

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**REOVIRUS AVIÁRIO COMO CAUSA DE LESÕES ARTICULARES EM  
FRANGOS DE CORTE NO BRASIL.**

**Suyene Oltramari de Souza**

Porto Alegre  
2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**REOVIRUS AVIÁRIO COMO CAUSA DE LESÕES ARTICULARES EM  
FRANGOS DE CORTE NO BRASIL.**

**Autor:** Msc. Suyene Oltramari de Souza  
Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias na área de concentração em  
Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**Orientador:** Prof. Dr. David Driemeier

Porto Alegre, 2019

SUYENE OLTRAMARI DE SOUZA

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001**

#### CIP - Catalogação na Publicação

Oltramari de Souza, Suyene  
Reovirus Aviário como causa de lesões articulares  
em frangos de corte no Brasil. / Suyene Oltramari de  
Souza. -- 2019.  
47 f.  
Orientador: David Driemeier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2019.

1. frango. 2. orthoreovirus. 3. artrite. I.  
Driemeier, David, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

REOVIRUS AVIÁRIO COMO CAUSA DE LESÕES ARTICULARES EM FRANGOS  
DE CORTE NO BRASIL.

Aprovada em: 29/04/2019

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Helton Fernandes dos Santos

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

A cada conquista e etapa concluída é importante lembrarmos da nossa caminhada, a minha sempre foi repleta de pessoas especiais. Elas serão registradas aqui, embora jamais saiam do meu coração.

Agradeço a minha família, sou muito abençoada por poder chamá-los assim. Vocês sempre serão o motivo e a força de tudo, somos muitos e somos muito amor. A Susane, que, com sua paciência e amor, sempre me mostrou a maneira de fazer tudo dar certo.

Ao Prof. David Driemeier, a imersão na rotina patológica, seus ensinamentos, sua experiência e humildade são imensuráveis e impagáveis. Sinto muito orgulho e gratidão por fazer parte da família SPV-UFRGS, obrigada pela oportunidade e por tudo. Agradeço a Profa. Luciana Sonne, e aos meus colegas do Setor de Patologia, pelos ensinamentos, convívio diário e trocas de conhecimento.

Agradeço ao Prof. Saulo Pavarini, pelo auxílio, muito conhecimento e amizade em toda a minha caminhada. Estendo meu agradecimento a todos os pesquisadores envolvidos na realização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos patológicos, que hoje são amigos de vida, Renata, Marcele, Matheus, Daniele, Bárbara, Gabriel, Gabriela, Ronaldo, Danilo e Fernando, a companhia de vocês sempre tornou o percurso mais agradável, me arriscaria a dizer que faria tudo de novo. Agradeço a minha nova equipe de trabalho na Unoesc-SMO, que me recebeu de braços abertos e que me ofereceu um firme suporte nesse novo desafio.

Agradeço aos meus amigos, que compreendem minha ausência, apoiam minha caminhada, me acolhem a qualquer momento e renovam minhas energias. Agradeço a todas as forças, as coincidências, as ajudas físicas e espirituais que contribuíram para mais uma etapa da minha evolução profissional e pessoal.

Deixo aqui a minha gratidão, espero retribuir sempre e perpetuar todas as energias, os ensinamentos e o amor que recebo de vocês.

## RESUMO

A avicultura industrial é uma importante atividade econômica no Brasil. O ortoreovírus aviário (ARV, avian orthoreovirus), pertencente à família *Reoviridae*, gênero *Orthoreovirus*, causa prejuízos no mundo todo e tem sido alvo de pesquisas em diversos países. A artrite/tenossinovite em frangos de corte é uma das principais formas de apresentação e causa de altos índices de condenações ao abate. Falhas nas vacinas convencionais e o aumento da taxa de diagnósticos nos últimos cinco anos sugerem o surgimento de cepas patogênicas em todo o mundo. Esse estudo foi realizado a partir de amostras de membros pélvicos, provenientes de um abatedouro de frangos de corte do Brasil, com índices de condenação que variaram de 5 a 60%. A idade de abate das aves era de 22 a 28 dias, e não houve correlação entre sexo. As aves não possuíam imunidade passiva, pois as matrizes não eram vacinadas. Foram avaliadas as alterações macroscópicas e histopatológicas, realizada a detecção e análise filogenética dos ARVs envolvidos nos quadros de tenossinovite, bem como exame bacteriológico. Ao exame macroscópico foi observado em todas as aves aumento de volume, edema, hemorragias e ao corte havia exsudado seroso entre os tendões e a articulação. Apesar de similares, as lesões apresentavam diferentes graus de intensidade dentro dos lotes. As alterações histológicas consistiram de hiperplasia das membranas sinoviais associada a infiltrado inflamatório misto. Observou-se necrose de fibras musculares, bem como reabsorção de fibras e infiltrado mononuclear a misto. Nos tendões, além do infiltrado inflamatório proveniente dos músculos adjacentes, foi observada a formação de agregados linfóides. No tecido subcutâneo, havia infiltrado inflamatório misto, hemorragia e deposição de fibrina. O RNA viral foi detectado em todas as cinco amostras testadas através de RT-PCR. A genotipagem, seguida de análise filogenética, foi realizada pelo sequenciamento do gene Sigma C, sendo quatro cepas agrupadas na linhagem II e uma cepa na linhagem V. Todas as amostras foram negativas no exame de PCR para *Mycoplasma synoviae* e *Mycoplasma gallisepticum*, e no cultivo bacteriano não houve crescimento significativo. Estes resultados demonstram a epidemiologia, os achados macroscópicos e microscópicos das lesões de tenossinovite associadas à presença de cepas de ARVs diferentes das cepas vacinais, destacando a ocorrência de cepas patogênicas em criações de frango de corte no Brasil.

**Palavras-chaves:** frango, orthoreovirus, artrite

## ABSTRACT

*Poultry farming is an important economic activity in Brazil. Avian orthoreovirus (ARV) belongs to the Reoviridae family, and it Orthoreovirus has been causing extensive economic losses worldwide. Thus, it has been the aim of research in several countries. ARV related arthritis and tenosynovitis in broiler chickens is one of the main clinical presentations, which is also often associated to the increasing number of slaughters condemnation. In the last five years, the failure in coverage by the conventional vaccines and the increasing rate of disease diagnosis has suggested that pathogenic strains are emerging worldwide. This study was performed analyzing pelvic limbs tissue samples from broiler chickens at a brazilian slaughterhouse, which had varying condemnation rates from 5 to 60%. The birds had an age range of 22-28 days-old, and there was no correlation between sex. As the breeders were unvaccinated, the broilers did not have any passive immunity to this agent. Gross and microscopic changes were evaluated, as well as the detection and phylogenetic analysis of the ARVs involved in tenosynovitis, in addition to the bacteriological examination were carried out. Grossly, all birds had an increase in volume, edema, and hemorrhages, and on the cut surface a serous exudate was found between the tendons and hock joint. Although lesions were similar, there were distinct degrees of lesion intensity among the different lots. Histologically, there was hyperplasia of the synovial membranes associated to a mixed inflammatory infiltrate. There was also necrosis of the muscle fibers, as well as myofiber reabsorption, and a mononuclear to mixed inflammatory infiltrate. The tendons had, in addition to an inflammatory infiltrate originating from the adjacent muscles, formation of lymphoid aggregates. The subcutaneous tissue presented a mixed inflammatory infiltrate, hemorrhage, and fibrin deposits. ARVs RNA was detected in five tested samples by a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Genotyping, followed by phylogenetic analysis, was performed by sequencing the Sigma C gene. Four strains were grouped in lineage II, and one strain in lineage V. All samples were negative in the PCR test for *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. Bacterial culture yielded no significant growth. These results evidenced the epidemiology, the gross, and the microscopic findings related to tenosynovitis lesions, which are associated to the presence of ARVs strains distinct from the vaccine strains. Thus, these results highlighted that pathogenic strains of ARV occurs in broiler chickens in Brazil.*

**Key words:** poultry, orthoreovirus, arthritis

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Lesões macroscópicas: A. Frango, articulação tibiotársica:** moderado aumento de volume unilateral associado a áreas multifocais de coloração vermelha. **B. Frango, articulação tibiotársica:** acentuado aumento de volume unilateral associado a hemorragia no tecido subcutâneo, conferindo coloração esverdeada a articulação.....35
- Figura 2. Achados histopatológicos da infecção por Reovirus em frango: A. articulação tibiotársica:** hiperplasia de células sinoviais, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, associado a debris celulares, hemácias e fibrina no espaço articular. HE, 4x. **B. Membrana sinovial:** hiperplasia de células sinoviais formando vilos associada a infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, debris celulares, hemácias e fibrina. HE, 10x **C. Inserção do músculo no tendão:** infiltrado inflamatório mononuclear e agregados linfóides. HE, 4x. **D. Inserção do músculo no tendão:** infiltrado inflamatório mononuclear entre as fibras colágenas: HE, 20x.....36
- Figura 3. Árvore filogenética das cepas de ARV baseada na sequência de aminoácidos da Sigma C.** As cepas virais foram agrupadas em seis grupos (identificados por cores). Nossos isolados estão identificados como ReoBR.....37



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Cepas com suas características patológicas e moleculares.....	35
--	----

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Descrição anatômica da articulação tibiotársica .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2 Histórico e panorama atual .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Etiologia .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Epidemiologia .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5 Patogenia .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Sinais clínicos .....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Achados macroscópicos .....</b>	<b>15</b>
<b>2.8 Achados microscópicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2.9 Diagnóstico .....</b>	<b>16</b>
<b>2.10 Controle e prevenção .....</b>	<b>18</b>
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>21</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dados publicados pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA 2018) demonstram que, no ano de 2017, a produção brasileira de carne de frango foi de 13,5 milhões de toneladas, o que coloca o Brasil como o segundo maior produtor do mundo. Desde o ano de 2004, o Brasil passou a ser o maior exportador deste produto, e a Região Sul do país é responsável por mais de 75 % das exportações nacionais. Entre os produtos de exportação para os países do Oriente Médio, está o frango tipo “griller”, produzido a partir de aves com idade de abate até trinta dias e um peso médio de 1,400 kg.

A avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor de frangos de corte é composto, predominantemente, por produtores integrados, que trabalham junto a empresas beneficiadoras e exportadoras.

No Brasil, tem-se o frango como tipo de carne mais consumida desde 2006, e também como principal responsável pelo incremento do consumo *per capita* de carne da população (USDA, 2011). No que tange ao comércio interno da carne de frango, 29 % é realizado a partir da venda da carcaça inteira. As condenações parciais e totais de carcaças são responsáveis por importantes perdas produtivas na cadeia avícola (ABPA 2018).

O desafio sanitário da avicultura industrial aumenta proporcionalmente com a produção e o manejo intensivo, já que as aves estão alojadas em altas densidades, favorecendo a disseminação de doenças (GIMENO, 2009). A coleta de dados e materiais junto ao abate sanitário constitui uma importante ferramenta para o monitoramento e estudo das criações comerciais (ANSONG-DANQUAH, 1987). Dentre as principais causas de condenações *post mortem*, estão às relacionadas ao sistema locomotor, nas quais se incluem as artrites e tenossinovites infecciosas (ARMENDARIS, 2006).

Nos frigoríficos, a inspeção das carnes para consumo é realizada pelo Departamento de Inspeção Federal (DIF), bem como pelos órgãos de fiscalização estaduais e municipais. A avaliação é realizada por linhas de inspeção, a condenação de lesões por artrite ocorre na linha C, durante o exame externo. De acordo com critérios preestabelecidos, qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetada por um processo inflamatório deverá ser removido e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas (BRASIL 1998).

Além das condenações, as artrites infecciosas acarretam em diminuição do ganho de peso, piora na conversão alimentar e eliminação de animais antes mesmo do momento do abate (JORDA et al., 2001). Dentre os principais agentes envolvidos nas lesões articulares, estão algumas bactérias e vírus. As lesões da artrite viral/tenossinovite, causadas pelo reovírus aviário (ARV, avian reovirus) não apresenta sinais clínicos característicos e algumas alterações articulares podem ser semelhantes a lesões causadas por agentes como *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus* sp. e outras bactérias, ou até mesmo ser causado por uma associação destes agentes (KINBENGE et al., 1982).

Além da tenossinovite, estirpes patogênicas de ARV podem causar diferentes síndromes em aves comerciais. A importância das infecções causadas por este vírus varia conforme o sistema de criação e a prevalência das cepas (JONES, 2000). Alguns estudos buscaram determinar o impacto econômico deste patógeno. Devido à escassez de dados, as perdas não podem ser calculadas com exatidão, mas mesmo as perdas estimadas podem ser substanciais (DOBSON; GLISSON, 1992).

O ARV embora muito descrito ao longo de quarenta anos, foi pouco relatado nos anos noventa (JONES, 2008). Contudo, atualmente, tem causado prejuízos no mundo todo e tem sido alvo de pesquisas em diversos países (MOR et al., 2013; KORT et al., 2015; LU et al., 2015; ZHONG et al., 2016; PALOMINO-TAPIA et al., 2018; MANSOUR et al., 2018).

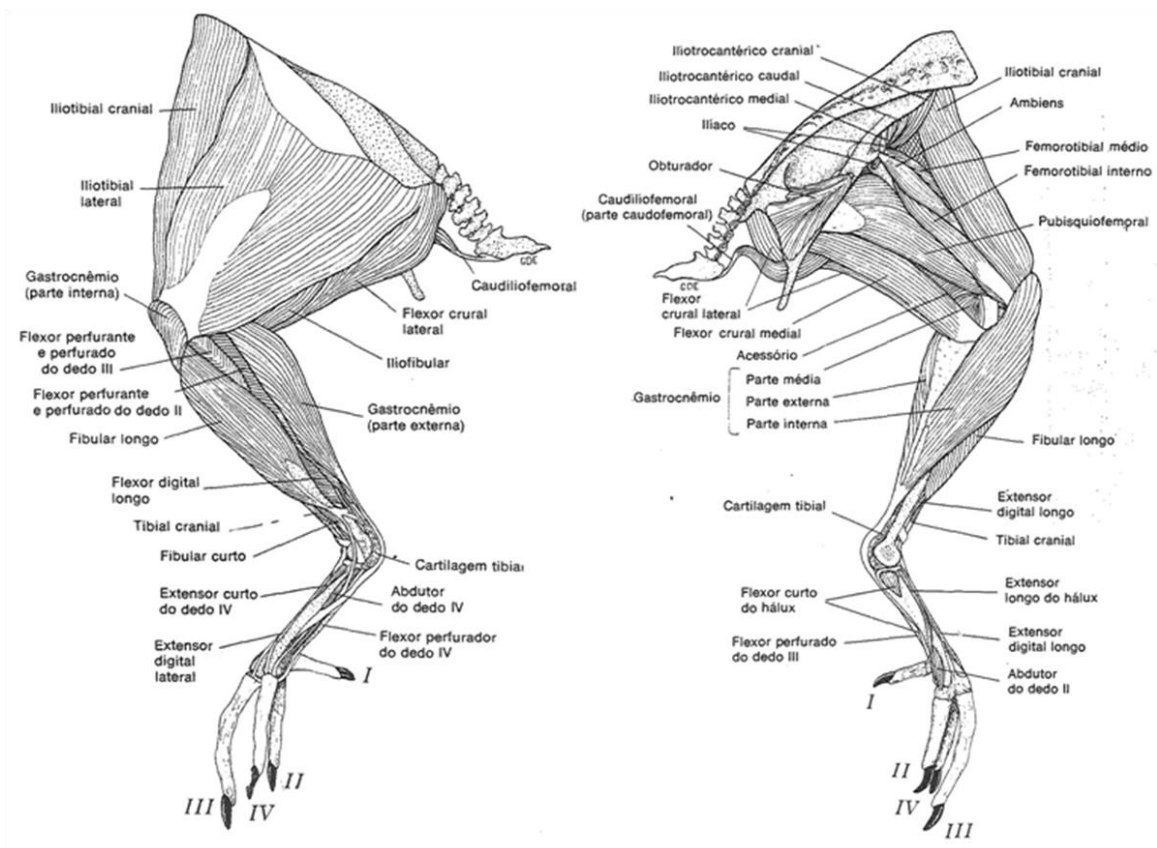
Considerando que a reprodução experimental das condições clínicas da infecção por ARV é praticamente impossível (JONES, 2008), a utilização de amostras provenientes de abatedouro são de extrema importância para o estudo da enfermidade em frangos de corte. Nossos resultados demonstram a epidemiologia, macroscopia e microscopia das lesões de tenossinovite associadas à presença de cepas de ARVs diferentes das cepas vacinais, destacando a ocorrência de cepas patogênicas em criações de frango de corte no Brasil.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Descrição anatômica da articulação tibiotársica**

O maior número de casos de artrite viral está relacionado à articulação tibiotársica quando comparado às demais articulações (JONES; GUNERATNE, 1984c; DOBSON; GLISSON, 1992). Esta é formada pela porção distal do osso tibiotarso, que possui côndilos proeminentes, e depressões para a inserção dos ligamentos colaterais da articulação em ambos os lados das extremidades. Unindo-se a extremidade distal do tibiotarso, está a extremidade proximal do osso tarsometatarso, composta pelas cotilas interna e externa, plantarmente encontram-se ainda, uma série de cristas calcâneas que formam canais tendinais para os tendões dos dedos, esta área é citada como hipotarso (FEDUCCIA, 1986).

Compõe a articulação tibiotársica (Ilustração 1), as cartilagens, as aponeuroses e tendões dos músculos: fibular longo, fibular curto, tibial cranial, músculos flexores digitais, gastrocnêmio, extensor digital longo e flexor digital longo. Revestindo as cartilagens articulares, estão as células sinoviais e o líquido sinovial, revestindo externamente a articulação está a cápsula articular e a pele (DE VANDEN BERGE, 1986).



**Ilustração 1. Membro pélvico esquerdo:** Músculos superficiais e tendões do tetráz azul (*Dendragapus obscurus*) vista lateral e vista medial (Adaptado: DE VANDEN BERGE, 1986).

## 2.2 Histórico e panorama atual

Entre as diferentes apresentações clínicas causadas pelo ARV estão, a artrite viral, a doença respiratória, quadros de imunossupressão e síndrome da má absorção com diminuição do desenvolvimento. As aves também podem apresentar infecções subclínicas do agente (ROSENBERGER, 2003). A primeira descrição do reovírus ocorreu no México e nos Estados Unidos da América (EUA), no ano de 1950, os isolados foram obtidos a partir de mamíferos sem apresentação de sinais clínicos. Tal situação deu origem à denominação: “REO” que provém das letras iniciais de “Respiratory and Enteric Orphan viruses” (SABADIN, 1959).

Em frangos a detecção do ARV ocorreu a partir de casos de tenossinovite não compatíveis com lesões bacterianas, e depois de ser denominado como “agente da atrite

viral” foi finalmente identificado como um reovírus (OSLON; KERR, 1966; OSLON; WEISS, 1972).

No Brasil, o agente foi isolado pela primeira vez, a partir de casos de artrite em frangos de corte e em galinhas de postura (BOTTINO et al., 1975). Em estudos prévios, diferentes cepas foram identificadas nas fezes de aves que apresentavam alteração de consistência das fezes (TAMEHIRO et al., 2003).

No estado do Rio Grande do Sul, em estudo abrangendo algumas criações de aves de fundo de quintal, mais de oitenta por cento destas propriedades apresentou anticorpos para o agente, o que demonstra a circulação do ARV neste tipo de criação, que não utiliza vacinação (SANTOS et al., 2008). No estado de Santa Catarina, o ARV foi identificado em associação com outros agentes a partir de amostras de lesões articulares de matrizes e frangos de corte, provenientes de abatedouros (RECK, 2011). Em uma pesquisa de campo no estado de Minas Gerais, a identificação de uma cepa similar à estirpe vacinal S1133. A identificação ocorreu em lotes de aves assintomáticas e em aves com claudicação e crescimento desuniforme (RIOS et al., 2012).

Embora o envolvimento do agente em quadros de artrite em frango de corte, tenha sido relatado ao longo de muitos anos, este parece ser um problema atual em diversos países (MOR et al., 2013; TROXLER et al., 2013; KORT et al., 2015; LU et al., 2015). A importância das infecções por reovírus, em todo o mundo, varia muito de região para região. As razões para isso não são claras, mas provavelmente se relacionam com a densidade das criações, com isolamento geográfico e com a prevalência de cepas patogênicas (JONES, 2000).

### **2.3 Etiologia**

O ARV pertencente à família *Reoviridae*, gênero *Orthoreovirus*. É um vírus RNA de dupla-fita (*double-stranded-RNA; dsRNA*), segmentado, envolto por um capsídeo duplo de natureza proteica e simetria icosaédrica, com cerca de 80nm de diâmetro. O genoma consiste de dez segmentos de RNA, agrupados em três classes, de acordo com o tamanho: três grandes (*Large-* L1, L2 e L3), três médios (*Medium-* M1, M2 e M3); e quatro pequenos (*Small-* S1, S2, S3 e S4) (MARTÍNEZ-COSTAS et al., 1997; BENAVENTE; MARTÍNEZ-COSTAS, 2007).

As proteínas codificadas pela classe L são denominadas lambda ( $\lambda$ ), as codificadas pela classe M são denominadas mi ( $\mu$ ), e proteínas codificadas pela classe S são denominadas sigma ( $\sigma$ ). Esses segmentos codificam pelo menos oito proteínas estruturais ( $\lambda_a$ ,  $\lambda_b$ ,  $\lambda_C$ ,  $\mu_A$ ,  $\mu_B$ ,  $\sigma_A$ ,  $\sigma_B$  e  $\sigma_C$ ) e quatro proteínas não estruturais ( $\mu_{NS}$ , P10, P17 e  $\sigma_{NS}$ ) (BENAVENTE; MARTÍNEZ-COSTAS, 2007). O capsídeo externo proteína  $\mu_B$  está relacionado à entrada viral na célula do hospedeiro (O'HARA, et al., 2001), enquanto que, a proteína capsidial externa  $\sigma_C$  é uma proteína de ligação celular (GRANDE; BENAVENTE, 2000) assim como a  $\sigma_B$  (WICKRAMASINGHE et al., 1993). Dentre as inúmeras atividades relacionadas às proteínas não estruturais está a formação de sincícios, aumento da permeabilidade da membrana celular, autofagia e apoptose (SHMULEVITZ; DUNCAN, 2000, CHI et al., 2013).

Característica dos vírus RNA, a mutação de ponto é relativamente comum no ARV. O mecanismo de surgimento de novas cepas ocorre quando segmentos do genoma se recombinam ou sofrem mutações (JONES, 2000). Estas novas cepas podem surgir a partir de linhagens cocirculantes, a proteína viral que mais apresenta variação é a  $\sigma_C$ , em decorrência da forte pressão imunológica que sofre, por ser uma das porções responsáveis pela estimulação da produção de anticorpos no hospedeiro (LIU et al., 2003, GOLDENBERG et al., 2010, ATTOUI 2011).

Através da comparação da similaridade das sequências do gene  $\sigma_C$  são realizadas as classificações de linhagens (KANT et al., 2002; LIU et al., 2003; LU et al., 2015). Os estudos mais recentes classificam os RAs em seis linhagens filogenéticas distintas (I até VI) (LIU et al., 2003; LU et al., 2015)

## **2.4 Epidemiologia**

O vírus está amplamente distribuído na natureza e pode causar diferentes sintomatologias clínicas em diversas espécies, dentre elas perus (MOR et al., 2013; LU et al., 2015), faisões (CURTIS et al., 1992), gansos (PALYA et al., 2003) e psitacídeos (SÁNCHEZ-CORDÓN et al., 2002). Os frangos, parecem ser os mais susceptíveis aos quadros de artrite. Embora a doença clínica ocorra em aves silvestres a importância destas aves como reservatório não é bem estudada (JONES, 2000).



A infecção por ARV pode ocorrer de forma horizontal, por contaminação fecal-oral, e nestes casos pode se disseminar rapidamente (JONES; ONUNKWO, 1978), no interior do incubatório tem sido discutida como importante forma de disseminação da doença (TROXLER et al., 2013). A via respiratória constitui uma porta de entrada para o agente, mas parece ser menos importante.

A infecção via vertical, embora menos relatada, está comprovada devido à capacidade de permanência do vírus no ovário e no oviduto das reprodutoras (DOBSON; GLISSON, 1992; AL-MUFFAREJ; SAVAGE; JONES 1996; MANSOUR et al., 2018). No caso da artrite, as lesões podem se desenvolver a partir de lesões de pele e no coxim plantar (JONES, 2000).

A lesão articular por ARV parece ser idade dependente, portanto aves jovens demonstram ser mais susceptíveis e apresentam lesões mais acentuadas, independente da via de infecção (JONES; GEORGIU, 1984, ROESSLER, 1989). Aves comerciais inoculadas com isolados de águia e pato apresentaram lesões articulares, demonstrando a possibilidade de transmissão do agente entre espécies (JONES; GUNERATNE, 1984c). Tang et al. (2016) demonstraram a primeira co-infecção natural de duas variantes de ARV em frangos de corte, fornecendo evidências científicas de que múltiplas cepas podem estar ao mesmo tempo na mesma ave e favorecer o surgimento de novas variantes.

Quando a infecção ocorre por via horizontal, pode levar até sete semanas para o aparecimento dos sinais clínicos (JONES; ONUNKWO, 1978). Após a infecção, o vírus pode permanecer nos tecidos por até trinta e três semanas (ROESSLER 1989), sendo esta persistência mais prolongada em animais infectados com menos de uma semana de idade (JONES; GEORGIU, 1984).

Nas diferentes formas de apresentação da enfermidade a mortalidade tende a ser baixa, chegando a 80% em cepas com maior patogenicidade, contudo a morbidade pode atingir 100% o que acarreta em diminuição de consumo, conseqüente diminuição do ganho de peso e da resistência a doenças (ROSENBERG et al., 1989; AWANDKAR et al., 2012).

Quanto à susceptibilidade de raças e linhagens, as aves pesadas, como os frangos de corte, tendem a ser mais susceptíveis quando comparadas as aves leves. Esta susceptibilidade já foi determinada de forma experimental (JONES; KIBENGE, 1984b) e pelo maior número de relatos nestas aves (DE HERDT et al., 2008) em comparação com os relatos de ocorrência em aves de postura comercial (DE GUSSEM et al., 2010).

Considera-se ainda, que as aves de poedeiras tendem a apresentar completa recuperação pós infecção, o que não é observado em frangos de corte (DE GUSSEM et al., 2010).

## **2.5 Patogenia**

O período de incubação varia com a cepa e a condição do animal no momento da infecção. Estudos experimentais mostram que após uma semana de inoculação, lesões já podem ser observadas nas articulações (CLARK et al., 1990, VASCONCELOS et al., 2001).

A replicação viral pode ocorrer tanto na mucosa do trato respiratório quanto na do digestório, a viremia ocorre entre 24 a 48 horas com disseminação do agente para os demais tecidos (VASCONCELOS et al., 2001b). Mesmo quando causada por uma cepa com afinidade pelo tecido articular, estudos mostram que nos estágios iniciais da infecção, o vírus está distribuído em diversos tecidos e seu principal local de replicação é o trato digestório (ELLIS et al., 1983; KINBENGE et al., 1985; JONES, 2000; VASCONCELOS et al., 2001b). No entanto na articulação tibiotársica as consequências da replicação parecem ser mais graves (JONES,2000).

O tropismo tecidual do ARV está relacionado a mutações no segmento genômico S1, que codifica a proteína  $\sigma$ C (MEANGER et al., 1999). Esta proteína foi identificada como a proteína de ligação celular, tendo em vista que foi o único polipeptídeo viral de extratos de células infectadas que demonstrou capacidade de se ligar especificamente a fibroblastos de embrião de galinha (MARTÍNEZ-COSTAS et al., 1997).

A capacidade do vírus de se replicar nos macrófagos e inibir a sua atividade fagocitária pode ser a principal causa da ocorrência de infecções bacterianas secundárias (MILLS; WILCOX, 1993, CHEN et al., 2015). Contudo esta capacidade varia de uma cepa para a outra, sugerindo que nem todas as infecções por ARV podem estar acompanhadas de infecções bacterianas (MILLS; WILCOX, 1993).

## **2.6 Sinais clínicos**

Em casos de artrite viral, os sinais clínicos estão relacionados à dificuldade de locomoção das aves (JONES; GEORGIU, 1984, DE GUSSEM et al., 2010), estas tendem a utilizar as asas como apoio (JONES; ONUNKWO, 1978). Também pode ser

observada diminuição na taxa de crescimento e lotes desuniformes (TROXLER et al., 2013). Na fase inicial da infecção, momento em que o vírus se replica em diferentes tecidos, as aves podem apresentar sintomatologia clínica relacionada aos órgãos afetados. E dependendo da cepa outros órgãos podem ser acometidos concomitantemente a lesão articular (VASCONCELOS et al., 2001b).

Em aves infectadas experimentalmente por via oral os sinais clínicos tendem a ser mais severos e inespecíficos nos primeiros dias de vida, com o passar do tempo as aves apresentam dificuldade em se locomover. Já aves adultas dificilmente apresentam sinais clínicos. Na infecção por inoculação no coxim plantar, os sinais clínicos associados ao sistema locomotor tendem a aparecer de forma mais precoce (JONES; GEORGIU, 1984).

Em matrizes que transmitiram o vírus aos frangos de corte, nenhum sinal clínico e nem mesmo diminuição de produção parece ser observada, a infecção acaba por acarretar em sinais clínicos apenas na progênie (DOBSON; GLISSON, 1992).

## **2.7 Achados macroscópicos**

Em geral é observado um aumento de volume da articulação tíbiotársica, porém muitas vezes, não são observadas lesões macroscópicas externamente (JONES; GEORGIU, 1984; TROXLER et al., 2013). A presença de áreas multifocais de hemorragia nas estruturas articulares pode conferir uma coloração “esverdeada” à articulação. Ao corte, são observados edema e exsudato seroso amarelado entre os tendões e a articulação do jarrete (JONES; ONUNKWO, 1978).

Erosões na cartilagem articular e necrose da cabeça do fêmur podem ser causadas por determinadas cepas e em quadros clínicos com evolução crônica (JONES; ONUNKWO, 1978; JONES; GUNERATNE, 1984c; DE HERDT et al., 2008). Rupturas do tendão gastrocnêmio podem ser observadas em linhagens pesadas, em decorrência de um enfraquecimento da estrutura do tendão (JONES; ONUNKWO, 1978; TROXLER et al., 2013).

Em casos de associação com outros agentes a lesão inicial pode ser sobreposta por deposição de material caseoso, de consistência firme e coloração amarelada, o que indica infecções bacterianas secundárias (KINBENGE et al., 1982).

## **2.8 Achados microscópicos**

As alterações histopatológicas podem variar de acordo com a cepa envolvida (JONES; GUNERATNE, 1984c), mas principalmente com a idade dos animais acometidos, sendo geralmente acentuada em animais jovens e mais discreta em animais mais velhos (ROESSLER, 1989). Contudo, o tipo celular e o padrão de lesão não diferem entre cepas, apenas em relação ao tempo de aparecimento de cada lesão e evolução das mesmas (JONES; GUNERATNE, 1984c).

Na fase aguda da infecção, há predomínio de heterófilos e macrófagos no tendão gastrocnêmio e na membrana sinovial. Com a cronicidade do processo inflamatório, estas tendem a ser substituídas por linfócitos e plasmócitos (JONES; GUNERATNE, 1984c; ROESSLER, 1989; VASCONCELOS et al., 2001). As células das membranas sinoviais tendem a se tornar hiperplásicas, formando vilosidades, nódulos linfóides podem se formar nos tecidos tendíneos, que com a evolução da lesão tendem a apresentar proliferação fibroblástica (JONES; ONUNKWO, 1978; ROESSLER 1989; VASCONCELOS et al., 2001; TROXLER et al., 2013).

A ruptura do tendão gastrocnêmio e a erosão da cartilagem articular depende, essencialmente, da idade da ave, cepa envolvida, forma de infecção, peso da ave e tempo de evolução (JONES; GEORGIU, 1984, HILL et al., 1989; TROXLER et al., 2013). Associados às lesões articulares, infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e necrose podem ser observados em órgãos como fígado, coração, baço e Bursa de fabricius (JONES, 2000).

## **2.9 Diagnóstico**

Os ARVs são considerados vírus de fácil cultivo celular, podendo causar pouca ou nenhuma lesão, deve-se estar atento a outros fatores no momento de considera-los a causa de lesões articulares (ROSENBERG et al., 1989; JONES, 2008). A associação de mais de uma prova diagnóstica parece ser a melhor opção quando se suspeita de artrite viral (DE HERDT et al., 2008). Os sinais clínicos da lesão articular por ARVs não são patognomônicos, podendo ser similares aos causados por outros agentes ou por uma associação dos mesmos (JONES, 2000).

O exame histopatológico é uma importante ferramenta, na fase inicial da infecção as lesões podem se assemelhar às causadas por *Staphylococcus aureus*, ou até mesmo podem estar sobrepostas (KINBENGE et al., 1982). A presença de lesão nos tendões e o infiltrado de heterófilos no coração pode auxiliar no diagnóstico diferencial de infecções por reovírus de outros agentes (JONES, 2008). Com a evolução do quadro o infiltrado inflamatório se torna predominantemente mononuclear, facilitando o diagnóstico (HILL et al., 1989). A imunofluorescência embora uma boa ferramenta para a identificação do agente nas lesões, só é eficaz nas fases iniciais da infecção (JONES, 2000).

A prova de isolamento viral tem sido denominada como “padrão ouro” para o diagnóstico (JONES, 2000), contudo, o vírus pode ser isolado sem lesões associadas, e indivíduos com lesões acentuadas podem ser negativos. A incapacidade de re-solubilizar o vírus, pode explicar as taxas relativamente baixas de isolamento viral de casos naturais de tenossinovite. O não isolamento pode ocorrer também, devido à forte resposta mediada por células de alguns indivíduos, que eliminam o agente rapidamente, ou o vírus se torna indisponível, pela formação do complexo antígeno-anticorpo (JONES et al. 1981, KIBENGE et al. 1982).

O isolamento a partir de amostras de tecidos articulares macerados tende a ser a melhor opção quando em comparação com os suabes. Em casos de infecções com quadro de evolução mais prolongado, as chances de sucesso aumentam com amostras da cartilagem articular (JONES; GEORGIU, 1984d). O isolamento a partir das articulações pode ser considerado diagnóstico, o mesmo não ocorre quando isolado do trato gastrointestinal, pois o agente tende a estar disseminado neste local (JONES. 2000). Em aves que se recuperaram de infecção experimental, o vírus pode permanecer nas articulações por pelo menos treze semanas (JONES; ONUNKWO, 1978).

O diagnóstico molecular, demonstra ser uma excelente opção, permitindo caracterizar e classificar as cepas envolvidas em surtos de campo e diferenciá-las das cepas vacinais, determinando a epidemiologia das mesmas (LIU et al., 2004). O segmento M1 é o mais conservado entre os ARVs, sendo a região de escolha para os testes de RT-PCR iniciais de identificação. Para determinar a diversidade genética das cepas, a região de escolha para amplificação por RT-PCR é a de maior variabilidade do genoma, o segmento S1 (FARKAS, 2016). Contudo, em decorrência dos rearranjos a análise do genoma

completo pode ser mais segura para demonstrar a epidemiologia do vírus (MOR et al., 2013).

O exame sorológico, utilizando técnicas como: imunodifusão em gel de ágar, vírus neutralização, imunofluorescência indireta, Western blot e ensaio de imunoabsorção enzimática, pode auxiliar no monitoramento dos lotes de frango. A diferenciação entre a imunidade passiva e imunidade proveniente de desafios de campo, apenas pode ser obtida quando utilizado o exame de vírus neutralização (JONES, 2000).

Entre os diagnósticos diferenciais estão as lesões articulares causadas por bactérias como *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp., *Salmonella* sp. e *Erysipelothrix rhusiopathiae*, que normalmente relacionam-se a doenças septicêmicas (SEQUEIRA, 2006; STALKER et al., 2010; OH et al., 2010). A infecção por *Mycoplasma* sp., embora menos frequente do que as demais bactérias, também acomete os tecidos articulares. Todos estes agentes bacterianos podem ser encontrados de forma associada em lesões por ARV (RECK, 2012).

As lesões causadas pelo *Mycoplasma sinoviae*, embora ocorram nas bainhas tendíneas, na membrana sinovial e no espaço articular, apresentam um predomínio de heterófilos o que confere um aspecto caseoso as lesões (KLEVEN; FERGUSON-NOEL, 2008). Facilitando o diagnóstico diferencial das infecções por reovírus, onde o infiltrado inflamatório tende a ser misto ou predominantemente mononuclear (JONES; GUNERATNE, 1984c; ROESSLER, 1989; VASCONCELOS et al., 2001). As lesões caseosas podem ser vistas também em outros órgãos, especialmente em sacos aéreos (KLEVEN; FERGUSON-NOEL, 2008).

Não existem marcadores para a patogenicidade ou tropismo do reovírus, portanto, se forem necessárias informações a respeito dessas características, a infecção experimental dos pintinhos “specific pathogen free” (SPF) se faz necessária (JONES, 2000).

## **2.10 Controle e prevenção**

Estudos experimentais demonstram a persistência do vírus na água de consumo por até 12 semanas, e cepas patogênicas permanecem viáveis por maior tempo quando comparadas às menos patogênicas (MOR et al., 2015). Já em ovos com matéria orgânica e em penas a viabilidade foi de até 10 dias. A sobrevivência do ARV na superfície de galpões, nas penas das aves, bem como nas suas rações, pode desempenhar um papel

importante na perpetuação da infecção entre os lotes (SAVAGE; JONES, 2003). Medidas de biossegurança, vazio sanitário, limpeza e desinfecção das instalações podem auxiliar no controle da enfermidade.

Anticorpos para ARV detectados em aves de fundo de quintal demonstram a circulação do agente neste tipo de criação, o que alerta para chance de surgimento de cepas de maior patogenicidade (SANTOS et al., 2008). Em relação as aves silvestres, não se sabe a importância das mesmas como reservatório (JONES, 2000). Contudo, tanto a criação de aves de fundo de quintal, quanto as aves silvestres podem ser fontes de infecção para as aves comerciais, o manejo de biossegurança das granjas constitui a principal ferramenta para evitar que isto ocorra.

As aves adultas são mais resistentes à infecção, no entanto, a vacinação das matrizes deve ser realizada, pois previne a transmissão da doença e também assegura a transmissão de imunoglobulinas para a progênie, evitando a infecção dos frangos de corte em seu momento de maior susceptibilidade (JONES; GEORGIU, 1984). A vacinação realizada antes da postura, evita a transmissão vertical de cepas de desafio e cepas vacinais. Quando realizada em idade reprodutiva, pode além de danos a progênie, causar quadros de diarreia nas matrizes e diminuição da qualidade dos ovos (MARTINS; RESENDE, 2009). A imunização deve ser refeita com frequência, pois protege apenas a primeira geração de progênies, não a segunda (VAN DER HEIDE; KALBAC; HALL, 1976).

Em relação à eficiência das vacinas, estas protegem apenas para sorotipos homólogos as cepas vacinais comerciais (JONES, 2008). A proteína viral  $\sigma C$ , responsável pelo estímulo à produção de anticorpos neutralizantes durante uma infecção, pode divergir a nível de aminoácidos, mesmo entre as cepas intimamente relacionadas (KANT et al., 2003; LIU et al., 2003; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2007).

Inúmeros estudos demonstram que as cepas envolvidas nos surtos apresentam grande variação em relação às cepas vacinais (GOLDENBERG et al., 2010). Esta variação das cepas interfere negativamente na eficiência das vacinas utilizadas na indústria avícola (VASSERMAN et al., 2004), que são produzidas com cepas pertencentes à linhagem I (PALOMINO-TAPIA et al., 2018). Sendo assim, as vacinas utilizadas atualmente, não protegem as aves de todos os subtipos patogênicos (TROXLER et al., 2013; RAU et al., 1980; LU et al., 2015).

Pesquisadores buscam identificar a porção adequada do vírus para o desenvolvimento de vacinas autógenas, as quais seriam formuladas com cepas envolvidas em surtos (LU et al., 2015). Para isto a monitoria das cepas circulantes deve ser contínua, com atualização das vacinas à medida que as cepas evoluem, levando-se em consideração que a partir da identificação das cepas até o desenvolvimento da vacina autógena pode levar de 6 a 18 meses (PALOMINO-TAPIA et al. 2018).

Experimentos com a utilização de uma vacina contendo uma mistura de quatro protótipos genotípicos de ARV demonstrou maior proteção contra o desafio de campo em comparação a vacina com uma única estirpe (LUBLIN et al., 2011). Palomino-tapia et al. (2018) recomendam a formulação de vacinas autógenas com cepas que tenham pelo menos noventa e cinco por cento de identidade com as circulantes.

O monitoramento dos anticorpos vacinais e de anticorpos provenientes de desafios de campo pode ser realizado por exames sorológicos. Contudo os ARVs apresentam grande heterogeneidade nos antígenos neutralizantes, além de reações cruzadas (CLARK et al., 1990). Exames de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) buscam encontrar anticorpos neutralizantes das proteínas  $\sigma C$  e  $\sigma B$ , e demonstram resultados superiores aos ELISA convencionais (LIU et al., 2002).



### **3. ARTIGO**

Neste item é apresentado o artigo intitulado “Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil” publicado no periódico Poultry Science.

## **AVIAN REOVIRUSES IN BRAZIL**

### **Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil**

Suyene O. de Souza,\* Silvia De Carli,† Vagner R. Lunge,†‡<sup>1</sup>, Nilo Ikuta,†‡ Claudio W.  
Canal,\* Saulo P. Pavarini,\* and David Driemeier\*

\* Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
(UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil.

†Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA),  
Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil;

‡Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>1</sup>Corresponding author: [vagner.lunge@gmail.com](mailto:vagner.lunge@gmail.com)

Name: Vagner Ricardo Lunge

Address: Laboratório de Diagnóstico Molecular, Prédio 22, sala 312. Avenida  
Farroupilha, 8001, CEP 92425-900 - Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Telephone: (55) (51) 34782777

Scientific section: Immunology, Health, and Disease

**ABSTRACT** Avian reoviruses (ARVs) infect a variety of species worldwide. Birds may present stunting syndrome, respiratory and/or enteric diseases, immunodepression, malabsorption, viral arthritis/tenosynovitis and even secondary infections by other microorganisms. Flaws in conventional vaccines and the increase in the diagnostic rate of disease in the last five years suggest the emergence of pathogenic ARVs in the poultry flocks worldwide. This study aimed to characterize birds lesions and to detect/genotype ARVs from a severe outbreak of tenosynovitis in broiler poultry flocks from Brazil. Tissue samples of lesions on pelvic limbs of broiler chicken were collected in poultry flocks with a high condemnation rate of carcasses due to lesions and submitted to histological and molecular analysis. Histological exam demonstrated the presence of major gross pathologic lesions included marked swelling, edema and hemorrhages. Serous exudate was present between the tendons and hock joint. In addition to necrosis and inflammation of muscle fibers, mixed inflammatory infiltrate was observed in subcutaneous tissue and tendon sheaths. ARVs RNA was detected in five samples tested by polymerase chain reaction. These samples were also genotyped and demonstrated the occurrence of strains of the ARVs lineages II and V in the flocks. These results suggest that these field ARVs, genetically distant from previously characterized strains, are associated to tenosynovitis and present in commercial Brazilian poultry flocks.

**Key words:** poultry, reovirus, arthritis

## INTRODUCTION

Avian reoviruses (ARVs) are divergent in their pathogenicity and can infect a variety of species worldwide (Jones, 2008). Birds can be asymptomatic or have stunting syndrome, respiratory/enteric diseases, immunodepression, malabsorption syndrome, viral arthritis/tenosynovitis and even secondary infections by other viruses or bacteria (Jones, 2008; Davis et al., 2012). There are also several economically significant losses caused by ARV infections in domestic poultry, including a general lack of performance, increased mortality in the flocks, diminished weight gain, poor feed conversion and reduced marketability of the bird carcasses, especially in young meat-type chickens (Van der Heide, 2000; Jones, 2008).

ARVs belong to the *Orthoreovirus* genus from the *Reoviridae* family with a non-enveloped icosahedral capsid and a genome of ten double stranded RNA segments. These genomic segments are classified according to the size of the RNA segments in large (L1, L2 and L3), medium (M1, M2 and M3) and small (S1, S2, S3 and S4). Genome segment S1 encodes sigma C ( $\sigma$ C) sequence, the main genetic region used to characterize and classify ARVs into different genotype/pathotype groups (Attoui et al., 2011). ARV strains have also been classified into different genotypes/clusters according to nucleotide and amino acid sequence diversity. Phylogenetic studies have been targeted to ARV genes with a high rate of nucleotide substitutions (mainly on  $\sigma$ C region) and six distinct phylogenetic lineages (I-VI) were already detected in studies in the United States, Japan, Taiwan and Australia. Interestingly, lineages generated from other genes of class S ( $\sigma$ A,  $\sigma$ B and  $\sigma$ NS) did not necessarily correspond to the  $\sigma$ C lineage assignments, probably reflecting the occurrence of genome rearrangement in the evolution of ARVs (Liu et al., 2003).

Vaccination is one of the most used methods to control ARV. Four strains (S1133, 1733, 2408 and 2177) are currently commercialized as inactivated vaccines for commercial poultry flocks. However, recent studies have demonstrated these vaccines do not provide adequate protection, as a consequence of the genetic and antigenic diversity of the ARVs field strains (Lu et al., 2015; Tang and Lu, 2016). The failure of conventional vaccines and the increased rate of disease diagnosis in the last five years are alarming, indicating that emerging pathogenic ARVs are becoming imminent threats to the broiler industry in Europe (Farkas et al., 2016) and North America (Lu et al., 2015; Ayalew et al. 2017).

The presumptive diagnosis of viral arthritis is based on clinical signs and macroscopic lesions. However arthritis is not pathognomonic of ARVs and joint injuries can also be caused by some bacteria (*Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, etc.). The identification of the etiological agent is carried out by viral/bacterial isolation. The diagnostic value of the serological profile is often difficult to interpret because reovirus infections are widespread among commercial poultry flocks. This procedure is only useful as an indicator of immunity after vaccination (Jones, 2008). Molecular assays (as polymerase chain reaction, PCR) have been used for the detection of ARVs in affected tissues (Liu et al., 2003; Caterina et al., 2004; Guo et al., 2011). However, the high diversity of ARVs genome sequences has precluded the detection of some ARV variant field strains (Tang and Lu, 2016). A recent study developed a universal TaqMan rRT-PCR assay for rapid detection of all ARVs of birds, including historical reference strains and newly emerging variants or novel strains from these avian species (Tang and Lu, 2016).

Histological changes caused by ARVs in birds have been described since the 1960s (Kerr and Olson, 1964). Lesions include edema, coagulation necrosis, accumulation of

heterophiles and perivascular infiltrate. They are observed in natural and experimental infections in the acute phase (7-15 days post inoculation in the plantar coxin). Hyperplasia and hypertrophy of synovial cells, lymphocyte and macrophage infiltration, and proliferation of reticular cells may also be visualized. These latter lesions cause the parietal and visceral layers of the tendon sheaths to become grossly thickened by developing a periostitis characterized by osteoclast enlargement. In the chronic phase (from 15 days post-infection), synovial membrane develops hypertrophy of the villous processes and lymphoid nodules can appear. After 30 days, the inflammatory changes become even more chronic: there is an increase in the amount of fibrous tissue and a pronounced infiltration or proliferation of reticular cells; lymphocytes, macrophages and plasma cells can also be observed (Jones, 2008). Some studies showed the predominance of lymphocytes and other mononuclear inflammatory cells in the affected tissues (Reck et al., 2013; Lu et al., 2015).

Brazil is one of the most important world poultry producers in recent years. However, there is a lack of data on the status of circulating ARVs associated to viral arthritis / tenosynovitis. This study aimed to characterize ARVs from a severe outbreak of viral tenosynovitis in broiler poultry flocks from southern Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Poultry Samples***

Samples of lesions on pelvic limbs of broiler chicken were collected in poultry flocks with a high condemnation rate of carcasses due to lesions. Samples from tibiotarsal joints (26), gastrocnemius muscle (55), metatarsal extensor and digital flexor tendons (26), cranial tibial muscle (55), pubis ischiofemoral muscle (55), and medial crural flexor (55)

were fixed in 10% neutral-buffered formalin and stained with hematoxylin and eosin for histological examination. Dry lesion swabs were collected, 1 mL of Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2 was added, mixed and stored at -80°C until use. Routine bacteriological examinations were also carried out in the samples.

### ***RNA extraction and detection of ARV and Mycoplasma by real time PCR***

RNA of five suspected tissues was extracted by silica adsorption using commercial kit NewGene Prep/PreAmp according to the manufacturer's recommendations (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brazil). ARVs were detected through a real time reverse transcription PCR in a conserved region of the viral genome as previously described (Tang and Lu, 2016). Vaccine strain S1133 was used as a positive control and ultrapure water was used as a negative control. All samples were also tested for *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Mycoplasma gallisepticum* (MG) with commercial kits (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brazil).

### ***Genotyping of ARVs***

Genotyping was carried out by RT-PCR and sequencing of the  $\sigma$ C gene. A complementary DNA (cDNA) was produced with MMLV RT mastermix and was further amplified by nested PCR. The first PCR was proceeded with the primers ReoS-F1 (5'-TCRCAGCGAAGAGARGTCG-3') and ReoS-R1 (5'-GTCGATGCCSGTACGCACG-3'). Amplification was performed in a total volume of 30  $\mu$ L with 0.25  $\mu$ M of each forward and reverse primers. Cycling conditions were as follow: 37°C for 30 min, 95°C for 3 min and 30 cycles of 95°C for 20 sec, 50°C for 40 sec and 72°C for 60 sec, producing a fragment of 956 bp. The second PCR round was proceeded with 0.25  $\mu$ M of ReoS-F2 (5'-

TGATACTSTCMTTGACTTCGAACG–3’) and ReoS-R2 (5’-CGACATCATRТААТCAGTKCG-3’). Cycling conditions included an initial denaturation at 95°C for 3 min, 35 cycles of 20 sec for denaturation at 95°C and 40 sec of primer annealing at 50°C, 60 sec of extension at 72°C producing a fragment of 652 bp. The amplification products were electrophoresed in polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Both strands of the PCR products were sequenced by Sanger method and further assembled using Geneious®v10.2.3 (Biomasters, [www.geneious.com](http://www.geneious.com)). Nucleotide sequences were deposited in Genbank under the accession numbers MG902943-MG902948.

### ***Sequence assembly and phylogenetic analysis***

The obtained sequences were aligned with Mafft (KatoH and Standley, 2013) with reference sequences from lineages I, II, III, IV, V and VI, as previously described (Ayalew et al., 2017; Lu et al., 2015). The phylogenetic tree was constructed based on acid amino sequence of the  $\sigma$ C protein by Neighbor joining method with Jukes-Cantor genetic distance model. Hypothesis robustness was tested with 2,000 non-parametric bootstrap analyses. All analyses were carried out using Geneious®v10.2.3 (Biomasters, [www.geneious.com](http://www.geneious.com)).

## **RESULTS**

### ***Gross Findings***

Pelvic limbs of broiler chicken presented evident lesions by palpation just above the hock and were readily observed when feathers were removed. Condemnation index due to pelvic limb injuries accounted for a total of five percent of slaughtered chickens,



sometimes reaching sixty percent of the animals in some flocks. Bird ages varied from 22 to 28 days, with no sex correlation. According to the data from the company, vaccination of the breeders and of the chickens against ARV was not carried out. The presence of major gross pathologic lesions included marked swelling, edema and hemorrhages (Figure 1A). Serous exudate was present between the tendons and hock joint. All lesions were very similar but with variable intensity.

### ***Microscopic Findings***

Histological changes consisted of synovial membranes hyperplasia (Figures 2A, 2B), in addition to numerous macrophages, plasma cells and lymphocytes and lymphoid aggregates (11/26). In the subcutaneous tissue there were an inflammatory infiltrate of lymphocytes, plasma cells and heterophils (19/55), hemorrhage (19/55) and fibrin deposition (15/55). Necrosis of muscle fibers (14/55) was observed in the gastrocnemius muscle, as well as fiber reabsorption (4/55) and infiltration of lymphocytes, plasma cells and macrophages (4/55). In the tibial cranial (16/55), pubisquiofemoral (19/55) and medial crural flexor (15/55) muscles, lesions were similar and characterized by individual fiber necrosis associated with inflammatory infiltrate of lymphocytes, plasma cells and macrophages, occasionally associated with heterophiles. Sometimes lymphoid aggregates (5/26), and the same inflammatory pattern (13/26) was observed extending from the muscles infiltrating the tendons sheaths gastrocnemius, metatarsal extensor and digital flexor (Figure 2C, 2D).

### ***RT-PCR and phylogenetic analysis***

All samples were positive by PCR for ARV and negative for *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Mycoplasma gallisepticum* (MG). Five RT-PCR positive samples (with cycle thresholds from 24.4 to 29.4) and different lesion degrees were further submitted to genotyping (Table 1). All of them presented an amplified fragment in the conventional PCR targeting  $\sigma$ C gene. The sequences showed a similarity from 49.6% to 100% and grouped into two distinct lineage clusters (II and V). Four samples (BR\_SC\_6996, BR\_SC\_6998, BR\_SC\_6999 and BR\_SC\_6997) clustered in the same branch (II), while the remaining one (BR\_SC\_7001) grouped in the cluster V (Figure 2). No correlation was observed among genotypes and lesions.

## DISCUSSION

The gross pathologic lesions observed in the present study were similar to the lesions caused by avian reovirus (ARV) described in the literature (Lu et al., 2015). Histological lesions seen in the present study were similar to the observed in an experimental study by avian reovirus, demonstrating mixed inflammatory infiltrate in the tendon sheaths in the acute phase of the disease (Jones, 1978). This pattern seems to be characteristic of ARV, since *Mycoplasma* sp. cause different histological lesions (Jones, 1978; Hill et al., 1989a; Hill et al., 1989b). In addition, the samples from this study were negative for *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Mycoplasma gallisepticum* (MG), the two main poultry pathogenic *Mycoplasma* species. ARV infects young birds, since they seem to become less susceptible to infection as they age and the histological lesions also tend to regress with the age (Jones, 1984). The birds analyzed in this study were slaughtered in up

to 28 days-old, however birds slaughtered with more than 35 days by the same company did not present gross lesions.

It is frequently not possible to isolate the agents that cause the bird lesions, since they are often not more found in a viable form in the moment of the sample collection (Jones, 1984). Therefore, PCR has been a useful diagnostic tool in field situations. Molecular studies also help to understand the epidemiology, origin and evolution of emerging variant virus strains (Kant et al., 2003; Kort et al., 2013). In the present study, ARVs were detected by PCR in all suspect samples. In addition, all of them were genotyped and classified into two previously characterized lineage/clusters (II and V). These new Brazilian ARVs sequences clustered into specific tree branches in these two lineages, demonstrating the occurrence of local field strains. The four ARVs that clustered within lineage II showed more similarity to isolates from Canada and USA, while the strain BR\_SC\_7001 of the lineage V was similar to ARVs sequences from Germany (Kort et al., 2013), Israel (Goldenberg et al., 2010) and USA (Lu et al., 2015). Further, all Brazilian ARVs sequences were well distinct from the other lineages detected in United States (USA), Tunisia, India (Kort et al., 2013) and Israel (Goldenberg et al., 2010). Specially, they were also different from the lineage I, where are all commercial vaccine ARVs, including S1133 strain. These results suggest that all field isolates are genetically distant from previously characterized strains and are disseminating in the Brazilian poultry flocks.

Although the number of complete genome sequences available in GenBank is still limited, sequence data collected in recent years suggests that the genetic material of the ARV strains is continually changing due to the known evolutionary mechanisms of reovirus as point mutation and rearrangements, resulting in genetically and antigenically

heterogenous strains (Attoui et al., 2011). Further, sequencing of whole genomes and determination of pathogenicity mechanism are needed to obtain better information about circulating strains of ARV and to develop efficient disease protection strategies (Ayalew et al., 2017). In summary, the present study demonstrated epidemiological, gross and microscopic features associated with the presence of ARVs different from vaccine strains, highlighting the occurrence of ARV pathogenic strains in poultry flocks from Brazil.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Simbios Biotecnologia, *Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS)*, *Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)* and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*. NI and VRL were also financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development from Brazil (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq*; process numbers 313564/2014-0; 313304/2014-9).

### REFERENCES

- Attoui, H.. Family Reoviridae in Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (eds King, A. M. Q. et al.) 541–554 (Elsevier, 2011).
- Ayalew, L.E., Gupta, A., Fricke, J., Ahmed, K.A., Popowich, S., Lockerbie, B., Tikoo, S.K., Ojkic, D., Gomis, S. 2017. Phenotypic, genotypic and antigenic

- characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. *Sci. Rep.* 7:3565.
- Caterina, K.M., Frasca, S., Girshick, T., Khan, M.I. 2004. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. *Mol. Cell. Probes*, 5: 293–298.
- Davis, J.F., Kulkarni, A., Fletcher, O. 2012. Myocarditis in 9- and 11-day-old broiler breeder chicks associated with a reovirus infection. *Avian Dis.*, 56: 786–790.
- Farkas, S.L., Marton, S., Dandár, E., Kugler, R., Gál, B., Jakab, F., Bálint, Á., Kecskeméti, S., Bányai, K. 2016. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. *Sci. Rep.* 10;6:36960.
- Goldenberg, D., Pasmanik-Chor, M., Pirak, M., Kass, N., Lublin, A., Yeheskel, A., Heller, D., Pitcovski, J. 2010. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. *Avian Pathol.* 39(3):189-199.
- Guo, K., Dormitorio, T.V., Ou, S.C, Giambrone, J.J. 2011. Development of TaqMan real-time RT-PCR for detection of avian reoviruses. *J. Virol. Methods*, 177: 75–79.
- Hill, J.E., Rowland, G.N., Glisson, J.R., Villegas, P. 1989a. Comparative microscopic lesions in reoviral and staphylococcal tenosynovitis. *Avian Dis.* 33(3):401-410.
- Hill, J.E., Rowland, G.N., Steffens, W.L., Ard, M.B. 1989b. Ultrastructure of the gastrocnemius tendon and sheath from broilers infected with reovirus. *Avian Dis.* 33(1):79-85.
- Jones, R.C. Studies on Experimental Tenosynovitis in Light Hybrid Chickens. 1978. *Avian Pathol.* 7: 171-181.

- Jones, R.C., Georgiou, K. 1984. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. *Avian Pathol.* 13: 441-457.
- Jones, R.C. Viral arthritis. In: *Diseases of Poultry* 12th edn. (eds Saif, Y. M. et al.) Ch. 11, 309–310 (Blackwell, 2008).
- Kant, A., Balk, F., Born, L., van Roozelaar, D., Heijmans, J., Gielkens, A., ter Huurne, A. 2003. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the sigma C protein. *Vet. Res.*, 34(2):203-212.
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.*, 30: 772–780.
- Kerr, K.M., Olson, N.O. 1964. Control of infectious synovitis. The effect of age of chickens on the susceptibility to three agents. *Avian Dis.* 8: 256–263.
- Kort, H.Y., Bourogâa, H., Gribaa, L., Scott-Algara, D., Ghram, A. 2013. Molecular characterization of avian reovirus isolates in Tunisia. *Virology*, 10: 12.
- Li, N., Hong, T., Wang, Y., Wang, Y., Yu, K., Cai, Y., Liu, S., Wei, L., Chai, T. 2016. The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. *Vet. Microbiol.* 192: 181–185.
- Liu, H.J., Lee, L.H., Hsu, H.W., Kuo, L.C., Liao, M.H. 2003. Molecular evolution of avian reovirus: Evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. *Virology* 314: 336–349.
- Lu, H., Tang, Y., Dunn, P.A., Wallner-Pendleton, E.A., Lin, L., Knoll, E.A. 2015. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011-2014. *Sci. Rep.* 5: 14727.

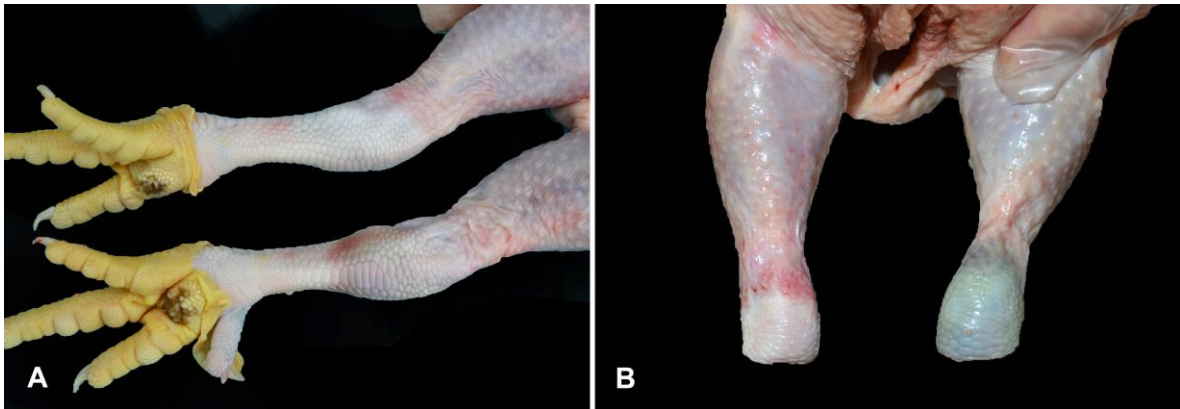
Reck, C., Menin, A., Canever, M.F., Miletti, L.C. 2013. Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* and avian reovirus in clinical samples of poultry using multiplex PCR. *Avian Dis.* 57(2):220-224.

Tang, Y., Lu, H. 2016. Whole genome alignment based one-step real-time RT-PCR for universal detection of avian orthoreoviruses of chicken, pheasant and turkey origins. *Infect. Genet. Evol.* 39: 120–126.

Van der Heide, L. 2000. The history of avian reovirus. *Avian Dis.* 44, 638–641.

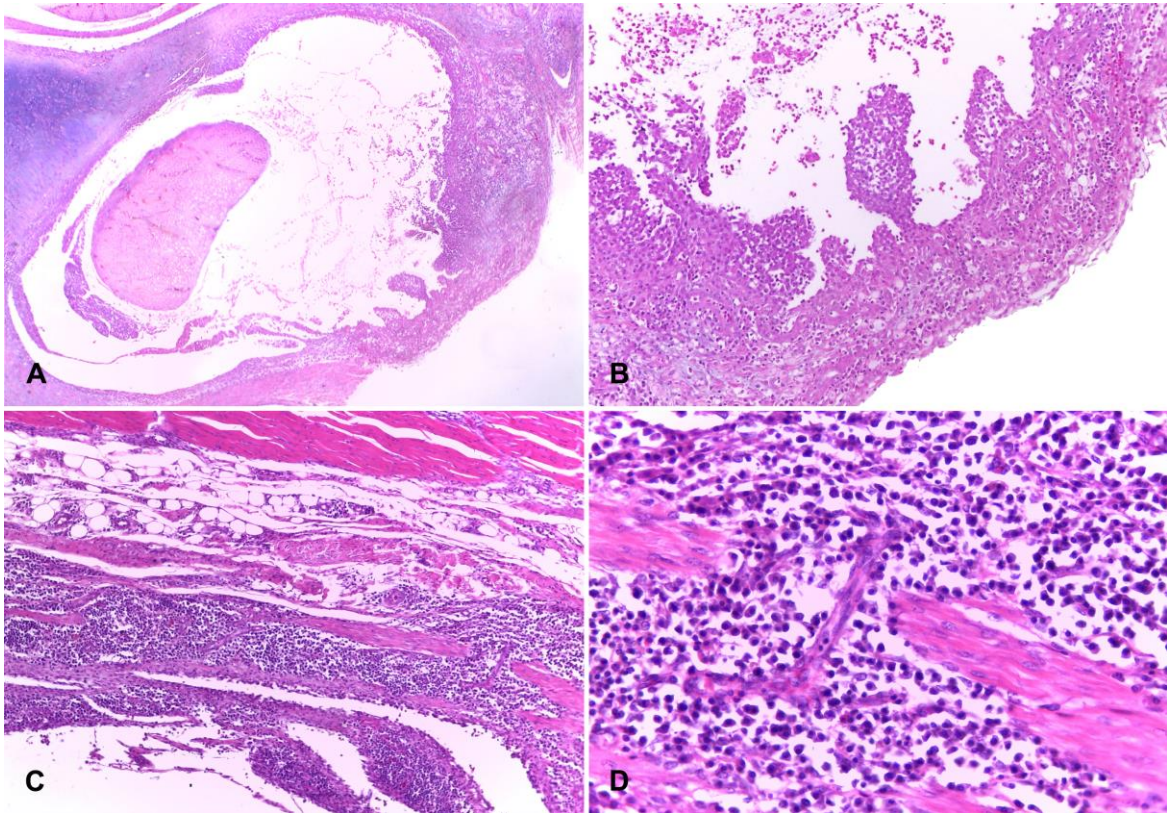
**Table 1.** Strains with pathological and molecular characteristics.

<b>Strain</b>	<b>Degree of injury</b>	<b>CT / Reovirus</b>	<b>Cluster</b>
6996	Degree 2	29,4	II
6997	Degree 3	24,4	II
6998	Degree 3	25,5	II
6999	Degree 3	28,0	II
7001	Degree 4	27,0	V

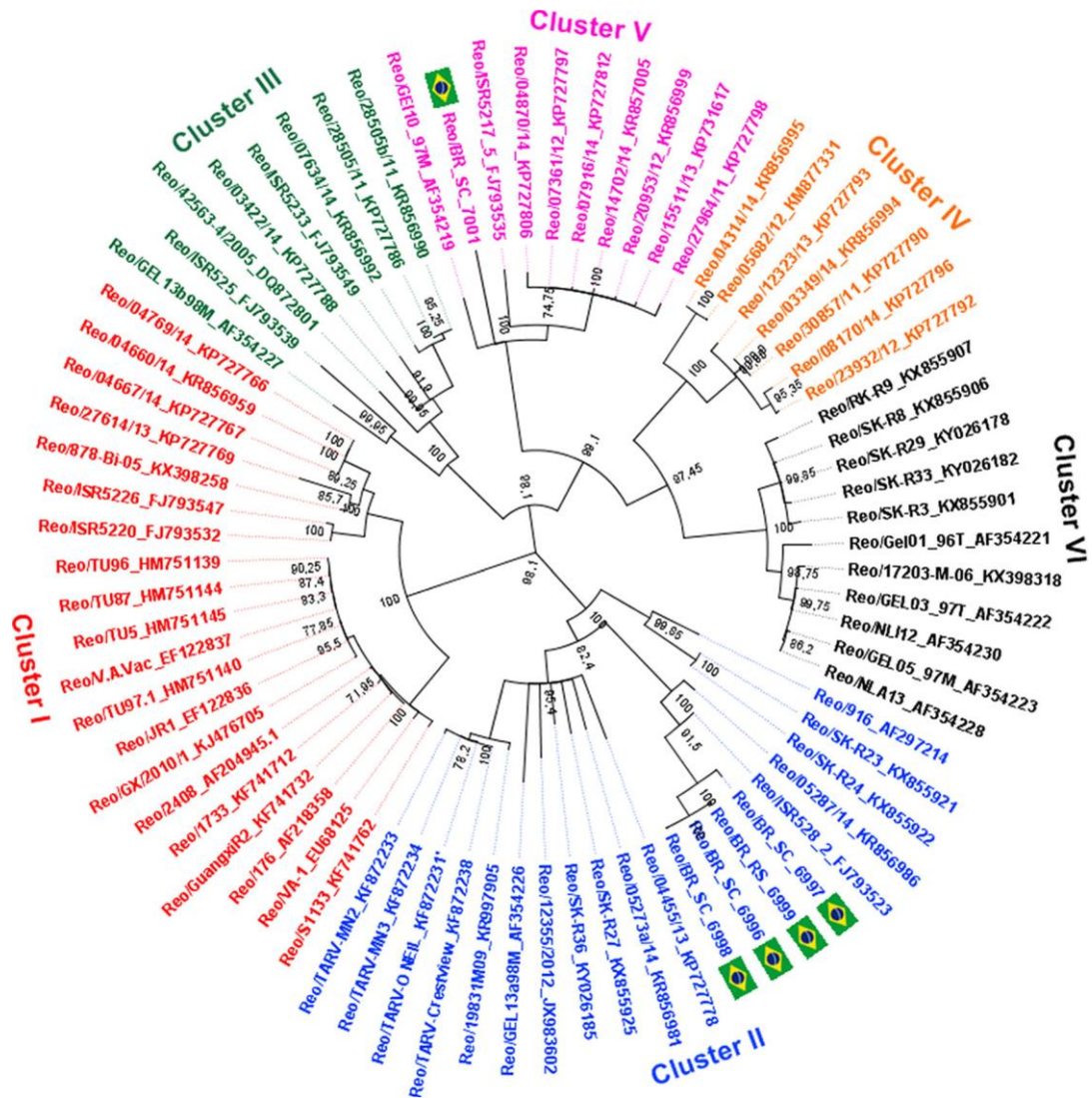


**Fig.1. Gross findings: A. Chicken, Tibiotarsometatarsic joint:** moderate unilateral volume increase (edema) associated with multifocal areas of reddish color (bleeding). **B. Chicken, Tibiotarsometatarsic joint:** unilateral volume increase associated with hemorrhage in the subcutaneous tissue, conferring a greenish color to the joint.





**Fig.2. Histopathologic findings of Reovirus infection in Chicken:** **A. Tibiotarsometatarsic joint:** synovial cell hyperplasia, predominantly mononuclear inflammatory infiltrate, associated with cellular debris, hemacias and fibrin in the joint space. HE, 4x. **B. Synovial membran:** synovial cell hyperplasia forming villi associated with predominantly mononuclear inflammatory infiltrate, cell debris, hemacias and fibrin. HE, 10x **C. Insertion of muscle to tendon:** mononuclear inflammatory infiltrate and formation of lymphoid aggregates. HE, 4x. **D. Insertion of muscle to tendon:** mononuclear inflammatory infiltrate between the collagen fibers: HE, 20x.



**Fig.3. Phylogenetic tree of ARV strains based on the Sigma C sequence variability.** The virus strains clustered into six genotyping groups (color coded). Our isolates are identified by ReoBR. The tree was built by Neighbor joining method with Jukes-Cantor genetic distance model.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou as características epidemiológicas, macroscópicas e microscópicas associadas à presença de cepas de ARVs distintas às cepas vacinais, destacando a ocorrência de cepas patogênicas em aves comerciais do Brasil. Até o presente momento, esse trabalho é pioneiro ao relatar a ocorrência de cepas patogênicas variantes de reovírus como causa de lesões articulares em frangos de corte no Brasil.

As avaliações, macroscópica e histopatológica, são ferramentas de triagem adequadas em suspeitas de lesões articulares por ARV, as quais devem ser associadas a provas moleculares, para que o diagnóstico definitivo seja obtido. Em nosso trabalho, não foi possível realizar a correlação entre grau de lesão e a classificação das cepas envolvidas.

O ARV deve ser incluído no diagnóstico diferencial de lesões articulares em frangos de corte no Brasil. Deve-se ter uma atenção especial quanto a este agente, na inspeção das aves com idade de abate precoce (frango tipo “griller”), pois esta é a idade de maior ocorrência e de maior intensidade das lesões. A observação a campo das aves, também deve ser realizada, visto que estas podem apresentar lesões sem sinais clínicos evidentes e as que apresentam sintomatologia são descartadas durante a criação, não sendo avaliadas ao abate.

O conhecimento da ocorrência de lesões articulares por cepas patogênicas de reovírus, alerta para a ocorrência das outras formas de apresentação do agente, associadas ou não à artrite. A avaliação dos demais tecidos deve ser realizada em trabalhos futuros para tentar determinar e contabilizar as perdas silenciosas durante o período produtivo.

As condenações ocorreram em lotes provenientes de matrizeiros de diferentes regiões de abrangência do abatedouro, e a fonte de infecção dos frangos não pode ser determinada. A avaliação das matrizes e suas progênes deve ser realizada de forma sistemática para verificar uma possível correlação da idade das matrizes com a ocorrência da enfermidade nos frangos de corte, a ocorrência de transmissão no incubatório, bem como o papel dos machos reprodutores nestes casos.

Relatos e estudos de casos, que determinem a ocorrência de cepas patogênicas de reovírus circulantes no Brasil são escassos; todavia, são importantes para o conhecimento da epidemiologia do vírus e dos desafios enfrentados pelas aves de diferentes regiões do país.

As matrizes da empresa integradora foram vacinadas com vacina comercial após a ocorrência dos casos relatados no artigo, contudo os problemas na progênie persistiram, o que sugere a ineficiência do programa vacinal adotado. Estudos futuros, devem caracterizar tanto as lesões observadas quanto as cepas circulantes de reovírus. Esta busca ativa deve ser contínua, o que poderá aumentar as chances de sucesso de vacinas autógenas, assegurando a continuidade da cadeia produtiva.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2018**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>. Acesso em: 20 fev.2019.
- AL-MUFFAREJ, S.I.; SAVAGE, C.E.; JONES, R.C. Egg transmission of avian reoviruses in chickens: Comparison of a trypsin-sensitive and a trypsin-resistant strain. **Avian Pathology**. v.25, p.469-480, 1996.
- ANSONG-DANQUAH J. A survey of carcass condemnation at a poultry abattoir and its application to disease management. **The Canadian Veterinary Journal**. v.28, p.53-56, 1987.
- ARMENDARIS P. Abate de aves: dados de condenações- Serviço de Inspeção Federal. In: ANAIS DO SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 2006, Santa Maria.
- ATTOUI, H. et al. Family Reoviridae in Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. In: King, A. M. Q. et al. (Eds.) **Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, p.541–554, 2011.
- AWANDKAR, S.P. et al. Growth performance of broilers in experimental Reovirus infections. **Veterinary World**. v.5, n.11, p.685-698, 2012.
- BENAVENTE, J.; MARTÍNEZ-COSTAS, J. Avian reovirus: Structure and biology. **Virus Research**. v.123, n.2, p.105–119, 2007.
- BRASIL. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. In: BRASIL: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, p. 226, de 26 de novembro de 1998, Seção I.
- BOTTINO, J. A. et al. Agente viral isolado de casos de artrite em frangos de corte e em galinhas de postura. **O Biológico**. v.41, n.6, p.168–169, 1975.
- CHEN, I.S. et al. Avian reovirus replication in mononuclear phagocytes in chicken footpad and spleen after footpad inoculation. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.79, p.87–94, 2015.
- CHI, P.I. et al. The p17 Nonstructural Protein of Avian Reovirus Triggers Autophagy Enhancing Virus Replication via Activation of Phosphatase and Tensin Deleted on Chromosome 10 (PTEN) and AMP-activated Protein Kinase (AMPK), as well as dsRNA dependent Protein Kinase (PKR)/eIF2 $\alpha$  Signaling Pathways. **The Journal of Biological Chemistry**. v.288, n.5, p.3571–3584, 2013.
- CLARK, F.D. et al. Characterization of Avian Reovirus Strain-Specific Polymorphisms. **Avian Diseases**. v.34, p.304-314, 1990.

- CURTIS, P.E. et al. Tenosynovitis in young pheasants associated with reovirus, staphylococci and environmental factors. **The Veterinary record**. v.131, p.293, 1992.
- DAY, J.M.; PANTIN-JACKWOOD, M.J. Sequence and phylogenetic analysis of the S1 genome segment of turkey-origin reoviruses. **Virus Genes** v.35, p.235–242, 2007.
- DE GUSSEM, J. et al. Reovirus tenosynovitis in a flock of layer breeders. **Avian Pathology**. n.39, v.3, p.169-170, 2010.
- DE HERDT, P. et al. Field experiences with ERS type reovirus infections in diseased broilers reared under Western European field circumstances. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. v.78, p.171-175, 2008.
- DE VANDEN BERGE, J.C. Miologia das aves. In: Getty R., **Sisson [e] Grossman: anatomia dos animais domésticos**. 5th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. cap. 61, 1986, p.1691- 1728.
- DOBSON, K. N.; GLISSON, J. R. Case Report Economic Impact of a Documented 55 Case of Reovirus Infection in Broiler Breeders. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 36, n. 3, p. 788–791, 1992.
- ELLIS, M. N.; EIDSON, C. S.; FLETCHER, O. J.; KLEVEN, S. H. Viral tissue tropisms and interferon production in White Leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. **Avian Diseases**. v.27, n.3, p.644-651, 1983.
- FEDUCCIA A. Osteologia das aves. In: Getty R., **Sisson [e] Grossman: anatomia dos animais domésticos**. 5th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. cap. 60, 1986, p.1680-1690.
- GIMENO, E. 2009. *Doenças aviárias na América Latina*. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P (Ed.), **Patologia aviária**. Barueri: Manole, p.2-5.
- GOLDENBERG, D. et al. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 39, n. 3, p. 189–199, 2010.
- GRANDE, A.; BENAVENTE, J. Optimal conditions for the growth, purification and storage of the avian reovirus S1133. **Journal of Virological Methods**. v.85, p.43–54, 2000.
- HILL, J.E. et al. Comparative Microscopic Lesions in Reoviral and Staphylococcal Tenosynovitis. **Avian Diseases**. v.33, p.401-410, 1989.
- JONES, R.C.; ONUNKWO, O. Studies on experimental tenosynovitis in light hybrid chickens. **Avian Pathology**. v.7, n.1, p.171-181, 1978.
- JONES, R.C.; GEORGIU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. **Avian Pathology**. v.13, n.3, p.441-457, 1984a.



- JONES, R.C.; KIBENGE, F.S.B. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The effect of breed. **Avian Pathology**. v.13, n.3, p.511-528, 1984b.
- JONES, R.C.; GUNERATNE, J.R.M. The pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. **Avian Pathology**. v.13, n.2, p.173-189, 1984c.
- JONES, R.C.; GEORGIU, K. The temporal distribution of an arthrotropic reovirus in the leg of the chicken after oral infection. **Avian Pathology**. v.14, p.75-85, 1984d.
- JONES, R.C. Avian reovirus infection. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v.19, n.2, p.614-625, 2000.
- JONES, R. C. 2008. *Reovirus infections*. In: SAIF, Y.M. et al. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12 th ed. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, p. 309-328.
- JORDA F. et al. 2001. **Poultry Diseases**. 5 th ed. WB Saunders, London., p. 750.
- KANT, A. et al. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the  $\sigma$  C protein. **Veterinary Research**. v.33, n.3, p.239–250, 2002.
- KANT, A. et al. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the  $\sigma$  C protein. **Veterinary Research**. v.34, p.203–212, 2003.
- KINBENGE, F.S.B. et al. Bacterial and viral agents associated with tenosynovitis in broiler breeders in Western Australia. **Avian Pathology**. v.11, n.3, p.351-359, 1982.
- KINBENGE, F.S.B. et al. Experimental reovirus infection in chickens: observations on early viraemia and virus distribution in bone marrow, liver and enteric tissues. **Avian Pathology**. v.14, n.1, p.87-98, 1985.
- KLEVEN, S. H.; FERGUSON-NOEL, N. 2008. *Mycoplasma synoviae Infection*. In: SAIF, Y.M. et al. (Ed.), **Diseases of Poultry**. 12 th ed. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, p. 845-856.
- KORT, Y.H. et al. Genotyping and Classification of Tunisian Strains of Avian Reovirus using RT-PCR and RFLP Analysis. **Avian Diseases**. v.59, n.1, p.14-19, 2015.
- LIU, H.J. et al. Development of an ELISA for detection of antibodies to avian reovirus in chickens. **Journal of Virological Methods**. v.102, p.129–138, 2002.
- LIU, H.J. et al. Molecular evolution of avian reovirus: evidence for genetic diversity and reassortment of the S-class genome segments and multiple cocirculating lineages. **Virology**. v.314, p.336–349, 2003.
- LIU, H.J. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Avian Pathology**. v.33, n.2, p.171-180, 2004.

- LU, H. et al. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. **Scientific Reports**. v.5, p.14727, 2015.
- LUBLIN, A. et al. Wide-range protection against avian reovirus conferred by vaccination with representatives of four defined genotypes. **Vaccine**. v.29, p.8683– 8688, 2011.
- MANSOUR, S. M. et al. Isolation and Detection of Avian Reovirus from Tenosynovitis and Malabsorption Affected Broiler Chickens with Involvement of Vertical Transmission. **Journal of Virology Science**. v.4, 2018.
- MARTÍNEZ-COSTAS, J. et al. Protein Architecture of Avian Reovirus S1133 and Identification of the Cell Attachment Protein. **Journal of Virology**. v.71, n.1, p.59-64, 1997.
- MARTINS, N.R.S.; RESENDE, J.S. *Adenoviroses, reoviroses, rotaviroses e viroses intestinais*. In: JÚNIOR, A.B. et al. (Ed.) **Doenças das aves**. 2<sup>th</sup> ed. Facta, São Paulo. cap. 5.6, 2009, p.677-710.
- MEANGER, J. et al. Tissue tropism of avian reoviruses is genetically determined. **Veterinary Research**. v.30, n.5, p.523-529, 1999.
- MILLS, J.N.; WILCOX G.E. Replication of four antigenic types of avian reovirus in subpopulations of chicken leukocytes. **Avian Pathology**, v.22, n.2, p.353-361, 1993
- MOR, S.K et al. Isolation and Characterization of a Turkey Arthritis Reovirus. **Avian Diseases**. v.57, n.1, p.97-103, 2013.
- MOR, S.K. et al. Survival of turkey arthritis reovirus in poultry litter and drinking water. **Poultry Science**. v.94, p.639–642, 2015.
- OH, J.Y. et al. Occurrence of purulent arthritis broilers vertically infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Korea. **Poultry Science**. v.89, p.2116–2122, 2010.
- O’HARA, D. et al. Avian Reovirus Major m-Class Outer Capsid Protein Influences Efficiency of Productive Macrophage Infection in a Virus Strain-Specific Manner. **Journal of Virology**. v.75, n.11, p. 5027–5035, 2001.
- OSLON, N.O.; KERR K.M. Some Characteristics of an Avian Arthritis Viral Agent. **Avian Diseases**. v.10, n.4, p. 470-476, 1966.
- OSLON, N.O.; WEISS, R. Similarity between Arthritis Virus and Fahey-Crawley Virus. **Avian Diseases**. v.16, n. 3, p. 535-540, 1972.



- PALOMINO-TAPIA, V. et al. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012–2017 based on partial sigma ( $\sigma$ )C gene. **Virology**. v.522, p.138–146, 2018.
- PALYA, V. et al. Reovirus identified as cause of disease in young geese. **Avian Pathology**. v.32, p.129- 138, 2003.
- RAU et al. Onset of Progeny Immunity against Viral Arthritis/Tenosynovitis after Experimental Vaccination of Parent Breeder Chickens and Cross-Immunity against Six Reovirus Isolates. **Avian Diseases**. v.24, n.3, p.548-657, 1980.
- RECK, C. **Detecção de *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovirus aviário* em lesões de artrites em matriz e frango de corte**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.
- RECK, C. et al. Características clínicas e anatomo-histopatológicas da infecção experimental mista por Orthoreovirus aviario e Mycoplasma synoviae em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.8, p.687-691, 2012.
- RIOS, R.L. et al. The occurrence of Orthoreovirus, Rotavirus and chicken anemia virus in chickens of the poultry industry in Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.6, p.1613-1620, 2012.
- ROESSLER, D.E; ROSENBERGER, J.K. In vitro and in vivo Characterization of Avian Reoviruses. III. Host Factors Affecting Virulence and Persistence. **Avian Diseases**. v.33, p.555-565, 1989.
- ROSENBERGER, J.K. et al. In Vitro and In Vivo Characterization of Avian Reoviruses. I. Pathogenicity and Antigenic Relatedness of Several Avian Reovirus Isolates. **Avian Diseases**. v.33, p.535-544, 1989.
- ROSENBERGER, J.K. *Reovirus infections*. In: SAIF, Y.M. et al. (Eds.), **Diseases of Poultry**, 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University Press, 2003. p- 283-298.
- SABADIN, A.B. Reoviruses: a new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. **Science**. v.130, p.1387–1389, 1959.
- SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J. et al. Reovirus Infection in Psittacine Birds (*Psittacus erithacus*): Morphologic and Immunohistochemical Study. **Avian Diseases**. v.46, p.485–492, 2002.
- SANTOS, H.F. et al. Anticorpos contra vírus em galinhas de terreiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v.38, n.7, p. 1932-1937, 2008.
- SAVAGE, C.E.; JONES R.C. The survival of avian reoviruses on materials associated with the poultry house environment. **Avian Pathology**. v.32, n.4, p.419-425, 2003.

SEQUEIRA, J.L. *Diagnóstico Histopatológico*. In: FILHO R.L.A. (Eds.) **Saúde Aviária e Doenças**. Roca, São Paulo. cap. 3, 2006, p.18-29.

SHMULEVITZ, M.; DUNCAN, R. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. **The EMBO Journal**. v.19, n.5, p.902-912, 2000.

STALKER, M.J. et al. Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.22, p.643–645, 2010.

TAMEHIRO, C.Y. et al. Segmented double-stranded genomic RNA viroses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.34, p.349-353, 2003.

TANG, Y. et al. Detection and characterization of two co-infection variant strains of avian orthoreovirus (ARV) in young layer chickens using next-generation sequencing (NGS). **Scientific reports**. v.6, p.24519, 2016.

TROXLER, S. et al. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. **Veterinary Record**. v. 172, n. 21, p. 556, 2013.

USDA- United States Department of Agriculture. Production, supply and distribution, 2011. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>> Acesso em: 29 de Março de 2018.

VAN DER HEIDE, L.; KALBAC, M.; HALL, W.C. Infectious Tenosynovitis (Viral Arthritis): Influence of Maternal Antibodies on the Development of Tenosynovitis Lesions after Experimental Infection by Day-old Chickens with Tenosynovitis Virus. **Avian Diseases**. v.20, n.2, p. 641-648, 1976.

VASCONCELOS, S.B.S. et al. Lesões articulares em frangos de corte (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.2, p.80-83, 2001.

VASCONCELOS, S.B.S et al. Lesões viscerais induzidas experimentalmente pela inoculação de uma amostra artrotópica de reovírus em frangos de corte (*Gallus gallus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n.2, p.84-87, 2001b.

VASSERMAN, Y. et al. The Influence of Reovirus Sigma C Protein Diversity on Vaccination Efficiency. **Avian Diseases**. v.48, n. 2, p. 271-278, 2004.

ZHONG, L. et al. Genetic and pathogenic characterization of 11 avian reovirus isolates from northern China suggests continued evolution of virulence. **Scientific RepoRts**. v.18, n.6, p.35271, 2016.

WICKRAMASINGHE, R. et al. Avian Reovirus Proteins Associated with Neutralization of Virus Infectivity. **Virology**. v.194, p.688-696, 1993.