5179	IX	Aviário 14	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5567	IX	Aviário 07	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5569	IX	Aviário 09	SP	2010	Swab de traqueia	335	108	36	F
SB5653	X	A - Lote G	RS	2010	Swab de traqueia	332	105	35	G
SB5654	X	B - Lote G1	RS	2010	Swab de traqueia	332	105	35	G

<sup>1</sup> Número de nucleotídeos (nt) dos amplicons das amostras de *Mycoplasma synoviae*. <sup>2</sup> Número de nucleotídeos (nt) da região da região rica em prolina (PRR). <sup>3</sup> Número de aminoácidos da região da região rica em prolina (PRR). <sup>4</sup> Tipos A-G baseados no comprimento da região rica em prolina (PRR).

**Figura 1.** Filogenia das seqüências de nucleotídeos das amostras de MS. Árvore filogenética construída a partir da seqüência parcial de nucleotídeos do gene *v/hA* das amostras de *Mycoplasma synoviae* descritas na Tabela 1. A imagem construída foi obtida através do alinhamento realizado no Programa MEGA. Os valores de bootstraps (2000 repetições) estão expressos em cada dos pontos de ramificação dos clados formados.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENCINA, D. et al. The characterization of *Mycoplasma synoviae* EF-Tu protein and proteins involved in hemadherence and their N-terminal amino acid sequences. *FEMS Microbiology Letters*, v. 173, p.85-94,1999.
- BENCINA D. et al. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, v. 20, n. 3 , p. 115-123, set. 2001.
- BOOM R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 495-503, mar. 1990.
- HAMMOND P. P. et al. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Veterinary Microbiology*, v. 136, n. 1-2, p. 61-68, abr. 2009.
- HONG Y. et al. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Diseases*, v. 48, n. 3, p. 606-616, set. 2004.
- KLEVEN, S. H.; ROWLAND, G. N.; KUMAR, M. C. Poor serologic response to upper respiratory infection with *Mycoplasma synoviae* in turkeys. *Avian Diseases*, v. 45, p. 719-723, 2001.
- KLEVEN, STANLEY H. *Diseases of Poultry*. 12. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008.
- LOCKABY, S. B. et al. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Veterinary Pathology*, v. 35, p.178-190, 1998.
- MAY M.; BROWN D. R. Diversity of expressed *vlhA* adhesin sequences and intermediate hemagglutination phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, v. 193, n. 9, p. 2116-2121, maio 2011.
- Nascimento, E. R.; PEREIRA V. L. A. *Doenças das aves*. 2. ed. São Paulo: Facta, 2009.
- NOORMOHAMMADI, A. H. et al. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiology*, v. 35, p. 911-923, 2000.
- NOORMOHAMMADI, A. H. et al. Multigene families encoding the major hemagglutinins in phylogenetically distinct *Mycoplasmas*. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 3470-3475, 1998.
- TAMURA K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, out. 2011.
- Yogev D. et al. Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Diseases*, v.32, p 220-31. 1988.