

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

**SILVIA DE CARLI**

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE REOVÍRUS  
AVIÁRIO NO BRASIL**

**Porto Alegre  
2019**

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

**DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE REOVÍRUS**  
**AVIÁRIO NO BRASIL**

Silvia De Carli

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias, especialidade Virologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Coorientador: Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge

Porto Alegre

2019

**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

De Carli, Silvia  
DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE REOVÍRUS  
AVIÁRIO NO BRASIL / Silvia De Carli. -- 2019.  
43 f.  
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal.

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

1. Artrite. 2. Filogenia. 3. Orthoreovírus. 4. Galinha. 5. gene  $\sigma$ C. I. Wageck Canal, Prof. Dr. Cláudio, orient. II. Título.

**Silvia De Carli**

DIAGNÓSTICO E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE REOVÍRUS AVIÁRIO NO  
BRASIL

Dissertação de Mestrado em Virologia Veterinária submetida ao programa de Ciências  
Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado por:

.....

Dr. Cláudio Wageck Canal  
Orientador e Presidente da Comissão

.....

Dr. André Streck  
Membro da Comissão

.....

Dr. David Driemeier  
Membro da Comissão

.....

Dra. Michele Lunardi  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a “Deus” por sempre iluminar os meus caminhos, por me auxiliar em todos os momentos complicados da minha vida e por sempre colocar pessoas especiais junto a mim nessa jornada, fazendo com que todo o caminho percorrido seja leve e seguro.

Família, obrigada por estarem do meu lado durante toda minha vida, me apoiando, me acalmando, acreditando em mim e enxergando qualidades muito maiores das quais eu realmente tenho. Amo vocês.

Meus queridos filhos de quatro patas, vocês foram, são e serão a minha inspiração! Vocês, sem dúvidas, me ensinaram a amar e respeitar os animais e me levaram a escolher essa profissão linda. Espero que eu possa retribuir todo este amor auxiliando outros animais.

Agradeço imensamente a todos os meus amigos, pelo carinho, apoio e compreensão durante todos esses anos e por celebrarem comigo cada vitória da minha jornada.

Aos mestres Vagner e Cláudio, por todo auxílio, por todos os conselhos, por facilitar toda a realização desse trabalho e por sempre acreditar que no fim tudo daria certo.

## RESUMO

Reovírus aviários (ARV, *avian orthoreovirus*) pertencem ao gênero *Orthoreovirus*, família *Reoviridae*, e podem infectar aves de diferentes espécies em todo o mundo. A artrite viral em galinhas (*Gallus gallus*) pode ser causada pelo ARV e representa um problema sanitário e econômico, provocando perdas de produtividade nos lotes em produção e até de industrialização do produto final para consumo. O presente estudo objetivou revisar a filogenia e a classificação de ARVs detectadas em galinhas em todo mundo e avaliar a disseminação das principais linhagens presentes no Brasil. Cem amostras foram obtidas de galinhas com suspeita de ARV de granjas de quatro importantes estados produtores de frango do Brasil (RS, SP, PR e SC). Dezesete amostras foram selecionadas para representar todo o banco, cultivadas em células, submetidas à detecção de RNA por RT-PCR do segmento M e genotipadas pelo sequenciamento do gene  $\sigma C$  do segmento S do genoma de ARV. Em paralelo, foi construído um *dataset* de sequências de nucleotídeos do gene  $\sigma C$  disponíveis no Genbank para classificação de ARVs circulantes no mundo e identificação taxonômica dos isolados brasileiros sequenciados. A análise filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança e o estudo da história evolutiva das linhagens presentes no Brasil por inferência bayesiana. Os dezessete isolados de ARV apresentaram resultado positivo na RT-PCR, sendo sequenciados e incluídos na análise filogenética. Com base na topologia da árvore, suporte filogenético e identidade de nucleotídeos, a análise do *dataset* com 468 sequências permitiu uma nova classificação taxonômica em cinco principais linhagens de ARV (I a V), muitas das quais com duas ou mais sub-linhagens (I vacinal, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IVa e IVb). As amostras brasileiras desse estudo foram identificadas como Ib (n= 11), IIb (n= 2), III (n= 1) e V (n= 3); todas associadas a casos de tenossinovite (com ou sem condenação de carcaças de frango em frigoríficos) e/ou síndrome de má absorção em lotes de aves de produção industrial. A única sub-linhagem que apresentou sinal adequado para estudo temporal foi Ib, sendo demonstrado que esta surgiu no mundo em 1968 (1953 a 1982, intervalo de maior densidade posterior [HPD] de 95%) com um tamanho populacional efetivo e constante ao longo do tempo, já no Brasil a introdução ocorreu em 2010 (2007 a 2012, [HPD] de 95%).

**Palavras-chaves:** Artrite, filogenia, genotipagem, Orthoreovírus, galinha, gene  $\sigma C$ .

## ABSTRACT

Avian reoviruses (ARVs) belong to the genus *Orthoreovirus*, family *Reoviridae*, and can infect birds of different species worldwide. Viral arthritis in chickens (*Gallus gallus*) could be caused by ARV. It is an important health and economic problem in the poultry industry, causing high losses in the productivity of the flocks as well as in the chicken processing in the slaughterhouses. The present study aimed to review the phylogeny and classification of ARVs detected in poultry flocks worldwide and to evaluate the dissemination of the lineages occurring in Brazil. One hundred samples were obtained from birds with suspected ARV from the four main Brazilian poultry-producing states (SC, RS, PR and SP). Seventeen samples were selected to represent all and cultured in cells. All of them were analyzed to detect ARV RNA by RT-PCR based on the M segment and genotyped by RT-PCR and sequencing of  $\sigma$ C gene. In parallel, a dataset of gene  $\sigma$ C nucleotide sequences available from Genbank was organized to classify circulating ARVs in the world and taxonomic identification of the Brazilian sequences. Phylogenetic analysis was performed by the maximum likelihood method and the study of the evolutionary history of the lineages present in Brazil by Bayesian inference. All 17 ARV isolates presented positive results in RT-PCR and could be genotyped to be included in the phylogenetic analysis. Based on the tree topology, phylogenetic support and nucleotide identity, the overall analysis of a dataset with 468 sequences allowed a new taxonomic classification in five main ARV strains (I to V), many of them with two or more sublineages (I vacinne, Ia, Ib, IIa, IIb, IIc, IVa e IVb ). The results showed the occurrence of the lineages Ib (n = 11), IIb (n = 2), III (n = 1) and V (n = 3) in Brazil; all of them associated with clinical cases of tenosynovitis (with or without condemnation of chicken carcasses in the slaughterhouses) or malabsorption syndrome in industrial poultry flocks. The only sublineage that presented temporal signal was Ib. This lineage appeared in the world in 1968 (1953 to 1982, 95% higher posterior density range [HPD]) with an effective and constant population size over time. In Brazil, it was introduced in 2010 (2007 to 2012, [HPD] of 95%).

**Keywords:** Arthritis, phylogeny, genotyping, Orthoreovirus, chicken, gene  $\sigma$ C.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Representação gráfica de uma partícula de *orthoreovírus*..... 15
- Figura 2. Filogenia de ARV a partir da análise da região do gene  $\sigma C$  ..... 17
- Figura 3. Representação diagramática do mRNA da cepa s1133 do segmento S1 do reovírus aviário ..... 18
- Figura 4. Lesões Macroscópicas de casos de artrite viral causada por ARV ..... 21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos 10 segmentos genômicos dos <i>Orthoreovirus</i> . .....	16
--	----

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ARV – *Avian reovirus*

PCR – Reação em cadeia da polimerase

MS – *Mycoplasma synoviae*

MAS – *Malabsorption syndrome*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

RNA – Ácido ribonucleico

PRV – *Pteropine orthoreovirus*

MRV – *Mammalian orthoreovirus*

NBV – *Nelson Bay orthoreovirus*

BRV – *Baboon orthoreovirus*

RRV – *Reptilian orthoreovirus*

ICTV – *International committee on taxonomy of viruses*

SPF – *Specific pathogen free*

CAM – Membrana corioalantóica

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

RT-PCR – *reverse transcription polimerase chain reaction*

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

LAMP – *Loop mediated isothermal amplification*

HPD – Intervalo de maior densidade posterior

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Taxonomia e características genéticas.....	15
2.2 Reovirose: Patogenia, aspectos clínicos e alterações patológicas.....	19
2.3 Diagnóstico.....	21
2.4 Controle e profilaxia.....	23
2.5 Epidemiologia molecular / Distribuição geográfica.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivos específicos.....	27
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
5. DISCUSSÃO GERAL.....	29
6. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
Anexo 1.....	43

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil é de 13,5 milhões de toneladas (33,1% destinados à exportação). O país é o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos, e o principal exportador mundial (ABPA, 2018). O sucesso da cadeia produtiva brasileira é fruto de um intenso trabalho de seleção e melhoramento genético, adoção de modernas técnicas de manejo e medidas de biossegurança. O Brasil também apresentou um crescimento acentuado nos lotes de aves para a produção de frangos e ovos nas últimas três décadas. Muitos serviços veterinários da indústria e do governo não conseguiram responder adequadamente a esse enorme aumento na produção, inclusive com a redução do rigor nas medidas de biossegurança (GONÇALVES; DE MORAES, 2017). Esta situação impôs condições extremas à saúde animal, tendo em vista o aumento da densidade populacional para facilitar nutrição e manejo (ANDREATTI FILHO, 2007). A superlotação dos lotes nas granjas também pode ocasionar variações fisiológicas significativas levando ao estresse imunológico e conseqüentemente quadros de imunodepressão, aumentando a multiplicação e disseminação de vírus e bactérias e a ocorrência de surtos das mais diversas doenças infecciosas nas aves de produção (HECKERT et al., 2002).

O controle sanitário dos plantéis em produção é rotina nas granjas e empresas avícolas. Medidas gerais de controle normalmente são realizadas e envolvem a retirada de carcaças de animais mortos, uso de água de boa qualidade, controle de animais sinantrópicos, assepsia do uniforme de funcionários e visitantes, entre outros (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2010). Associada a estas estratégias, realiza-se as imunizações das aves com programas de vacinação específicos para os agentes das principais doenças (como bronquite infecciosa, doença de Gumboro, doença de Marek, etc). Além disso, *Salmonella* e *Mycoplasma* são monitorados na maioria dos lotes de matrizes em produção (ANDREATTI FILHO, 2007).

As demais patologias são normalmente avaliadas pela ocorrência de manifestações clínicas específicas nas aves. Em geral, existe uma atenção maior dos veterinários de campo com sinais de doenças respiratórias, imunodepressoras e entéricas. Já a monitoria de doenças associadas a outros quadros clínicos tem ficado em segundo plano. As artrites infecciosas (tenossinovites), por exemplo, raramente são avaliadas. Mas este quadro clínico causa imobilidade e prostração nas aves dos lotes em

produção. Animais com patologias no sistema locomotor não têm acesso à fonte de alimento e água, e muitos acabam reduzindo o crescimento e até mesmo morrendo por inanição e desidratação. O resultado é um aumento da morbi-mortalidade e diminuição da produtividade geral dos lotes afetados (BERTOZI; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2001; ANDREATTI FILHO, 2007).

Os principais agentes causadores de tenossinovites são o *Mycoplasma synoviae* (MS) e o reovírus aviário (ARV, *avian reovirus*) (JONES, 2008). *M. synoviae* apresenta surtos, geralmente regionais, sendo raros os casos de ampla disseminação (FERGUSON-NOEL, 2008). Com relação ao ARV, estudos recentes têm demonstrando uma ocorrência crescente em aves de produção em diferentes locais do mundo (DAVIS; KULKARNI; FLETCHER, 2013; FARKAS et al., 2016; LI et al., 2016; LU et al., 2015; TANG et al., 2016). Além da perda econômica nas granjas, as artrites podem causar condenação de carcaças em frigoríficos. Estudos *post mortem* de aves sob inspeção no Estado do Rio Grande do Sul demonstraram que artrites são importantes causas de condenações parciais / totais de carcaças (GIOTTO, 2008; SCHLESTEIN, 2007; SESTERHENN et al., 2010). Estes dados são reforçados por um estudo em 173 abatedouros registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal entre os anos de 2012 a 2015, que demonstrou a artrite como a 6ª maior causa de condenação parcial ou total de carcaças de frangos (COLDEBELLA et al., 2018).

ARV também pode desencadear um quadro de síndrome de má absorção (*malabsorption syndrome* - MAS), doença multifatorial caracterizada principalmente por retardo de crescimento, empenamento defeituoso e diarreia com alimentos não digeridos. Nestes casos, também ocorre à influência de outros agentes, tais como enterovírus, adenovírus, parvovírus e diversas bactérias (MCFERRAN et al., 1984 apud SONGSERM et al., 2002).

Os ARVs são normalmente avaliados por análises filogenéticas do gene  $\sigma$ C do segmento S1. Esse gene tem o maior nível de divergência de sequências, sendo preferencialmente usado na diferenciação e classificação das cepas desde 2003 (LIU et al., 2003). Estudos prévios propuseram a provável existência de seis linhagens virais (identificadas por números romanos I, II, III, IV, V e VI) circulando nas principais regiões de produção industrial de aves em todo mundo (AYALEW et al., 2017; LIU et al., 2003; LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018). No entanto, os sistemas de

identificação e caracterização de ARV previamente propostos apresentam divergências (AYALEW et al., 2017; PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

O presente estudo revisou a filogenia molecular e a classificação dos ARVs com base em dados de sequências do gene  $\sigma$ C de todo mundo. A partir de uma nova classificação, foram determinadas as linhagens e sublinhagens atualmente circulantes no Brasil. Análises temporais adicionais objetivaram determinar o tempo do ancestral recente mais comum e a história evolutiva dessas linhagens detectadas nas amostras de campo do Brasil.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Taxonomia e características genéticas

Os ARVs são da família *Reoviridae*, subfamília *Spinareovirinae*, gênero *Orthoreovirus* e espécie *Avian Orthoreovirus*. Existem também outras cinco espécies neste gênero: *Mammalian Orthoreovirus* (MRV), *Nelson Bay Orthoreovirus* (NBV), *Baboon Orthoreovirus* (BRV), *Reptilian Orthoreovirus* (RRV) e *Piscine Orthoreovirus* (PRV). Os ARVs são específicos das aves e apresentam grande diversidade antigênica e, em geral, ausência de atividade hemaglutinante (ALFIERI et al., 2017).

As partículas virais se caracterizam pela simetria icosaédrica, ausência de envelope e genoma constituído por RNA fita dupla (*double-stranded-RNA; dsRNA*) segmentado. O genoma está envolto em um capsídeo com dupla camada protéica, com 70 a 80 nm de diâmetro e consiste de 10 segmentos divididos em três classes de tamanho: três grandes (*Large - L1, L2 e L3*), três médios (*Medium - M1, M2 e M3*) e quatro pequenos (*Small - S1, S2, S3 e S4*). O tamanho total do genoma é de aproximadamente 23.500 pares de bases (ALFIERI et al., 2017; DAY, 2009) (Figura 1).

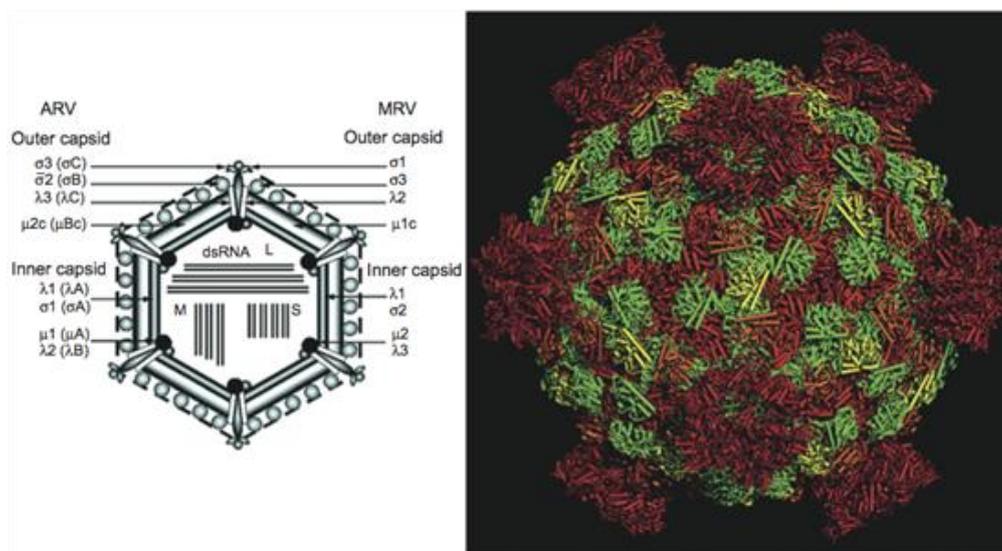


Figura 1. Representação gráfica de uma partícula de *orthoreovirus*. (Superior esquerda) Representação diagramática de uma partícula de *orthoreovirus* em seção transversal. As localizações e identidades das proteínas estruturais do vírus são indicadas usando o esquema de nomenclatura para ortoreovírus de mamíferos (MRV) e ortoreovírus de aves (ARV). São indicados os componentes proteicos das cápsides internas e externas (Superior direita) Imagem gerada por computador do capsídeo interno do orthoreovirus 1 de mamíferos (MRV-1), baseada em dados de cristalografia de raios X. Fonte: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

Cada segmento geralmente codifica apenas uma proteína (exceto os segmentos S1 e M3 que codificam duas), permitindo que o vírus expresse pelo menos oito proteínas estruturais primárias e quatro proteínas não estruturais (Tabela 1). Enquanto o núcleo interno é composto por cinco proteínas altamente conservadas ( $\lambda A$ ,  $\lambda B$ ,  $\lambda C$ ,  $\mu A$  e  $\sigma A$ ), o capsídeo externo é constituído por três proteínas mais variáveis ( $\mu B$ ,  $\sigma B$  e  $\sigma C$ ) (FARKAS et al., 2016).

Tabela 1. Caracterização dos 10 segmentos genômicos dos *Avian orthoreovirus*.

	Classe	Nucleotídeos	Proteína	Aminoácido	Distribuição	Função
1	L1	3854	$\Lambda 3$	1267	Camada interna do capsídeo	RNA polimerase dependente de RNA
2	L2	3916	$\Lambda 2$	1289	Camada externa do capsídeo	Guanilil-transferase, metiltransferase
3	L3	3901	$\Lambda 1$	1275	Camada interna do capsídeo	Proteína de ligação ao RNA, metaloproteína
4	M1	2304	$\mu 2$	736	Camada interna do capsídeo	Função desconhecida
5	M2	2203	$\mu 1$	708	Camada externa do capsídeo	Função na penetração e ativação da transcriptase
			$\mu NS +$	721	Não estrutural	Função desconhecida
6	M3	2241	$\mu NSC$	681	Não estrutural	Liga-se ao RNA, ativa a transcrição secundária
7	S1	1476	$\sigma C$	681	Camada externa do capsídeo	Liga-se ao receptor, determinante de sorotipo
			$\sigma 1S$	681	Não estruturais	Função desconhecida
8	S2	1331	$\sigma 2$	418	Camada interna do capsídeo	Liga-se ao RNA
9	S3	1198	$\sigma NS$	366	Não estrutural	Liga-se ao RNA
10	S4	1196	$\sigma 3$	365	Camada externa do capsídeo	Liga-se ao RNA, atua na tradução

Adaptado: Alfieri et al., 2017.

As tentativas em classificar os ARVs de acordo com suas propriedades sorológicas não tiveram êxito, pois os diversos isolados exibem alto grau de heterogeneidade antigênica e com reatividade cruzada considerável em testes de neutralização (BENAVENTE; MARTÍNEZ-COSTAS, 2007). Desta forma, foi proposta a comparação da similaridade das sequencias do gene  $\sigma$ C para a classificação de linhagens. Inicialmente, foram descritos cinco linhagens de ARV (KANT et al., 2002). Estudos posteriores propuseram seis linhagens filogenéticas distintas (I até VI) (LIU et al., 2003; LU et al., 2015) (Figura 2 e Anexo 1).

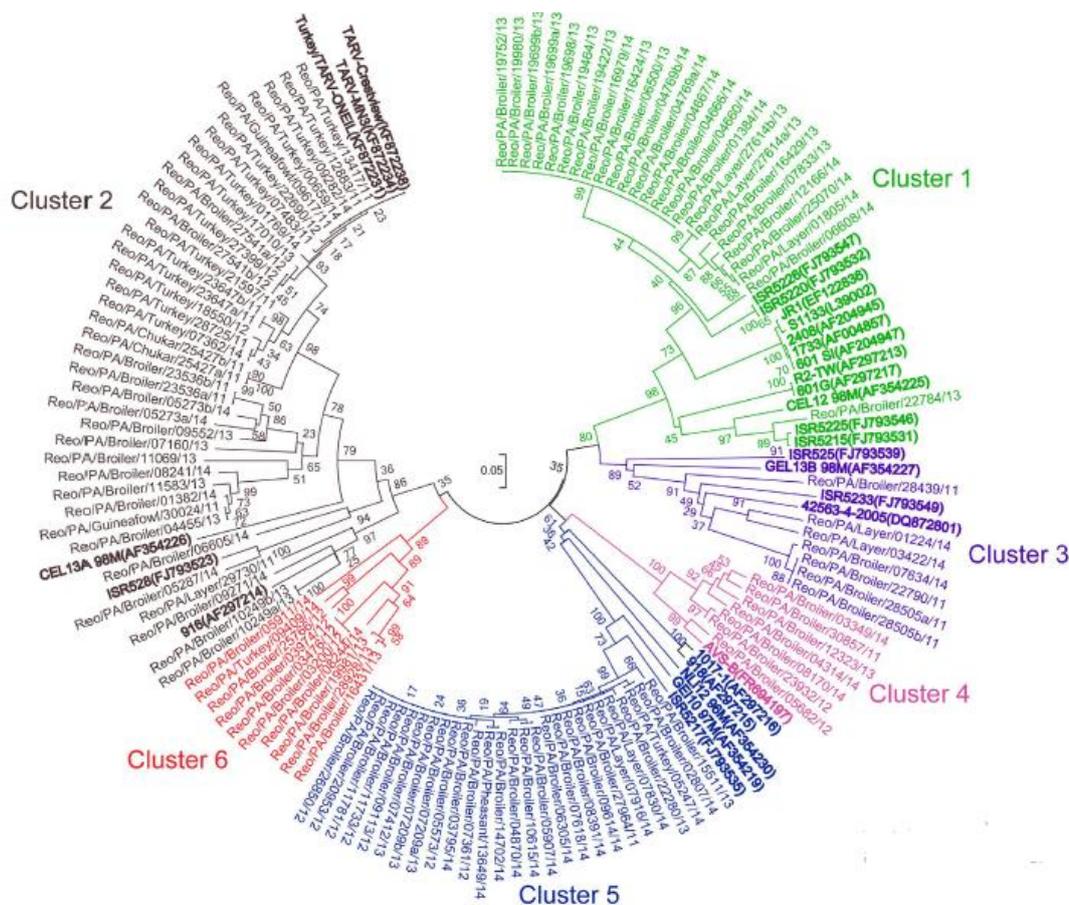


Figura 2. Filogenia de ARV a partir da análise da região do gene  $\sigma$ C. Fonte: Lu et al., 2015.

Linhagens (muitas vezes também chamados genótipos) identificados a partir de outros genes da classe S ( $\sigma$ A,  $\sigma$ B e  $\sigma$ NS) não apresentaram correspondência com a classificação de linhagens pela análise de  $\sigma$ C. Dados recentes de sequências de genomas completos demonstraram que rearranjos de segmentos e mutações pontuais resultam em cepas com elevada heterogeneidade genética (NIU et al., 2018; TANG; LU, 2016; TENG et al., 2014). Mesmo assim,  $\sigma$ C foi sempre o principal gene utilizado em estudos

filogenéticos e a respectiva sequência de aminoácidos da proteína  $\sigma$ C é avaliada para determinação da proteção vacinal devido à importância antigênica (DAY, 2009).

A proteína  $\sigma$ C é codificada na terceira fase aberta de leitura (ORF, *open reading frame*) do fragmento S1 (SCHNITZER, 1985), gerando uma cadeia polipeptídica relativamente pequena de 326 aminoácidos (BENAVENTE; MARTÍNEZ-COSTAS, 2007) (Figura 3). Essa é a proteína mais variável dos ARVs (LIU et al., 2003; LIU; GIAMBRONE, 1997) e induz a produção de anticorpos neutralizantes (WICKRAMASINGHE et al., 1993). Estes anticorpos devem ser gerados contra os epítomos das sequências virais que existem no campo, garantindo assim proteção contra ARV (TAKASE et al., 1987). Portanto, o gene  $\sigma$ C pode ter taxas evolutivas maiores devido à forte seleção imunológica, resultando na elevada heterogeneidade observada na prática e que pode até se refletir na patogenicidade (NI; KEMP, 1995; ROSENBERGER et al., 1989). Estudos mais antigos demonstram que essa situação levou à existência de pelo menos 11 sorotipos (TAKASE et al., 1987), dificultando a eficiência das cepas vacinais frente aos isolados circulantes nas aves (VASSERMAN et al., 2004).

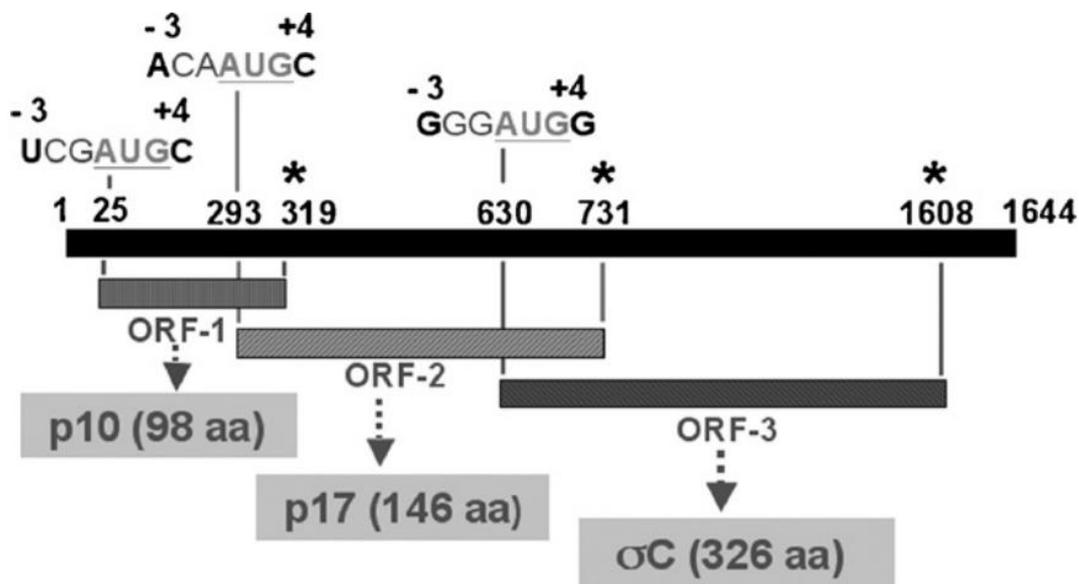


Figura 3. Representação diagramática do mRNA da cepa s1133 do segmento S1 do reovírus aviário. . O transcrito do S1 tem 1644 nucleotídeos e contém três cistrons fora de fase e parcialmente sobrepostos. O primeiro cistron (ORF-1, nucleotídeos 25-319) expressa p10, o segundo cistron (ORF-2, nucleotídeos 293-731) p17 e o terceiro cistron (ORF-3, nucleotídeos 630-1608), a proteína de ligação celular  $\sigma$ C. As sequências de nucleotídeos que rodeiam o codão de iniciação dos três cistrons (posições -3 a +4) são mostradas no topo, e o primeiro nucleotídeo de cada um dos três codões de terminação é indicado com um asterisco. Fonte: Benavente; Martínez-Costas, 2007.

## **2.2 Reovirose: Patogenia, aspectos clínicos e alterações patológicas**

A primeira detecção do ARV ocorreu em 1954 em casos de tenossinovite em um lote de frangos de corte com lesões nas articulações que não eram eliminadas com o uso de antibióticos (KERR; OLSON, 1964). Olson & Kerr (1966) determinaram que o agente causador era um vírus, que passou a ser denominado de “agente viral da artrite”, posteriormente identificado como reovírus por microscopia eletrônica (WALKER; FRIEDMAN; OLSON, 1972). No Brasil, o primeiro isolamento foi em frangos de corte com processos inflamatórios articulares (BOTTINO et al., 1975). Causada pelo mesmo agente, a síndrome da má absorção (MAS) foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil nos anos 70 (VAN DER HEIDE; LIITTICKEN; HORZINEK, 1981). A partir de então, diversos estudos de isolamento viral e caracterização genética foram desenvolvidos para melhor esclarecimento das reovirose em galinhas. As infecções ocorrem normalmente por linhagens de baixa patogenicidade e as manifestações clínicas não são evidentes. Já a ocorrência de uma cepa mais virulenta combinada com aves imunodeprimidas pode resultar nos dois quadros clínicos específicos: artrite viral e MAS (JONES, 2008).

O vírus pode ser transmitido verticalmente e horizontalmente. A principal rota parece ser a horizontal, ou seja, pelo contato direto com aves doentes que excretam o vírus pelas fezes por longos períodos e acabam contaminando o ambiente (MACDONALD et al., 1978; NHAM et al., 2017). Roessler & Rosenberger (1989) demonstraram que os frangos de um dia de idade são mais suscetíveis ao reovírus introduzido via respiratória. Embora raros, existem também relatos de transmissão vertical (DAVIS; KULKARNI; FLETCHER, 2012; JONES, 2008).

Em aves jovens (1 a 3 semanas), pode ocorrer a MAS, síndrome da refugagem, problemas entéricos e imunodepressão, além da tenossinovite (CRITTER et al., 2006; DAVIS; KULKARNI; FLETCHER, 2013). A MAS é caracterizada por ser multifatorial e apresentar retardo do crescimento. As características patológicas incluem proventriculite, enterite, atrofia de vilosidade, fusão de vilosidade e pancreatite. Além do ARV, outros agentes (enterovírus, adenovírus, parvovírus e diversas bactérias) foram associados a essa síndrome (SONGSEEM et al., 2002), onde as elevadas taxas de conversão alimentar e a diminuição do peso corporal são características clínicas constantes em frangos, resultando em importantes perdas econômicas (PAGE et al., 1980).

Estudos de inoculação *in vivo* descreveram que as primeiras alterações observadas após a inoculação do vírus pelo coxín plantar são na articulação tibiotársica com presença de infiltrado inflamatório mononuclear e heterofílico na bainha tendinosa do flexor digital, iniciando uma semana após a exposição (VASCONCELOS et al., 2001). Porém, a entrada e replicação primária do reovírus na infecção natural e experimental por via oral ocorrem no epitélio intestinal e na bursa de Fabrícus, normalmente 12 h após a infecção (CRITTER et al., 2006). Após a infecção de aves suscetíveis, o período de incubação depende da idade do animal acometido e a via de infecção. Aves inoculadas com duas semanas de idade por via intramuscular apresentam período de incubação de 11 dias até o início dos sinais clínicos. O reovírus atinge a circulação pelas placas de Peyer no trato intestinal, resultando então em viremia. As aves infectadas apresentam claudicação, dificuldade de locomoção, permanecendo, na maioria das vezes, em decúbito ventral (CRITTER et al., 2006).

Alterações histológicas foram descritas por Kerr & Olson (1964), onde lesões causadas em infecções naturais e experimentais são as mesmas. Durante a fase aguda (7-15 dias pós-inoculação no coxín plantar) ocorre edema, necrose de coagulação, acumulação de heterófilos e infiltrado perivascular. Também pode ser visualizada hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais, infiltração de linfócitos e macrófagos, e proliferação de células reticulares. Essas últimas lesões fazem com que as camadas parietais e viscerais das bainhas dos tendões se tornem grosseiramente espessadas desenvolvendo uma periostite caracterizada por aumento dos osteoclastos. Durante a fase crônica (a partir de 15 dias pós-infecção), ocorre hipertrofia na membrana sinovial e aumento dos vilos sinoviais. Após 30 dias, as alterações inflamatórias tornam-se mais crônicas. Ocorre um aumento na quantidade de tecido fibroso e uma infiltração ou proliferação pronunciada de células reticulares. Linfócitos, macrófagos e células plasmáticas também podem ser vistas (JONES, 2008; OLSON; KERR, 1966). Alguns estudos evidenciaram que os tipos de células inflamatórias predominantes nos tecidos afetados são linfócitos e células plasmáticas (LU et al., 2015; RECK et al., 2009).

A artrite viral nos lotes também tem resultado em condenação de carcaças nos frigoríficos por lesões diversas, principalmente nas articulações das peças para consumo humano. De acordo com a Portaria 210 do MAPA, qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado se tiver

evidência de caráter sistêmico do problema. A carcaça e as vísceras devem ser totalmente descartadas (BRASIL, 1998).

### 2.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da artrite viral é baseado nos sinais clínicos e lesões macroscópicas (Figura 4). Normalmente identifica-se edema unilateral ou bilateral na região proximal e distal à articulação tibiotarsometatarsica, líquido seroso amarelo claro entre os tendões, cartilagens articulares ulceradas, hemorragia nos tendões, fibrose e até ruptura em casos crônicos. Essas alterações conferem uma doença popularmente conhecida como “joelho verde” gerando um aspecto repugnante nas peças para consumo. No entanto, os sinais da artrite não são patognomônicos e muitas lesões articulares podem ser causadas por *M. synoviae*, *Staphylococcus* e outras bactérias (VAN DER HEIDE, 1977).

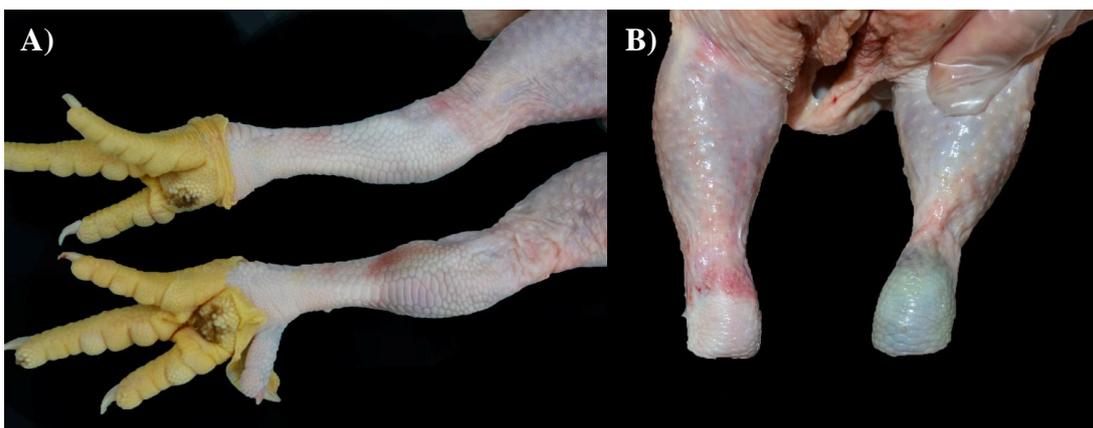


Figura 4. Lesões Macroscópicas de casos de artrite viral causada por ARV. A) articulação tibiotarsometatarsica: aumento moderado do volume unilateral (edema) associado a áreas multifocais de cor avermelhada (sangramento). B) Articulação tibiotarsometatarsica: aumento unilateral do volume associado à hemorragia no tecido subcutâneo, conferindo uma coloração esverdeada à articulação. Fonte: SOUZA et al., 2018

Uma maneira de identificar o agente é pelo isolamento viral, que pode ser realizado com frações de osso sesamóide, com os tendões que o atravessam, membrana sinovial e cartilagem articular. O principal meio para multiplicação viral é por inoculação em ovos embrionados através do saco vitelino de ovos livres de patógenos específicos (SPF), sendo que os reovírus tipicamente matam os embriões dentro de 5-6 dias (JONES, 2008). Também pode ser utilizado o cultivo primário de células originadas de embriões de galinhas, como fibroblasto, rim, fígado e pulmão. Entre as linhagens celulares utilizadas no cultivo de reovírus, destaca-se a LMH que possui um fenótipo epitelial e uma morfologia dendrítica. As células LMH são altamente sensíveis

ao ARV, adenovírus de aves, birnavírus, rotavírus, poxvírus e outros. Após o cultivo da linhagem é necessária a incubação para a multiplicação viral, que pode envolver várias passagens celulares e demorar de 5 a 7 dias (LU et al., 2015).

Os ARVs estão entre os vírus de fácil cultivo celular, por isso muitas vezes é tendencioso considerá-los como a causa de uma condição clínica, quando eles realmente podem desempenhar pouca ou nenhuma influência patológica (JONES, 2008). O efeito citopático causado nos cultivos celulares pode ser visualizado por presença de células gigantes ou "*bloom-like*". A confirmação da presença do vírus pode ser realizada pela coloração destas células características com o uso de anticorpos fluorescentes (FA) específicos contra o ARV (LU et al., 2015).

Esses reovírus também podem ser facilmente diferenciados de outros vírus por características físico-químicas típicas e classicamente pela presença de antígeno específico avaliado pelo teste de precipitação em gel (OLSON; WEISS, 1971). A preparação do antígeno é realizada com ovos embrionários de 9 a 11 dias de idade inoculados pela membrana chamada corioalantóica (CAM). O teste de precipitação pode ser usado para identificar isolados de reovírus se o anti-soro positivo conhecido estiver disponível, ou pode ser usado como indicação do estado imunológico em lotes afetados (JONES, 2008).

As metodologias acima foram substituídas, posteriormente, pelo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) como teste sorológico de escolha, devido à possibilidade de automação e agilidade no processamento de muitas amostras. Também é importante destacar que o valor do diagnóstico do perfil sorológico é muitas vezes difícil de interpretar, pois a infecção por reovírus é generalizada entre lotes comerciais. A maior utilidade é normalmente como um indicador de imunidade após a vacinação (JONES, 2008).

Métodos moleculares (como hibridização e RT-PCR) têm sido descritos para a detecção de ARVs em tecidos infectados (LIU; GIAMBRONE, 1997; YIN; LEE, 1998). Mais recentemente, o sequenciamento de genomas completos demonstrou que o segmento M1 (proteína  $\mu$ A) é o mais conservado (95% de similaridade) entre todos os ARVs, sendo a região alvo de escolha nos testes de RT-PCR de detecção (TANG; LU, 2016). A detecção molecular combinada de ARV e outros patógenos foi demonstrada com o uso de PCR multiplex (CATERINA et al., 2004; GUO et al., 2011). Uma nova

metodologia para diagnóstico foi proposta por Kumar et al. (2017), pelo método da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) da região S3 do genoma que codifica a proteína  $\sigma$ B (conservada entre os ARVs).

Adicionalmente, diferentes testes de biologia molecular têm sido propostos para a identificação da linhagem viral. Liu et al. (2004) demonstraram que a RT-PCR seguida de análise de fragmentos de restrição (RFLP) fornece uma abordagem simples e rápida para a caracterização de isolados de ARV. Atualmente, sabe-se que a região de maior variabilidade dentro do genoma de reovírus é no segmento S1 que também possibilita informar a diversidade genética pela amplificação por RT-PCR e posteriormente sequenciamento da região de interesse (FARKAS et al., 2016).

Os ARV, sendo vírus segmentados, podem se recombinar e introduzir mudanças drásticas na linhagem e no genótipo pela troca direta de partes do genoma (JOKLIK; RONER, 1995). Essas alterações podem gerar variantes antigenicamente distintas e resultar em falhas das vacinas (TANG et al., 2016; TROXLER et al., 2013). A elucidação completa dos genomas das linhagens virais de ARVs foi possível pelo sequenciamento de última geração (NGS) (MARSTON et al., 2013; TANG et al., 2016). Os estudos de NGS também permitiram determinar a coinfeção de mais de um tipo de reovírus em aves, demonstrando a possibilidade de rearranjo e recombinação entre esses vírus e formação de novas variantes. Além disso, possibilitou um entendimento completo dos dez segmentos virais e respectivos graus de variação (TANG; LU, 2016). Cada segmento possui determinado grau de conservação e a análise de diferentes regiões pode gerar resultados divergentes com consequências nos resultados filogenéticos (NIU et al., 2018; TENG et al., 2014). Sendo assim, a análise do genoma completo fornece maior clareza da dinâmica epidemiológica do vírus, assim como já realizado para outros patógenos (LU et al., 2018; TAN et al., 2018).

## **2.4 Controle e profilaxia**

A biosseguridade é uma ferramenta de grande importância para manter os lotes comerciais livres da infecção por ARV. Caso ocorra a contaminação dos plantéis, é necessária a remoção, limpeza e vazio sanitário das instalações para alocação de novas aves. Os desinfetantes comercialmente disponíveis devem ser validados para eficácia

antes do uso. A adoção de procedimentos de biossegurança é especialmente importante para minimizar as infecções em aves jovens (JONES, 2008).

As vacinas e programas de imunização visam fornecer proteção a partir do primeiro dia de idade. As vacinas comerciais vivas e inativadas passaram a ser disponibilizadas no final dos anos 70 e início dos anos 80, respectivamente, sendo utilizadas com sucesso em poedeiras e aves jovens para controlar casos clínicos de artrite viral por muitos anos. A imunização ativa pode ser conseguida por vacinação com reovírus atenuado que geralmente é aplicada pela via subcutânea. A primeira cepa utilizada que conferiu a neutralização do agente *in vitro* foi a S1133 (VAN DER HEIDE; KALBAC; BRUSTOLON, 1983). Atualmente, quatro cepas (S1133, 1733, 2408 e 2177) são comercializadas para vacinação de lotes de aves contra o ARV. Análises filogenéticas do gene  $\sigma$ C comprovaram que todas as cepas vacinais pertencem à linhagem I (AYALEW et al., 2017; LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

No caso de utilização de vacina viva, ela deve ser administrada antes do início da produção de ovos para prevenir a transmissão transovariana da cepa vacinal (GIAMBRONE; HATHCOCK; LOCKABY, 1991). As vantagens deste tipo de programa de imunização incluem a proteção imediata da progênie de um dia fornecida por anticorpos maternos (DOBSON; GLISSON, 1992).

Em um esforço para controlar a doença, as empresas avícolas optaram por usar vacinas inativadas personalizadas, denominadas vacinas autógenas, com isolados de seus lotes para compensar a falta de proteção das vacinas comerciais. No entanto, as variantes emergentes desafiam os esforços de controle de ARVs e o desenvolvimento de novas vacinas é necessário para controle mais efetivo (LU et al., 2015; SELLERS, 2016). Atualmente, a cepa TARV-Crestview é utilizada como uma vacina autógena inativada nos Estados Unidos para o controle de reovírus entéricos de perus (TERVs) e pertence à linhagem II, contudo, mais estudos são necessários para determinar sua eficiência sobre todas as variantes circulantes (MOR et al., 2015).

## **2.5 Epidemiologia molecular / Distribuição geográfica**

Infecções por reovírus são prevalentes no mundo todo acometendo principalmente galinhas, perus e outras espécies de aves. Um estudo recente de Lu et al.

(2015) demonstrou a ocorrência do vírus na Pensilvânia, em diversas espécies de aves (frangos de corte, poedeiras, perus, perdizes, galinha de angola, faisões e codornas), em 301 amostras coletadas entre os anos de 2011 a 2014. O vírus parece estar circulando em países como Índia, Hungria, China, Israel e França (FARKAS et al., 2016; GOLDENBERG et al., 2010; KUMAR et al., 2017; LI et al., 2016; LU et al., 2015; SELLERS, 2016; TROXLER et al., 2013).

Estudos realizados no Brasil demonstram a ocorrência desse agente em lotes de produção comercial. Lorenzini et al. (1996), em um levantamento sorológico para ARV com o uso do teste de ELISA, observaram a presença de anticorpo para reovírus em 90,5% das amostras analisadas em matrizes de corte no Estado do RS. Deve-se destacar que as aves não eram vacinadas, indicando o contato dessas com o vírus de forma natural. ARVs também foram demonstrados em lotes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sul do Estado de SC. Do total de 180 amostras de frangos de corte, 58,9% (106/180) foram positivas na PCR para o *Mycoplasma synoviae* (MS) e 33,9% (61/180) para ARV. Destas, 18,33% (33/180) amostras foram positivas tanto para MS quanto para ARV. Foram analisadas também 150 amostras de matrizes de corte, sendo que 82,6% (124/150) foram positivas para MS. As amostras positivas para o ARV totalizaram 20% (30/150), sendo que 83,3% (25/30) foram positivas também para MS (RECK, 2011).

Desde 2011, numerosos casos de tenossinovite em frangos de corte foram descritos em diferentes regiões do mundo. Especialmente na França, um estudo demonstrou que isso ocorria mesmo em matrizes vacinadas para ARV (TROXLER et al., 2013). Testes sorológicos mostraram títulos consistentemente altos de anticorpos nos lotes das matrizes vacinadas e também transmissão de anticorpos para a progênie, mas mesmo assim as aves apresentavam os sinais clínicos da doença. Na tentativa de caracterizar essa nova variante circulante, foi realizado o sequenciamento do gene  $\sigma C$  e posterior análise filogenética. Os isolados agruparam-se junto à linhagem vacinal I, porém em um ramo filogeneticamente distante (TROXLER et al., 2013).

Na indústria de frango de corte do Canadá, também foi constatado um aumento na incidência de artrite/tenossinovite após programas de vacinação contra ARV. Este achado poderia indicar que os programas de vacinação não estavam adequados ou que os ARV de campo não são suscetíveis as vacinas comerciais atuais. De 59 granjas produtoras de frango, 98,3% foram positivas para o teste de ELISA, com sinais clínicos

ocorrendo em 10 a 15% nos lotes amostrados. Ao final do estudo, nenhum dos isolados detectados agrupou-se no clado vacinal na análise filogenética, sugerindo que as cepas de ARV circulantes divergiram ainda mais em relação às cepas vacinais (AYALEW et al., 2017).

Outro estudo realizado com 38 ARVs isolados no Canadá (2012-2017) demonstrou o sequenciamento do gene  $\sigma C$  e a comparação com 37 sequências disponíveis no Genbank (todas do mesmo país), além das quatro cepas vacinais (S1133, 1733, 2177 e 2408). A análise filogenética permitiu constatar que todas as seis linhagens descritas estavam circulando no local amostrado, sem distinção por ano de isolamento ou local de coleta. Todos os isolados vacinais agruparam-se em um mesmo clado (linhagem I) separados das demais amostras, confirmando a divergência das cepas de campo circulantes em relação às vacinas disponíveis (PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

Diversos estudos foram realizados para caracterizar os ARVs e demonstrar a circulação das diversas linhagens, bem como a associação destas com diferentes quadros clínicos. No entanto, até o momento, não foi possível relacionar a infecção pelo vírus com nenhum dos critérios citados; por exemplo, área geográfica com linhagem específica ou severidade da doença (GOLDENBERG et al., 2010; KANT et al., 2002; LIU et al., 2003).

Análises filogenéticas demonstraram que a linhagem I além de englobar todas as vacinas comerciais disponíveis, ainda está circulando pela Tunísia, Israel, China, Alemanha, Estados Unidos, Canadá e França. Esta linhagem parece ser a mais antiga e ainda presente na produção comercial de aves, visto que engloba sequências isoladas de 1970 até 2017 (HELLAL KORT et al., 2013; PALOMINO-TAPIA et al., 2018; TROXLER et al., 2013). Já foi confirmado que a linhagem II esteve circulando em aves comerciais brasileiras no ano de 2013 e apresentou similaridade com cepas dos Estados Unidos, Alemanha e Canadá de anos próximos (2013-2016) (AYALEW et al., 2017; KANT et al., 2002; PALOMINO-TAPIA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

A linhagem III parece estar disseminada principalmente entre dois países: Estados Unidos e Canadá, apresentando alguns casos em Israel, nos anos de 2011 a 2016 (PALOMINO-TAPIA et al., 2018; TANG et al., 2016). Já a linhagem IV parece ser a segunda mais antiga e ainda presente no campo, com sequências de 1988 a 2017,

distribuídas pela Holanda, Alemanha, China, Estados Unidos e Canadá (KANT et al., 2002; LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

No Brasil, também já ocorreu à detecção da linhagem V em 2013 na mesma granja que apresentou a linhagem II (SOUZA et al., 2018). Esta variante foi detectada algumas vezes nos anos noventa até 2000 na Alemanha, Israel e Austrália (KANT et al., 2002), mostrando maior disseminação após 2010 nos Estados Unidos e Canadá (LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018; SELLERS, 2016). Apesar da linhagem VI ser descrita e caracterizada por alguns autores nos Estados Unidos e Canadá (AYALEW et al., 2017; KANT et al., 2002), ela não apresenta clara divisão com a linhagem IV e esse grau de similaridade pode gerar confusão na classificação dos vírus (PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

### **3. OBJETIVOS**

Realizar a detecção e caracterização genética e estudar a epidemiologia molecular de reovírus aviários identificados em granjas de produção comercial de aves no Brasil.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- 1) Detectar a ocorrência de reovírus aviários em granjas de produção comercial no Brasil.
- 2) Caracterizar geneticamente os reovírus detectados pelo sequenciamento da região  $\sigma C$ .
- 3) Realizar análises filogenéticas, filodinâmica e filogeográfica para determinar a introdução e circulação deste vírus.

#### 4. ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho consiste na revisão das filogenias moleculares e classificação de ARVs com base no gene  $\sigma$ C de sequências de todo o mundo, com enfoque especial nas linhagens atualmente circulantes no Brasil. Além disso, amostras foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene  $\sigma$ C e analisadas filogeneticamente em comparação a outras amostras do país e também com cepas de referência do GenBank. Análises temporais adicionais objetivaram determinar o tempo do ancestral recente mais comum e a história evolutiva das linhagens detectadas nas amostras de campo brasileiras. Os dados obtidos foram consolidados em um manuscrito em preparação que deverá ser submetido para publicação no periódico *Infection, Genetics and Evolution*.

Genotypic characterization and molecular evolution of avian reovirus in poultry flocks from Brazil

Silvia De Carli<sup>a,c#</sup>, Tiago Gräf<sup>b</sup>, Jonas M. Wolf<sup>a</sup>, Fernanda K. M. Lehmann<sup>a</sup>, Thiago K. Mazeto<sup>a</sup>, André S. K. Fonseca<sup>d</sup>, Vagner R. Lunge<sup>a,d</sup>, Cláudio W. Canal<sup>c</sup> and Nilo Ikuta<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Diagnóstico Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>b</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio De Janeiro, Brasil;

<sup>c</sup>Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>d</sup>Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

A avicultura industrial brasileira ocupa lugar de destaque entre os principais países produtores de frango de corte de todo mundo. As exportações alcançaram 4,1 milhões de toneladas, gerando uma receita de 6,571 bilhões de dólares em 2018. Apesar do valor aparentemente elevado, ocorreu uma queda de 5,1% em comparação com 2017, decorrente das restrições de mercados importadores após a detecção de *Salmonella* em carcaças de frango de corte destinadas à exportação (ABPA, 2018). A importância do setor para a economia do país é evidente, tornando os métodos de controle da qualidade de produtos de origem avícola rotineiros para as empresas produtoras.

Entre os principais problemas de ordem sanitária que causam prejuízo, tanto na produção como no momento do abate (devido às condenações *post-mortem*), destacam-se os que afetam o sistema locomotor como artrite e tenossinovites infecciosas. Aves com artrite causada por ARV normalmente apresentam uma condição clínica popularmente chamada de “joelho verde” caracterizada por edema e hemorragia na articulação afetada (SOUZA et al., 2018). Conforme legislação brasileira, qualquer processo infeccioso resulta no descarte parcial ou total da carcaça afetada. Essa perda, quando parcial, afeta principalmente a exportação, pois os pés dos frangos são comercializados para o mercado asiático (BRIZIO; SALLES; PRENTICE, 2013). Para a produção de frango inteiro conhecido como “griller”, a presença de ARV está entre as cinco principais causas de condenação parcial da carcaça por aspecto repugnante (SCHERER FILHO, 2009).

O número real de casos de artrite/tenossinovite é provavelmente subestimado, visto que o descarte durante o processo produtivo normalmente não é contabilizado (SANTANA et al., 2008; SOUZA et al., 2018). Já as aves que apresentam MAS cursam com elevadas taxas de conversão alimentar e diminuição do peso corporal durante a fase produtiva (PAGE et al., 1980). A grande maioria dos casos de artrite viral e MAS têm sido associada a diferentes genótipos de ARVs no Brasil e mesmo em outros países produtores de frangos de corte (LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

Inicialmente, o presente estudo visava realizar a identificação molecular das linhagens/genótipos de ARV presentes no Brasil. Na revisão de literatura, observou-se que os estudos prévios classificavam os ARVs de diferentes formas: linhagens, genótipos e até mesmo “agrupamento de genótipos” (LIU et al., 2003; LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018, AYALEW et al., 2017). Com relação às linhagens, os estudos descreviam a ocorrência de seis linhagens em todo mundo (I, II, III, IV, V e VI), sempre com base na análise filogenética do gene  $\sigma C$  (AYALEW et al., 2017; LIU et al., 2003; LU et al., 2015; PALOMINO-TAPIA et al., 2018). No entanto, não havia concordância entre muitos estudos, ocorrendo até divergências de classificação (AYALEW et al., 2017; PALOMINO-TAPIA et al., 2018). A construção de um grande *dataset* de sequências do gene  $\sigma C$ , e a realização de uma análise filogenética mais completa que as anteriores, evidenciaram a necessidade de revisão taxonômica e da forma de classificação. A formação de clados e subclados com divergência de nucleotídeos levou à proposição de classificar em linhagens e sublinhagens. Cinco linhagens (I, II, III, IV e V) puderam ser efetivamente classificadas com base no suporte filogenético e na topologia da árvore. Esse critério atualiza o originalmente proposto por LIU et al., (2003), que considerou sequências com mais de 12% de divergência como sendo de linhagens diferentes.

O presente estudo também demonstrou que, na avaliação pela topologia da árvore, não existe o grupo de sequências previamente classificadas como linhagem VI. Essas sequências de ARVs, identificadas em amostras de aves, circulando nos EUA e Canadá, distribuíram-se na base da árvore filogenética em pequenos ramos com suportes variando de 59% a 99%. Já foi relatado por PALOMINO-TAPIA et al. (2018) que as linhagens IV e VI apresentam certo grau de identidade, dificultando a classificação de ARVs pertencentes a estes grupos.

A filogenia também evidenciou a formação de pequenos ramos filogenéticos que compartilhavam o mesmo ancestral comum e apresentavam similaridade nucleotídicas superiores a 80%. Sendo assim, estes pequenos grupos foram classificados em sublinhagens. Foram demonstradas três sublinhagens da linhagem I (I Vacinal, Ia, Ib), três da linhagem II (IIa, IIb e IIc) e duas da linhagem IV (IVa e IVb). Esse é o primeiro estudo a propor a classificação em sublinhagens a partir da análise de um *dataset* com um grande número de sequências.

Com essa nova classificação, as amostras brasileiras foram identificadas como I (n= 11; todos Ib), II (n= 2; todos IIb), III (n= 1) e V (n= 3). Esses 17 isolados foram provenientes de aves com diferentes quadros clínicos (artrite, associada ou não com condenação de carcaças de frango em frigoríficos, e/ou síndrome de má absorção) de quatro diferentes estados brasileiros (RS, PR, SC e SP) durante os anos de 2016 a 2017. Esses resultados demonstram a efetiva circulação de diferentes linhagens conforme descrito previamente (SOUZA et al 2018). Mas não houve associação de doença clínica com nenhuma linhagem/sublinhagem e nem com região de coleta, como já descrito por outros pesquisadores (NHAM et al., 2017; SELLERS, 2013).

Destes isolados, onze agruparam-se a linhagem I, ou seja, a mesma das quatro cepas vacinais disponíveis no mercado. Ao analisar a filogenia com base no critério de classificação de sublinhagens, as sequências brasileiras agruparam-se ao Ib, enquanto as cepas vacinas pertencem a sublinhagem vacinal. Seis sequências isoladas na França entre 2011 e 2012 apresentaram alta similaridade com as cepas brasileiras na sublinhagem Ib. O estudo prévio demonstrou que as aves apresentaram sintomatologia clínica de artrite viral quando expostas ao vírus mesmo após a vacinação das matrizes e até mesmo da própria progênie, reforçando que as cepas vacinais disponíveis não conferiram imunidade nem para isolados pertencentes à mesma linhagem viral (TROXLER et al., 2013).

Todas as linhagens e sublinhagens foram avaliadas quanto ao seu sinal temporal, isto é, associação entre distâncias genéticas e datas de amostragem. Apenas a sublinhagem Ib apresentou forte associação entre esses parâmetros e pôde ser submetida à análise bayesiana para determinar o ano de surgimento e a data de entrada no Brasil. Os resultados demonstraram que esta sublinhagem começou a circular no mundo em 1968 e a introdução no Brasil ocorreu próximo ao ano de 2010.

Estes dados sugerem que os ARVs continuam ocorrendo nas aves comerciais de todo o mundo e que a falta de eficiência vacinal e medidas de biosegurança adequadas tem permitido o surgimento de novas variantes de ARV nos plantéis do país. Este é o primeiro estudo a reportar a história evolutiva dos ARVs, especialmente da sublinhagem Ib, no mundo. Outros estudos com vírus segmentados parecidos estruturalmente ao ARV utilizaram uma metodologia semelhante para reportar a

dinâmica viral ao longo do tempo (MININ; BLOOMQUIST; SUCHARD, 2008) e que também foi demonstrado para outros vírus (TAN et al., 2018).

As partículas virais de ARV possuem 10 segmentos genômicos que apresentam taxas evolutivas distintas, dentre eles o segmento S1, especialmente a região codificadora da proteína  $\sigma C$ , apresenta a maior taxa evolutiva, sendo eficiente para caracterização rápida dos vírus circulantes (BENAVENTE; MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; LIU et al., 2003; MOR et al., 2014, 2015). No entanto, esta não parece ser a região mais adequada para utilização em inferência bayesiana, possivelmente devido à rápida evolução viral que não acompanha a divergência esperada ao longo dos anos. Para completo entendimento e caracterização da história viral de todas as linhagens e sublinhagens, seria importante analisar outros segmentos de ARVs circulantes.

Outro aspecto importante é quanto à antigenicidade, a variabilidade nucleotídica do gene  $\sigma C$  (981 pb) é muito maior do que a dos outros segmentos presumivelmente como um reflexo das pressões evolutivas exercidas pela resposta imune do hospedeiro a essa proteína externa do capsídeo, possivelmente levando ao surgimento de mutantes para evitar o *clearance* pelo sistema imune do hospedeiro. A distribuição de variantes dentro da população viral acaba dificultando a eliminação do vírus em processos de imunização (LIU et al., 2003).

Adicionalmente, vacinas desenvolvidas contra determinados tipos virais são ineficientes contra cepas de campo de outras linhagens e até mesmo de mesma linhagem (TROXLER et al., 2013). A limitada diversidade de vacinas (todas para a linhagem I sublinhagem Vacinal) resulta em uma provável baixa proteção, não conferindo imunidade contra as cepas de campo de ARV que circulam nos lotes de aves em todo o mundo (AYALEW et al., 2017; TANG; LU, 2015). Portanto, as predições de antigenicidade baseadas em sequência de aminoácidos dos epitopos de cepas relevantes de ARVs circulantes no campo devem ser consideradas para a elaboração de novas vacinas que confirmam imunidade para as linhagens circulantes (GOLDENBERG et al., 2010).

Visando resolver essa questão, alguns países têm optado pela utilização de vacinas autógenas, através da produção de uma cepa de ARV inativada e imunogênica com base nos isolados virais da propriedade de interesse. Esta deve ser capaz de gerar resposta imune no hospedeiro evitando a contaminação ou desenvolvimento da

sintomatologia clínica da doença (PALOMINO-TAPIA et al., 2018). Para tanto, as linhagens virais circulantes devem ser conhecidas, pois a alta variação viral sugere que uma vacina autógena pode não conferir proteção contra vírus de mesma linhagem ou sublinhagem.

Todos estes aspectos reforçam a necessidade da elucidação do genoma viral dos ARVs circulantes. Neste estudo, os mesmos 17 isolados sequenciados pelo método de Sanger foram submetidos ao sequenciamento de genoma completo (sendo inclusive o principal objetivo do projeto original), procurando caracterizar todos os segmentos e realizar as devidas avaliações filogenéticas (nos diferentes genes) e de estruturas antigênicas. No entanto, a qualidade do sequenciamento foi baixa, não fornecendo informações confiáveis para uma avaliação genômica adequada. Novos estudos devem prever a realização do sequenciamento completo do genoma das variantes virais, tanto para aprimorar a classificação como para conhecer melhor a epidemiologia dos ARVs no mundo e no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Uma nova classificação taxonômica foi proposta considerando a existência de apenas cinco linhagens (I, II, III, IV e V) e não seis como previamente propostos. Sublinhagens foram nomeadas com base no grau de identidade da matriz de nucleotídeos.
- 2) O presente estudo evidenciou a ocorrência de quatro linhagens distintas (I, II, III e V), presentes nas regiões Sul e Sudeste do Brasil.
- 3) A sublinhagem Ib começou a ocorrer no Brasil a menos de 10 anos e a cepa vacinal parece não ter efeito protetivo contra infecções por ARVs dessa sublinhagem.

## REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em 05 de janeiro de 2018.
- ALFIERI, A. A. et al. **Reoviridae**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2017. cap. 32.
- ANDREATTI FILHO, R. L. **Prevenção de Doenças: Biossegurança em Avicultura**. In: \_\_\_\_\_, Saúde Aviária e Doenças . São Paulo: Roca, 2007.
- AYALEW, L. E. et al. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, p. 3565, 2017.
- BENAVENTE, J.; MARTÍNEZ-COSTAS, J. Avian reovirus: Structure and biology. **Virus Research**, Amsterdam, v. 123, n. 2, p. 105–119, 2007.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. **Salmoneloses**. In: BERCHIERI, J. A.; MACARI, M. Doenças das aves . Campinas: FACTA, 2010.
- BOTTINO, J. A. et al. Agente viral isolado de casos de artrite em frangos de corte e em galinhas de postura. **O Biológico**, Viçosa, v. 41, n. 6, p. 168–169, 1975.
- BRASIL, 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 210 de 10 de Novembro de 1998**. Brasília, DF, 1998.
- BRIZIO, A. P. D. R.; SALLES, B. P. De; PRENTICE, C. Avaliação microbiológica de pés de frango destinados ao consumo humano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2847–2852, 2013.
- CATERINA, K. M. et al. Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 18, n. 5, p. 293–298, 2004.

COLDEBELLA, A. et al. **Avaliação dos dados de abate e condenações de aves registrados no Sistema de Informações Gerenciais do Serviço de Inspeção Federal nos anos de 2012 a 2015**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2018.

CRITTER, R. B. O. et al. **Adenoviroses, Reoviroses e Rotaviroses**. In: ANDREATTI FILHO, R. L. Saúde Aviária e Doenças, São Paulo: Roca.

DAVIS, J. F.; KULKARNI, A.; FLETCHER, O. Myocarditis in 9- and 11-day-old broiler breeder chicks associated with a reovirus infection. **Avian diseases**, Ithaca, v. 56, n. 4, p. 786–90, 2012.

DAVIS, J. F.; KULKARNI, A.; FLETCHER, O. Case Report — Reovirus Infections in Young Broiler Chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 57, n. 2, p. 321–325, 2013.

DAY, J. M. The diversity of the orthoreoviruses: Molecular taxonomy and phylogentic divides. **Infection, Genetics and Evolution**, Toronto, v. 9, n. 4, p. 390–400, 2009.

DOBSON, K. N.; GLISSON, J. R. Case Report Economic Impact of a Documented Case of Reovirus Infection in Broiler Breeders. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 36, n. 3, p. 788–791, 1992.

FAHEY, J. E.; CRAWLEY, J. F. Studies On Chronic Respiratory Disease Of Chickens II. Isolation of A Virus. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, Ottawa, v. 18, n. 1, p. 13–21, 1954.

FARKAS, S. L. et al. Lineage diversification, homo- and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 36960, 2016.

FERGUSON-NOEL, S. H. K. **Mycoplasma synoviae infection**. In: Disease of Poultry. In: SAIF, Y.M et al. Beijing: Blackwell Publishing, 2008.

GIAMBRONE, J. J.; HATHCOCK, T. L.; LOCKABY, S. B. Effect of a Live Reovirus Vaccine on Reproductive Performance of Broiler Breeder Hens and Development of Viral Tenosynovitis in Progeny. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 35, n. 2, p. 380–383, 1991.

GIOTTO, D. B. **Análise temporal e espacial de condenações de frangos em um matadouro-frigorífico**. 2008. Dissertação (Mestrado em Geomática) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

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.

GONÇALVES, V. S. P.; DE MORAES, G. M. The application of epidemiology in national veterinary services: Challenges and threats in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 137, p. 140–146, 2017.

GUO, K. et al. Development of TaqMan real-time RT-PCR for detection of avian reoviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 75–79, 2011.

HECKERT, R. A. et al. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, England, v. 81, n. 4, p. 451–457, 2002.

HELLAL KORT, Y. et al. Molecular characterization of avian reovirus isolates in Tunisia. **Virology Journal**, London, v. 10, n. 1, p. 12, 2013.

JOKLIK, W. K.; RÖNER, M. R. What Reassorts When Reovirus Genome Segments Reassort? **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 9, p. 4181–4184, 1995.

JONES, R. C. 2008. **Reovirus infections**. In: SAIF, Y.M. (Ed.), Diseases of Poultry. Ames Iowa: Wiley-Blackwell, p. 309-328.

JONES, R. C.; AFALEQ, A. Al. Pathogenicity of Three Turkey and Three Chicken Reoviruses For Poults and Chicks With Particular Reference to Arthritis/Tenosynovitis. **Avian Pathology**, London, v. 18, n. 3, p. 433–440, 1989.

KANT, A. et al. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the  $\sigma$  C protein. **Veterinary Research**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 239–250, 2002.

KERR, K. M.; OLSON, N. O. Control of Infectious Synovitis. 14. The Effect of Age of Chickens on the Susceptibility to Three Agents. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 8, n. 2, p. 256–263, 1964.

KUMAR, D. et al. A double-stranded probe coupled with isothermal amplification for qualitative and quantitative detection of avian reovirus. **Archives of Virology**, Wien, v. 162, n. 4, p. 979–985, 2017.

LI, N. et al. The pathogenicity of novel duck reovirus in Cherry Valley ducks. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 192, p. 181–185, 2016.

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**, London, v. 314, n. 1, p. 336–349, 2003.

LIU, H. J. et al. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Avian pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 33, n. 2, p. 171–80, 2004.

LIU, H. J.; GIAMBRONE, J. J. In situ detection of reovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using a digoxigenin-labeled cDNA probe. **Avian Disease**, Ithaca, v. 41, n. 2, p. 447–451, 1997.

LORENZINI, G. et al. Sorologia para Reovírus em matrizes de corte de três integrações avícolas, utilizando um Kit ELISA comercial. *Aquivos Faculdade Veterinária*, v.2, n.2, 1996. **Arquivos Faculdade Veterinária**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, 1996.

LU, H. et al. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011-2014. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. October, p. 1–11, 2015.

LU, Q. et al. Phylogenomic and Comparative Analyses of Complete Plastomes of *Croomia* and *Stemona* (Stemonaceae). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 19, n. 8, p. 2383, 2018.

MACDONALD, J. W. et al. Observations on viral tenosynovitis (viral arthritis) in Scotland. **Avian Pathology**, London, v. 7, n. 4, p. 471–482, 1978.

MARSTON, D. A. et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

MININ, V. N.; BLOOMQUIST, E. W.; SUCHARD, M. A. Smooth skyride through a rough skyline: Bayesian coalescent-based inference of population dynamics. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 7, p. 1459–1471, 2008.

MOR, S. K. et al. Characterization of S class gene segments of a newly isolated turkey arthritis reovirus. **Virology**, London, v. 464–465, n. 1, p. 33–44, 2014.

MOR, S. K. et al. Phylogenetic analysis, genomic diversity and classification of M class gene segments of turkey reoviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 176, n. 1–2, p. 70–82, 2015.

NHAM, E. G. et al. Flock-level prevalence, geographical distribution, and seasonal variation of avian reovirus among broiler flocks in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 58, n. 8, p. 828–834, 2017.

NI, Y.; KEMP, M. C. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. **Avian Disease**, Ithaca, v. 39, n. 3, p. 554–566, 1995.

NIU, X. et al. Complete genome sequence of a novel avian orthoreovirus isolated from gosling, China. **Archives of Virology**, Wien, v. 163, n. 12, p. 3463–3466, 2018.

OLSON, N. O.; KERR, K. M. Some Characteristics of an Avian Arthritis Viral Agent. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 10, n. 4, p. 470–476, 1966.

OLSON, N. O.; WEISS, R. Similarity between arthritis virus and fahey-crawley virus. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 16, n. 3, p. 535–540, 1971.

PAGE, A. R. K. et al. Case Report-- Malabsorption Syndrome in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 26, n. 3, p. 618–624, 1980.

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**, London, v. 522, n. March, p. 138–146, 2018.

RECK, C. **Detecção de Mycoplasma synoviae e Orthoreovirus aviario 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. Análise histopatológica de infecção experimental mista por *Mycoplasma synoviae* e Orthoreovirus aviário em frangos de corte. **O Biológico**, Concórdia, v. 71, n. 2, p. 96, 2009.

ROESSLER, D. E.; ROSENBERGER, J. K. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. **Avian Disease**, Ithaca, v. 33, n. 3, 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**, Ithaca, v. 33, n. 3, p. 535, 1989.

SANTANA, Â. P. et al. Causas de condenação de carcaças de aves em abatedouros localizados no Estado de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 9, p. 2587–2592, 2008.

SCHERER FILHO, M. W. **Análise dos fatores que influenciam na condenação de carcaças inteiras de frango de corte**. 2009. Monografia (Monografia em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SCHLESTEIN, A. **Avaliação das causas de condenações de perus ( Meleagris Gallopavo ) em 2005 e 2006 no estado do Rio Grande do Sul**. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SCHNITZER, T. J. Protein coding assignment of the S genes of the avian reovirus S1133. **Virology**, London, v. 141, n. 1, p. 167–170, 1985.

SELLERS, H. Update on Variant Avian Reoviruses Isolated from Clinical Cases of Viral Arthritis/Tenosynovitis in Broilers. **The Poultry Informed Professional**, Georgia, n. 127, p. 1–3, 2013.

SELLERS, H. S. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, p. 10–14, 2016.

SESTERHENN, R. et al. **Impacto econômico de condições post mortem de aves sob inspeção estadual no estado do Rio Grande do Sul**. Alimento e Bioenergia para o Brasil e o Mundo, Porto Alegre, v. 210, p. 1–3, 2010.

SONGSEEM, T. et al. Experimental reproduction of malabsorption syndrome with different combinations of reovirus, Escherichia coli, and treated homogenates obtained from broilers. **Avian diseases**, Ithaca, v. 46, n. 1, p. 87–94, 2002.

SOUZA, S. O. et al. Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. **Poultry Science**, England, v. 97, n. 10, p. 3550–3555, 2018.

TAKASE, K. et al. Serologic and Pathogenetic Studies on Avian Reoviruses Isolated in Japan. **Avian diseases**, Ithaca, v. 31, n. 3, p. 464–469, 1987.

TAN, Y. et al. Differing epidemiological dynamics of Chikungunya virus in the Americas during the 2014-2015 epidemic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 7, p. 1–23, 2018.

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**, London, v. 6, n. March, p. 24519, 2016.

TANG, Y.; LU, H. Genomic characterization of a broiler reovirus field strain detected in Pennsylvania. **Infection, Genetics and Evolution**, Toronto, v. 31, p. 177–182, 2015.

TANG, Y.; LU, H. Infection, Genetics and Evolution Whole genome alignment based one-step real-time RT-PCR for universal detection of avian orthoreoviruses of chicken, pheasant and turkey origins. **Infection, Genetics and Evolution**, Toronto, v. 39, p. 120–126, 2016.

TENG, L. et al. Sequencing and phylogenetic analysis of an avian reovirus genome. **Virus Genes**, Boston, v. 48, n. 2, p. 381–386, 2014.

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

VAN DER HEIDE, L. Viral arthritis/tenosynovitis: A review. **Avian Pathology**, London, v. 6, n. 4, p. 271–284, 1977.

VAN DER HEIDE, L. .; KALBAC, M.; BRUSTOLON, M. Development of an Attenuated Apathogenic Reovirus Vaccine against Viral Arthritis / Tenosynovitis. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 27, n. 3, p. 698–706, 1983.

VAN DER HEIDE, L.; LIITTICKEN, D.; HORZINEK, M. Isolation of Avian Reovirus as a Possible Etiologic Agent of Osteoporosis (" Brittle Bone Disease "; " Femoral Head Necrosis ") in Broiler Chickens. **Avian Diseases**, Ithaca, v. 25, n. 4, p. 847–856, 1981.

VASCONCELOS, S. B. de 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**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 80–83, 2001.

VASSERMAN, Y. et al. The influence of reovirus sigma C protein diversity on vaccination efficiency. **Avian Disease**, Ithaca, v. 48, n. 2, p. 271–278, 2004.

WALKER, E. R.; FRIEDMAN, M. H.; OLSON, N. O. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. **Journal of Ultrastructure Research**, New York, v. 41, n. 1–2, p. 67–79, 1972.

WICKRAMASINGHE, R. et al. Avian Reovirus Proteins Associated with Neutralization of Virus Infectivity. **Virology**, London, v. 194, n. 1, p. 688–969, 1993.

YIN, H. S.; LEE, L. H. Development and characterization of a nucleic acid probe for avian reoviruses. **Avian Pathology**, London, v. 27, n. 4, p. 423–426, 1998.

Anexo 1 - Filogenia de ARV a partir da análise da região do gene  $\sigma$ C. Fonte: Lu et al., 2015.

