

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO POR REOVIRUS AVIÁRIO EM FRANGOS DE
CORTE NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E
SOROLÓGICA**

Gustavo Schaefer

Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO POR REOVIRUS AVIÁRIO EM FRANGOS DE
CORTE NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ISOLADOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E
SOROLÓGICA**

Gustavo Schaefer

Orientador: Prof. Dr. Hélio José Montassier

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

S294i

Schaefer, Gustavo

Infecção por Reovirus Aviário em frangos de corte no Brasil: caracterização molecular de isolados e avaliação clínica, patológica e sorológica / Gustavo Schaefer. -- Jaboticabal, 2022

28 p. : fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Hélio José Montassier

1. Frango de Corte. 2. Artrite. 3. Patologia Veterinária. 4. Infecção.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INFECÇÃO POR REOVIRUS AVIÁRIO EM FRANGOS DE CORTE NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E SOROLÓGICA

AUTOR: GUSTAVO SCHAEFER

ORIENTADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / FCAV / UNESP - Jaboticabal



p/ Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Pesquisador Dr. RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO (Participação Virtual)
SAFE SAÚDE ANIMAL Ltda / Jaboticabal/SP



p/ Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Profa. Dra. ADOLORATA APARECIDA BIANCO CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias -
Câmpus de Jaboticabal/UNESP

Jaboticabal, 06 de janeiro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gustavo Schaefer – Nascido em Itapiranga, Santa Catarina, em 05 de janeiro de 1987, filho de Lauro Schaefer e Teresinha Schaefer. Entre os anos de 2002 e 2004, concomitante ao Ensino Médio, realizou o curso Técnico em Agropecuária no Centro de Educação Profissional Getúlio Vargas, em São Miguel do Oeste – SC. Em 2008, ingressou em Medicina Veterinária na FAI – Faculdades de Itapiranga, de Itapiranga-SC, obtendo o título de Médico Veterinário em 2012. À partir de então, dedicou-se a diferentes funções técnicas e de gestão na agroindústria avícola. Atualmente, atua como Gerente Técnico Nacional na empresa Vaxxinova. Em 2019, ingressou no mestrado na FCAV/UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. Hélio José Montassier.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

(Paulo Baleki)

“O importante é não parar de questionar.”

(Albert Einstein)

Dedico

A Deus, a minha família e a minha esposa Débora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer a Deus por tudo. Pela força, luz, paciência, saúde, coragem e pelo dom que me deste, o dom da vida, e pela oportunidade de estar concluindo mais esta etapa. Muito obrigado por sempre iluminar e guiar os meus passos.

A minha esposa Débora, por me passar coragem e estar sempre ao meu lado para enfrentar qualquer situação na vida. Te amo muito.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela oportunidade e voto de confiança.

Aos colegas Filipe e Priscila, que me deram apoio desde o início deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Etiologia.....	2
2.2 Epidemiologia.....	2
2.3 Patogenia.....	3
2.4 Sinais Clínicos.....	3
2.5 Diagnóstico.....	4
2.6 Controle e Prevenção.....	4
3. OBJETIVOS	5
3.1 Geral.....	5
3.2 Específicos.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS	6
4.1. Coleta de amostras.....	6
4.2. Isolamento e titulação de vírus	6
4.3. Sorologia.....	7
4.4. Histopatologia.....	7
4.5. RT-qPCR para identificação de vírus.....	7
4.6. Sequenciamento e análise filogenética.....	8
4.7. Estrutura secundária e análises de sítios antigênicos	8

5. RESULTADOS	9
5.1. Avaliação clínica e patológica.....	9
5.2. Detecção e monitoramento de títulos de anticorpos anti-ARV em frangos de granjas afetadas pela infecção por ARV.....	10
5.3. Alterações patológicas microscópicas.....	11
5.4. Isolamento viral e detecção molecular.....	12
5.5. Sequenciamento e análises filogenéticas do gene σ C.....	13
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	24
8. REFERÊNCIAS	25

INFECÇÃO POR REOVÍRUS AVIÁRIO EM FRANGOS DE CORTE NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS E AVALIAÇÃO CLÍNICA, PATOLÓGICA E SOROLÓGICA

RESUMO - Neste estudo, os sinais clínicos, exame patológico post-mortem, sorologia, isolamento viral e caracterização molecular de isolados de vírus foram direcionados para confirmar a ocorrência de infecção por Reovírus Aviário (ARV) em amostras de frangos de corte com artrite e tenossinovite criados em quatorze granjas distribuídas em unidades de avicultura em três estados brasileiros (Bahia - BA, Minas Gerais - MG e São Paulo - SP). Foram encontradas lesões macroscópicas e microscópicas características, como inchaço das articulações metatarsais e tenossinovite aguda a crônica, apresentando marcadas reações inflamatórias e hemorrágicas. A soroconversão entre pintos de um dia e frangos de abate foi detectada em frangos em unidades avícolas dos estados de MG e SP, enquanto altos títulos médios de anticorpos anti-ARV em ambas as idades foram detectados em granjas de BA. Quatorze isolados de ARV foram detectados por RT-qPCR e a análise de sequenciamento parcial de seu gene σC mostrou alta identidade com alguns isolados brasileiros recentes de ARV, mas esses vírus tinham alta variabilidade em relação às cepas de vacinas ARV e a filogenia os classificou em três grupos genéticos distintos: I (Subgrupo Ib), III e V. A variabilidade nos resíduos de aminoácidos deduzidos da proteína σC identificada nesses isolados de ARV resultou em mudanças relevantes na estrutura da proteína secundária e ocorreu predominantemente nos sítios antigênicos previstos desta proteína, incluindo aqueles que são críticos para neutralização de vírus. No geral, os resultados indicam que esses isolados de ARV com diferenças relevantes no gene σC e na proteína do capsídeo estão envolvidos na etiologia da artrite e tenossinovite que afeta frangos dessas granjas no Brasil e, devido à sua variabilidade genética e antigênica, eles podem não ser eficazes controlada por vacinas comerciais contra ARV contendo cepas de referência do agrupamento genético I.

Palavras-chave: Reovírus aviário, artrite, tenossinovite, frango, Sigma C, Brasil, genotipagem.

AVIAN REOVIRUS INFECTION IN BROILERS IN BRAZIL: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATES AND CLINICAL, PATHOLOGICAL AND SEROLOGICAL EVALUATION

ABSTRACT: In this study, clinical signs, post-mortem pathology examination, serology, viral isolation and molecular characterization of virus isolates were addressed to confirm the occurrence of Avian Reovirus (ARV) infection in samples from broilers with arthritis and tenosynovitis reared in fourteen poultry farms distributed in poultry farming units in three Brazilian states (Bahia - BA, Minas Gerais - MG and São Paulo - SP). Characteristic macroscopic and microscopic lesions were found, such as swelling of metatarsal joints and acute to chronic tenosynovitis showing marked inflammatory and hemorrhagic reactions. Sero-conversion between day-old chicks and broilers at slaughter was detected for broilers in poultry farming units from MG and SP states, while high anti-ARV mean antibody titers at both ages were detected in poultry farms from BA. Fourteen ARV isolates were detected by RT-qPCR and the partial sequencing analysis of their σ C gene showed high identity with some recent Brazilian ARV isolates, but these viruses had high variability regarding ARV vaccine strains and the phylogeny classified them into three distinct genetic clusters: I (Sub-cluster Ib), III and V. The variability in deduced amino acid residues of σ C protein identified in these ARV isolates resulted in relevant changes in secondary protein structure and occurred predominantly in predicted antigenic sites of this protein including those that are critical for virus-neutralization. Overall, the results indicate that these ARV isolates carrying relevant differences in σ C gene and capsid protein are involved in the etiology of arthritis and tenosynovitis affecting broilers from these poultry farms in Brazil and due to their genetic and antigenic variability, they may not be effectively controlled by commercial vaccines against ARV containing references strains of genetic cluster I.

Keywords: Avian reovirus, arthritis, tenosynovitis, chicken, Sigma C, Brazil, genotyping.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV	Avian Reovirus
RT-qPCR	Real Time – Quantitative Polymerase Chain Reaction
IgG	Imunoglobulina G
σ C	Sigma C
BHI	Brain Heart Infusion
SPF	Specific-Pathogen-Free
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
USA	United States of America

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Dados sobre a identificação de Reovírus Aviários (ARVs) isolados de casos de campo de artrite e tenossinovite do presente estudo.....11
- Tabela 2. Lista de ARVs e sequências do gene Sigma C recuperada do GenBank para este estudo.....12

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (a) Aumento do volume bilateral na articulação tíbio-metatarso. (b) Corte transversal da articulação mostrando exsudato e tendões inchados. As amostras anatômicas foram coletadas de frangos de corte afetados em uma granja localizada no estado de São Paulo.....8
- Figura 2. (a) Perna condenada no abatedouro mostrando lesões hemorrágicas. (b) Ruptura do tendão gastrocnêmio. As amostras anatômicas foram coletadas de frangos de corte afetados em uma granja localizada no estado de São Paulo.....9
- Figura 3. Média geométrica dos títulos de anticorpos IgG anti-ARV em pintos de um dia de vida e frangos de corte em unidades de produção localizadas na Bahia, Minas Gerais e São Paulo.....10
- Figura 4. Cápsula articular: (a) HE 4x, agregados de infiltrados de linfoplasmócitos multifocais são observados na cápsula articular. Também foram observados, heterófilos raros e (b) Mesma imagem, HE 10x.....11
- Figura 5. Árvore filogenética baseada em sequências de nucleotídeos parciais do gene σC de cepas de ARV sequenciadas neste estudo e de sequências de cepas de referência recuperadas do GenBank. As análises foram realizadas no software MEGA 6.0 com o método de neighbour-joining, baseado no modelo Jukes-Cantor com 1.000 réplicas de bootstrap.
 ▲ Isolados brasileiros de ARVs do presente estudo. ● Isolados brasileiros de ARVs dos estudos de Souza et al. (2018) e Carly et al. (2020).
 ■ Isolados brasileiros de ARVs do estudo de De La Torre et al. (2021).
 △ Isolados brasileiros de ARVs do estudo de Bampi (2016).....16
- Figura 6. Porcentagens de identidade para nucleotídeos parciais e sequências deduzidas de aminoácidos do gene / proteína σC de isolados brasileiros de ARVs e cepas vacinais. Os isolados de ARV e as cepas de vacina são separados em grupos I, II, III, V e VII conforme a análise filogenética definida do gene σC17
- Figura 7. Análise comparativa da estrutura secundária das sequências parciais da proteína σC de reovírus aviários (ARVs) incluindo a cepa vacinal de referência (1733) e três isolados brasileiros dos Clusters I (ARV650), III (ARV652) e V (ARV658). Modelos de previsão de estrutura secundária foram gerados por PolyView 2D-SABLE. Os números e a escala decimal acima identificam as posições dos aminoácidos na proteína σC da cepa de vacina ARV 1733 ou do isolado brasileiro de ARV.....18

Figura 8. Alinhamento de sequência múltipla de sequências de aminoácidos deduzidas da proteína σ C completa ou parcial da cepa de referência da vacina (1733) e isolados brasileiros de ARV separados nos clusters I, II, III, V e VII, foram determinados usando Clustal W. Idêntico os resíduos de aminoácidos em relação à cepa de referência são representados por pontos, e as variáveis relacionadas a essa cepa de referência são identificadas pelo código de aminoácidos da primeira letra. Os sítios antigênicos que compreendem os epítomos lineares de células B / anticorpo para a cepa ARV da vacina 1733 foram previstos pelo software Kolaskar e Togaonkar Antigenicity incluído no Immuno Epitope Database (<http://tools.iedb.org/bcell/>) e foram destacados em azul caixas, incluindo os resíduos de aminoácidos 9 a 35, 43 a 64, 72 a 78, 83 a 101, 109 a 120, 146 a 155, 157 a 198, 219 a 224, 236 a 281, 286 a 304 e 315 a 321 , e esses locais foram expandidos para as sequências de aminoácidos de outros isolados brasileiros de ARV. Os travessões identificam os códons não sequenciados e as posições de aminoácidos não deduzidas para cepas de vacinas ARV e isolados brasileiros.....19

1. INTRODUÇÃO

Os reovírus aviários (ARVs) são patógenos de grande preocupação para a avicultura, pois podem causar consideráveis perdas econômicas devido a efeitos adversos diretos, como tenossinovite e artrite, e também através de lesões secundárias em aves infectadas, especialmente em frangos de corte. Os ARVs são distribuídos em todo o mundo, afetando várias espécies de aves, incluindo galinhas, faisões, perus, patos, gansos, pombos, codornizes comuns, aves de rapina e papagaios (Lu et al., 2015). Inicialmente, uma cepa de ARV foi identificada por Olson em 1959 como o agente etiológico da tenossinovite e artrite em galinhas jovens. Posteriormente, foram registrados os potenciais efeitos patológicos dos ARVs na síndrome de má absorção, síndrome do nanismo e problemas entéricos e de imunossupressão (Davis et al., 2013).

O Brasil tem sido um dos mais importantes produtores de aves do mundo nos últimos dez anos e, recentemente, um número relevante de cepas de ARV de galinhas domésticas brasileiras com artrite e tenossinovite foi isolado e genotipado, mostrando grande diversidade de cepas de ARV que foram classificadas em clusters I (um subcluster diferente daquele que agrupa as cepas da vacina ARV), II, III, V e VII. Esses achados indicaram que tais ARVs de tipo selvagem que são geneticamente distintos das cepas previamente caracterizadas, incluindo as cepas da vacina ARV, estão associados à tenossinovite e estão presentes em aves de criação brasileiras. No entanto, ainda faltam dados sobre a evolução clínico-patológica e a sorologia em frangos de corte afetados por diferentes cepas de ARV circulantes nas granjas avícolas brasileiras, e uma melhor definição de quais cepas estão efetivamente associadas à artrite viral e tenossinovite em frangos de corte se faz necessária. O objetivo deste estudo foi avaliar longitudinalmente as características clínico-patológicas e a soroconversão em frangos de corte afetados por artrite e tenossinovite de unidades avícolas brasileiras localizadas em três regiões e isolar, identificar e caracterizar molecularmente as cepas de ARV presentes em articulações lesadas dessas aves, visto que ainda são escassos os dados sobre esses parâmetros de infecção por esse patógeno no Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

Os ARVs são vírus de RNA do gênero Orthoreovirus na família Reoviridae. Com um diâmetro de 70–80 nm, os ARVs têm um genoma de RNA de fita dupla que consiste em três segmentos grandes (L1 – L3), três médios (M1 – M3) e quatro pequenos (S1 – S4). Esses segmentos são subdivididos em 11 proteínas codificadoras, nove das quais são estruturais ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2 / \mu 2C$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ e $\sigma 3$) e duas são não estruturais (μNS e σNS) (Jones, 2000). Zhong et al. (2016) descreveram que a proteína σC codificada pelo gene S1 é capaz de interagir com receptores de células-alvo, portanto, essa proteína é crucial para a adsorção viral, penetração, replicação e patogenicidade de ARV, bem como para a interação com vírus neutralizantes anticorpos (Wickramasinghe et al., 1993).

Assim como outros RNA vírus, a mutação em ponto é de ocorrência comum no ARV, promovendo o aparecimento de novas cepas, decorrente da recombinação ou mutação de segmentos do genoma (Jones, 2000). A proteína σC é uma das porções do vírus que mais apresenta variações, justamente devido à alta pressão imunológica que sofre, visto ser responsável por estimular a produção de anticorpos específicos (Liu et al, 2003, Attoui, 2011).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Embora os reovírus tenham sido encontrados em muitas espécies de aves, galinhas e perus são os únicos animais naturais reconhecidos ou hospedeiros experimentais para artrite induzida por reovírus (Jones, 2000).

A transmissão de ARVs pode ocorrer horizontal e verticalmente, e as infecções em galinhas são mais comuns durante os primeiros estágios da vida. Em indivíduos que são afetados em idades mais avançadas, a probabilidade de sinais clínicos graves é geralmente menor (Jones, 2000). Jones e Guneratne (1984) relataram que pintos infectados com um dia de idade são mais suscetíveis a tenossinovite e artrite do que aqueles infectados com duas semanas de idade.

Apesar de da infecção ser precoce, os sinais clínicos podem levar semanas para aparecerem (Jones; Onunkwo, 1978).

Quanto a suscetibilidade de diferentes raças e linhagens, o estudo de Jones; Kibenge, 1984 demonstrou, através de infecções experimentais, que as linhagens voltadas à ganho de peso possuem maior suscetibilidade ao aparecimento das lesões e sinais clínicos, quando comparadas com linhagen leves. Na prática, à campo, os relatos de casuísticas também estão muito mais associados à estas linhagens (De Herdt et al., 2008).

2.3 PATOGENIA

A distribuição de ARV no organismo hospedeiro após a infecção experimental mostra que esse vírus pode se espalhar para vários tecidos e órgãos, como trato respiratório, digestivo e reprodutivo (de 24 à 48h), no entanto a infecção por ARV está mais associada a artrite e tenossinovite (Davis et al., 2013; Jones, 2000). Em outros órgãos que não o aparelho locomotor, os ARVs podem não ser necessariamente a causa primária de alterações patológicas (Jones, 2000).

A proteína σ C foi identificada como sendo a responsável pela ligação do vírus na célula do hospedeiro. Por sua vez, é também a porção que define o tropismo tecidual das diferentes cepas encontradas à campo (Meanger et al., 1999).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Em aves infectadas, a claudicação geralmente aparece entre 4 à 5 semanas de idade, embora a infecção possa ter ocorrido logo após a eclosão. Em infecções agudas, os lotes de frango também podem apresentar desuniformização (Jones and Guneratne).

As aves mais gravemente afetadas apresentam a articulação do “jarrete” inchada, com aumento na área do tendão gastrocnêmio ou tendões flexores digitais. Ruptura do gastrocnêmio tendão pode ocorrer em aves pesadas (Jones et al, 1975). Em casos graves, as aves ficam imobilizadas e podem estar reclinados perto de bebedouros ou comedouros. A marcha irregular típica em ruptura bilateral do tendão

resulta da incapacidade da ave de mover o metatarso. Neste caso é frequentemente acompanhado por vasos sanguíneos rompidos (Troxler et al, 2013). A inflamação das áreas do tendão progride para uma forma crônica de lesão, caracterizada por endurecimento e fusão dos tendões e bainhas (Ayalew et al, 2017).

A ocorrência de doenças entéricas possui associação com a infecção por ARV, com a Síndrome de Má Absorção e Runting Stunting Syndrome. A doença é caracterizada por crescimento retardado, baixa uniformidade, letargia e diarreia aquosa (Troxler et al, 2013). Geralmente, outros vírus acabam agindo concomitantemente nestas situações, além de fatores ambientais.

2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de artrite viral pode ser feito com base nos sinais clínicos, lesões macroscópicas e histológicas. Contudo, esses sinais não são patognomônicos e algumas lesões articulares podem assemelhar-se aos causados por *Mycoplasma synoviae*, estafilococos e outras bactérias. O envolvimento do metatarso, tendões extensores e flexores digitais, e às vezes infiltração de heterófilos no coração, ajuda na diferenciação de artrite por reovírus de doença semelhante causados por outros agentes (Troxler et al, 2013). No entanto, a identificação do vírus em material clínico é necessário para confirmar a causa. Isso pode ser feito por isolamento viral e / ou RT - PCR.

A determinação de anticorpos Anti-ARV é uma prática muito comum na indústria avícola para identificação de infecções ou monitoramento do programa vacinal. Por sua vez, os kits comerciais atualmente utilizados são inespecíficos, por possuírem o vírus inteiro lisado no fundo da placa, tornando impossível diferenciar a presença de um vírus patogênico ou apatogênico no rebanho (Ayalew et al, 2017).

2.6 CONTROLE E PREVENÇÃO

Alta diversidade genética é encontrada em isolados de ARV, os quais foram classificados em diferentes genótipos ou clusters, de acordo com a diversidade de sequências de nucleotídeos e / ou aminoácidos de alguns de seus genes e proteínas,

respectivamente. Estudos filogenéticos anteriores foram focados em genes de ARV com uma alta taxa de substituições de nucleotídeos (predominantemente na região σC), e sete grupos filogenéticos distintos ou cepas (I a VII) foram identificados em estudos nos EUA, Japão, Taiwan e Austrália (Liu et al., 2003; Ayalew et al. 2017; Lu et al 2015, Carli et al., 2020, De La Torre et al., 2021). As vacinas ARV comerciais atualmente parecem fornecer proteção apenas parcial e, portanto, insuficiente, possivelmente devido ao surgimento destas variantes genéticas e antigênicas nos ARVs circulantes (Palomino-Tapia et al, 2018). Assim, surtos de infecções por ARV em granjas com galinhas vacinadas foram relatados na América do Norte e em outros continentes, o que levou à intensificação da caracterização molecular dos ARVs pelo sequenciamento do gene σC (Palomino-Tapia et al., 2018).

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).

Pesquisadores estão buscando identificar a porção do vírus mais adequada para desenvolvimento de vacinas com proteção mais abrangente. Atualmente, aparentemente, o desenvolvimento de vacinas autógenas, customizadas para a realidade do desafio da granja, parece ser a alternativa mais eficaz. Mesmo assim, se faz necessária a atualização da cepa vacinal de tempo em tempo, devido a pressão de seleção que ocorre (Ayalew et al. 2017; Lu et al 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar molecularmente e avaliar clínica, patológica e sorologicamente isolados de Reovirus Aviário oriundos de Frangos de Corte no Brasil.

3.2. Específicos

- Caracterizar geneticamente isolados de Reovirus Aviários oriundos de aves com problemas locomotores;
- Avaliar clínica, patológica e sorologicamente frangos de corte infectados com Reovirus Aviário;
- Analisar as características genéticas e moleculares das estirpes isoladas de ARV através da técnica de sequenciamento de nucleotídeos do gene codificador da proteína σ C.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras

Amostras de tendão e líquido sinovial foram coletadas de frangos de corte afetados por artrite ou tenossinovite. Esses frangos foram criados em 14 granjas com animais com histórico de problemas locomotores e localizadas em três estados brasileiros (duas granjas no estado de São Paulo, oito granjas no estado de Minas Gerais e quatro granjas no estado da Bahia). As amostras foram coletadas entre maio e setembro de 2018. Em cada granja, também foram coletadas amostras de sangue de 15 aves com um dia de idade e no dia do abate para quantificar os anticorpos anti-ARV séricos do isotipo IgG. Os frangos de corte amostrados e seus reprodutores não foram vacinados contra ARV. Além disso, swabs da articulação tíbio-metatarso foram coletados de 10 animais com idades de 7, 14 e 28 dias para isolamento e identificação do vírus por qPCR de transcrição reversa (RT-qPCR), e aos 21, 28 e 35 dias de idade, os tecidos das articulações foram coletados e armazenados em formalina tamponada a 10% para histopatologia e para examinar o desenvolvimento das lesões.

4.2. Isolamento e titulação de vírus

Swabs das articulações tíbio-metatarsais afetadas por lesões artríticas características foram colocados em um meio de transporte composto de BHI (Brain Heart Infusion) mais antibióticos (mistura de 0,82% de antibióticos) (Sigma-Aldrich,

St Louis, MO, EUA)–. As amostras de swab foram processadas usando solução salina tamponada com fosfato a 20% (p / v) (0,01 M; pH 7,2) e as soluções foram centrifugadas a 12.000 rpm e 4 ° C por 20 min após a adição de uma solução antibiótica 100x. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado com membranas de 0,22 µm, e o filtrado foi inoculado no saco corina-alantóide de cinco ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF) (VALO BioMedia, Uberlândia, MG, Brasil), de acordo com o método descrito por Jones (2000). Amostras de fluido alantóide (AF) foram colhidas após 120 hs pós-inoculação e submetidas a RT-qPCR para avaliar a replicação do vírus (Tang e Lu, 2016).

4.3. Sorologia

Os soros foram obtidos após a coagulação de amostras de sangue coletadas de frangos de corte com um dia de idade e no dia do abate (42-54 dias de idade). As amostras foram testadas em duplicatas quanto à presença de anticorpos anti-ARV usando um kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) (BioCheck, Ascot, Berkshire, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante.

4.4. Histopatologia

Tissue samples were fixed in 10% (v/v) buffered formalin (pH 7.2). Subsequently, the fixed fragments were dehydrated, diaphanized, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm thickness, and were stained using hematoxylin and eosin. The sections were then examined using light microscopy.

4.5. RT-qPCR para identificação de vírus

O RNA foi extraído usando um kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha) de cada amostra de AF coletada de ovos de galinha embrionados inoculados. O DNA complementar (cDNA) foi produzido por transcrição reversa (RT) e usando um kit M-MLV RT (Life Science Products, Chestertown, MD, EUA), seguindo as instruções de fabricação. Na próxima etapa, o cDNA foi submetido a qPCR usando um painel de

iniciadores de PCR específicos e uma sonda de oligonucleotídeo, conforme descrito por Tang e Lu (2016), para amplificar os primeiros 100 pares de bases da região do gene ARV M1. A amplificação foi registrada após cada ciclo de PCR usando um 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.6. Sequenciamento e análise filogenética

O cDNA foi submetido a um nested PCR para amplificar uma região do gene σ C, segundo Souza et al. (2018); e usando o par de iniciadores ReoS-F1 e ReoS-R1 para o primeiro PCR, e o par ReoS-F2 e ReoS-R2 para o segundo PCR. Os produtos da Nested PCR foram purificados usando um kit de purificação de PCR QIAquick (Qiagen) e o sequenciamento de DNA da fita direta e reversa foi realizado usando um kit de sequenciamento de ciclo BigDye Terminator versão 3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e um ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Usando a ferramenta BLAST / n online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), as sequências parciais de nucleotídeos geradas do gene σ C de isolados brasileiros de ARV foram alinhadas com sequências homólogas e heterólogas deste gene de diferentes Genótipos de ARV disponíveis no GenBank, com o programa ClustalW disponível no Bioedit. As análises filogenéticas foram realizadas com o software MEGA 6.0; e uma árvore filogenética foi construída usando um método de união de vizinhos, baseado em um modelo Jukes-Cantor com 1.000 réplicas bootstrap, a fim de classificar as cepas de ARV em um dos sete grupos de linhagens de reovírus (clusters I, II, III, IV, V, VI e VII).

4.7. Estrutura secundária e análises de sítios antigênicos

O software PolyView 2D - Sable (<http://polyview.cchmc.org/>) foi avaliado para a predição da estrutura secundária de sequências parciais de aminoácidos da proteína σ C de uma cepa de vacina 1733 e isolados brasileiros de ARV, e o software Kolaskar e Togaonkar Antigenicity em Immuno Epitope Database

(<http://tools.iedb.org/bcell/>) foi usado para a predição de sítios antigênicos compreendendo os epítomos lineares de células B / anticorpo desta proteína viral.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação clínica e patológica

O histórico clínico-patológica dos bandos investigados demonstrou a presença de altas taxas de mortalidade e síndrome de nanismo em frangos de corte a partir de 28 dias de idade, vários casos de tenossinovite e artrite, claudicação e taxas crescentes de condenações no matadouro devido a lesões nas articulações, com ruptura frequente do tendão gastrocnêmio (Figura 2). Os sinais clínicos mais característicos em frangos de corte afetados foram claudicação e aumento do tamanho da articulação tíbio-metatarso devido à inflamação proeminente dos tendões (Figura 1).



Figura 1. (a) Aumento do volume bilateral na articulação tíbio-metatarso. (b) Corte transversal da articulação mostrando exsudato e tendões inchados. As amostras anatômicas foram coletadas de frangos de corte afetados em uma granja localizada no estado de São Paulo.

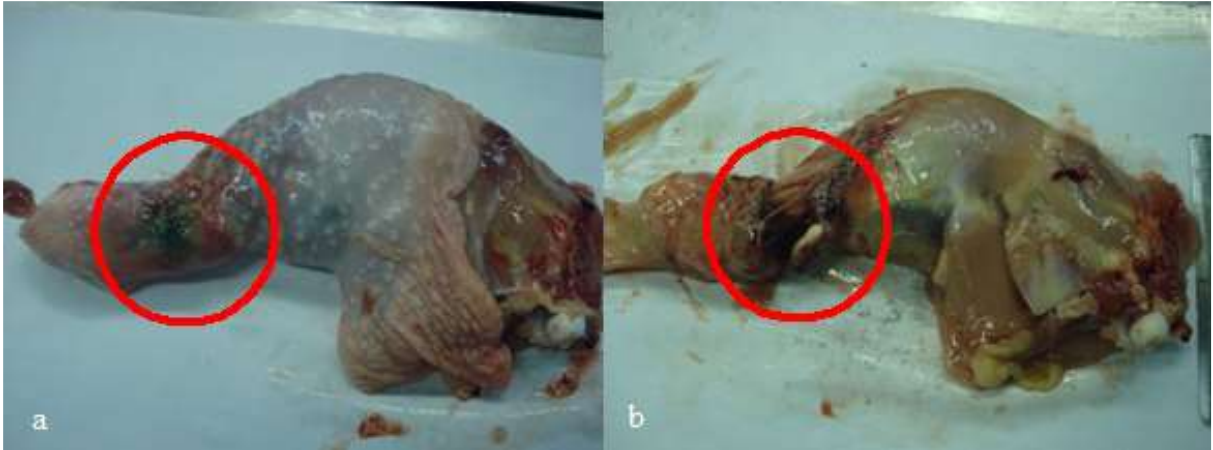


Figura 2. (a) Perna condenada no abatedouro mostrando lesões hemorrágicas. (b) Ruptura do tendão gastrocnêmio. As amostras anatômicas foram coletadas de frangos de corte afetados em uma granja localizada no estado de São Paulo.

5.2. Detecção e monitoramento de títulos de anticorpos anti-ARV em frangos de granjas afetadas pela infecção por ARV

Com base nos resultados do ELISA, os anticorpos anti-ARV foram detectados em pintos de um dia e em frangos de corte na idade de abate (42-54 dias de idade) de todas as granjas investigadas (Figura 3.). Os maiores títulos médios de anticorpos com um dia de idade foram detectados em frangos de corte criados na unidade de produção localizada no estado da Bahia (título médio geométrico [GMT] = 3.370), que diminuiu ligeiramente na idade de abate (GMT = 2.804). Ao contrário, amostras de soro coletadas em fazendas localizadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo apresentaram títulos médios de anticorpos mais baixos em pintos de um dia (GMT = 785 e 1.358, respectivamente), que aumentaram significativamente na idade de abate (GMT = 2.311 e 3.095, respectivamente), indicando um seroconversão contra antígenos ARV em frangos de corte das unidades avícolas desses dois estados brasileiros.



Figura 3. Média geométrica dos títulos de anticorpos IgG anti-ARV em pintos de um dia de vida e frangos de corte em unidades de produção localizadas na Bahia, Minas Gerais e São Paulo.

5.3. Alterações patológicas microscópicas

As alterações histopatológicas mais frequentes em frangos de corte aos 21 dias de idade foram proliferação de tecido conjuntivo na região peritendínea e subcutânea, causando aderência (10/14); tenossinovite aguda a crônica (6/14); reação inflamatória com presença de infiltrado de células mononucleares e heterófilas, com congestão e focos hemorrágicos entre os tendões (3/14). Aos 28 dias de idade, proliferação de tecido conjuntivo nos espaços articular e peritendíneo foram as lesões predominantes, juntamente com aderências (14/14); e infiltração de células linfoplasmocitárias e heterófilos (8/14); tenossinovite moderada a crônica (6/14); congestão e hiperplasia da membrana sinovial (3/14); exsudação de depósito de fibrina entre os tendões (3/14). Os achados patológicos mais comuns aos 35 dias de idade incluíram proliferação abundante de tecido conjuntivo entre os tendões e regiões subcutâneas, causando aderência (14/14); e presença de reação inflamatória contendo linfócitos, plasmócitos e heterófilos (8/14); ocorrência de tenossinovite crônica (6/14); com congestão, focos hemorrágicos e depósitos de fibrina (3/14).

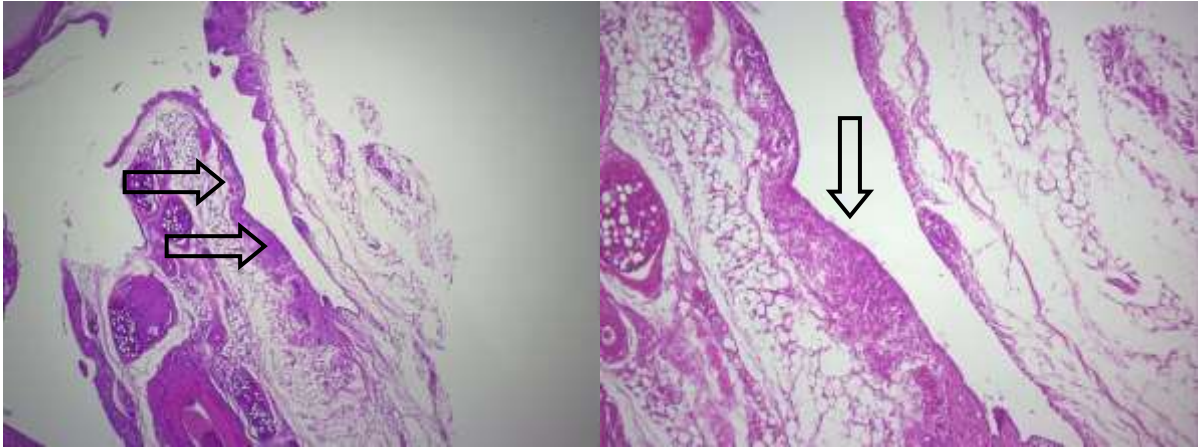


Figura 4. Cápsula articular: (a) HE 4x, agregados de infiltrados de linfoplasmócitos multifocais são observados na cápsula articular. Também foram observados, heterófilos raros e (b) Mesma imagem, HE 10x.

5.4. Isolamento viral e detecção molecular

Quatorze amostras de reovírus aviários foram isolados, após passagem em ovos de galinha embrionados SPF de amostras de juntas e tendões de aves clinicamente afetadas, criadas nas quatorze granjas investigadas neste estudo, compreendendo duas granjas de São Paulo, quatro da Bahia e oito de Minas Gerais. A presença de ARV foi confirmada por RT-qPCR de suspensão de fluido alantóide (AF) coletado de ovos inoculados, e os valores de C_t variaram de 16,65 a 28,13. Os embriões ARV-positivos apresentaram atraso no desenvolvimento e lesões hemorrágicas, que não foram observadas nos embriões controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre a identificação de Reovírus Aviários (ARVs) isolados de casos de campo de artrite e tenossinovite do presente estudo.

Granja	Região	Ano de Isolamento	C_t	Identificação do Isolado	GenBank Accession
1	São Paulo	2018	16.65	ARV/BR/650	MW075264
2	São Paulo	2018	21.38	ARV/BR/651	MW075265
3	Minas Gerais	2018	25.72	ARV/BR/652	MW075266
4	Minas Gerais	2018	23.10	ARV/BR/653	MW029453
5	Minas Gerais	2018	24.31	ARV/BR/654	MW045522
6	Minas Gerais	2018	22.14	ARV/BR/655	MW045523
7	Bahia	2018	25.13	ARV/BR/656	MW045524
8	Bahia	2018	23.07	ARV/BR/657	MW045525
9	Minas Gerais	2018	26.50	ARV/BR/658	MW045526

10	Bahia	2018	27.72	ARV/BR/659	MW045527
11	Bahia	2018	28.13	ARV/BR/660	MW045528
12	Minas Gerais	2018	20.09	ARV/BR/661	MW045529
13	Minas Gerais	2018	23.14	ARV/BR/662	MW045530
14	Minas Gerais	2018	24.77	ARV/BR/663	MW045531

5.5. Sequenciamento e análises filogenéticas do gene σC

As sequências parciais do gene σC foram depositadas no GenBank (números de acesso na Tabela 1). Uma árvore filogenética foi construída após a análise filogenética das sequências parciais de nucleotídeos do gene σC dos isolados de ARV brasileiros analisados neste estudo e cepas de ARV de referência recuperadas do GenBank (Tabela 2.), resultando em sete grupos distintos de genótipos (Figura 5). Onze dos 14 isolados de ARV brasileiros foram agrupados no Cluster I, um isolado no Cluster III e dois isolados no Cluster V juntamente com outros isolados de ARV brasileiros dos estudos de Bampi (2016), Souza et al. (2018), Carli et al. (2020) e De la Torre et al. (2021) (Figura 5).

O Cluster I compreendeu um subgrupo incluindo cepas comumente usadas para a produção de vacinas comerciais contra ARV por diferentes laboratórios, como S1133, 1733 e 2408 e outros dois subgrupos em que um (subgrupo Ib) agrupou os isolados brasileiros de ARV, compartilhando em média 99,52% e 98,4% de identidade para sequências de nucleotídeos e aminoácidos de seu gene / proteína σC , respectivamente (Figuras 5 e 6). Embora a maioria dos isolados de ARV brasileiros caracterizados no presente estudo pertençam ao mesmo cluster I daqueles vírus incluindo as cepas da vacina ARV, as identidades das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre eles foram baixas, com uma identidade média de 74,02% e 74,21%, respectivamente (Figuras 5 e 6).

Tabela 2. Lista de ARVs e sequências do gene Sigma C recuperada do GenBank para este estudo.

ID Amstra	Acession Number	Genotipagem Cluster (Sigma C)
S1133 Biovet	MT161594	I

S1133 Zoetis	MT161595	I
S1133 TU399	HM751135	I
2177 MSD	MT161596	I
1733	AF004857	I
2408	AF204945	I
SK-R1	KX855899	VI
SK-R2	KX855900	VI
SK-R3	KX855901	VI
SK-R4	KX855902	VI
SK-R5	KX855903	VI
SK-R6	KX855904	VI
SK-R7	KX855905	VI
SK-R8	KX855906	VI
SK-R9	KX855907	VI
SK-R10	KX855908	V
SK-R11	KX855909	V
SK-R12	KX855910	V
SK-R13	KX855911	IV
SK-R14	KX855912	IV
SK-R15	KX855913	IV
SK-R16	KX855914	IV
SK-R17	KX855915	IV
SK-R18	KX855916	IV
SK-R19	KX855917	IV
SK-R20	KX855918	IV
SK-R21	KX855919	IV
SK-R22	KX855920	II
SK-R23	KX855921	II
SK-R24	KX855922	II
SK-R25	KX855923	II
SK-R26	KX855924	II
SK-R27	KX855925	II
SK-R28	KX855926	II
SK-R29	KY026178	VI
SK-R30	KY026179	II
SK-R31	KY026180	VI
SK-R33	KY026182	VI
SK-R34	KY026183	V
SK-R35	KY026184	II
SK-R36	KY026185	II
SK-R37	KY026186	VI
SK-R38	KY026187	II
BR/2290	MK297893	II
BR/2291	MK297894	I

BR/2292	MK297895	I
BR/3118	MK297896	I
BR/3121	MK297897	I
BR/3290	MK297898	I
BR/3292	MK297899	V
BR/3522	MK297901	II
BR/3525	MK297902	I
BR/5237	MK297907	V
BR/5246	MK297908	V
BR/5881	MK297909	III
BR/4154	MK297903	I
BR/4526	MK297904	I
BR/4527	MK297905	I
BR/4535	MK297906	I
BR/3295	MK297900	I
USP_BR_336-15	MT161581	VII
USP_BR_358-9	MT161582	II
USP_BR_362-5	MT161583	II
USP_BR_480-10	MT161584	II
USP_BR_1209	MT161585	II
USP_BR_1226	MT161586	I
USP_BR_1226-1	MT161587	I
USP_BR_1232-1	MT161588	I
USP_BR_1258-2	MT161589	II
USP_BR_1291-1	MT161590	VII
USP_BR_1365-2	MT161591	II
USP_BR_1425-1	MT161592	VII
USP_BR_1463-1	MT161593	I
BR_SC_6996	MG902944	II
BR_SC_6998	MG902946	II
BR_SC_6999	MG902943	II
BR_SC_6997	MG902945	II
BR_SC_7001	MG902947	V
111057	KU896804	V
111109	KU896807	V
111065	KU896805	I
111049	KU896803	I
ISR5225	FJ793546	I
ISR5215	FJ793531	I
ISR5216	FJ793530	I
GEI10 97M	AF354219	V
Reo/Broiler/YTLY/161020b	MK189469	I
Reo/PA/Broiler/23526b/11	KR856971	II
97927	KJ879664	II

101816	KM282078	II
Reo/BC/Broiler/16-0753b	MG822676	III
Reo/BC/Broiler/16-0711	MG822679	III
Reo/BC/Broiler/14-0587	MG822702	VII
Reo/BC/Broiler/16-0282	MG822696	VII
42563-4	DQ872801	III
97067	KJ879636	III
1017	AF297216	VII
D12	MN879710	V

Os isolados brasileiros ARV 652 e dois outros (ARV658 e ARV663) foram agrupados nos clusters III e V, respectivamente. Nos clusters III e V as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene / proteína σC apresentaram 98,55% / 98,85% e 93,19% / 91,77% de identidades médias, respectivamente com outros isolados de ARV brasileiros classificados em cada um desses clusters por Bampi (2016) Souza et (2018) e Carli et al. (2020) (Figuras 5 e 6).

As sequências de aminoácidos deduzidas da proteína σC parcial dos isolados brasileiros do presente estudo mostraram um grande número de mutações pontuais quando comparadas às cepas de vacinas ARV de referência (1733, S1133 BIOVET, 2177 MSD, S1133 ZOETIS e 2048), mesmo de aqueles isolados (ARV / BR-650, ARV / BR-653, ARV / BR-655, ARV / BR-657 e ARV / BR-662) classificados no subaglomerado Ib do cluster I incluindo essas cepas vacinais. Essas mutações de aminoácidos aumentaram ainda mais para os isolados brasileiros de ARV classificados nos clusters III e V em relação às cepas da vacina ARV (Figura 7 e 8) e resultaram na análise PolyView 2D-SABLE de isolados brasileiros de ARV representativos dos clusters I, III e V em mudanças relevantes na estrutura secundária desta proteína. Assim, foram identificadas mudanças marcadas nas posições de algumas hélices α , fitas beta e bobinas, bem como a acessibilidade físico-química e relativa a solventes de alguns resíduos de aminoácidos nas sequências desta proteína (Figura 7). Por outro lado, poucas alterações de aminoácidos ocorreram em relação a outros isolados brasileiros de ARV classificados dentro de cada cluster (I, III ou V) em estudos anteriores (Figura 8). Além disso, a maioria das mutações pontuais de aminoácidos foram agrupadas nos principais locais antigênicos previstos para a proteína σC da cepa de ARV da vacina

de referência 1733, embora tenha havido um número relevante de alterações de aminoácidos em duas regiões nas quais os locais antigênicos não foram previstos, tais como aqueles entre os aminoácidos 51 a 84 e 120 a 147 (Figura 8).

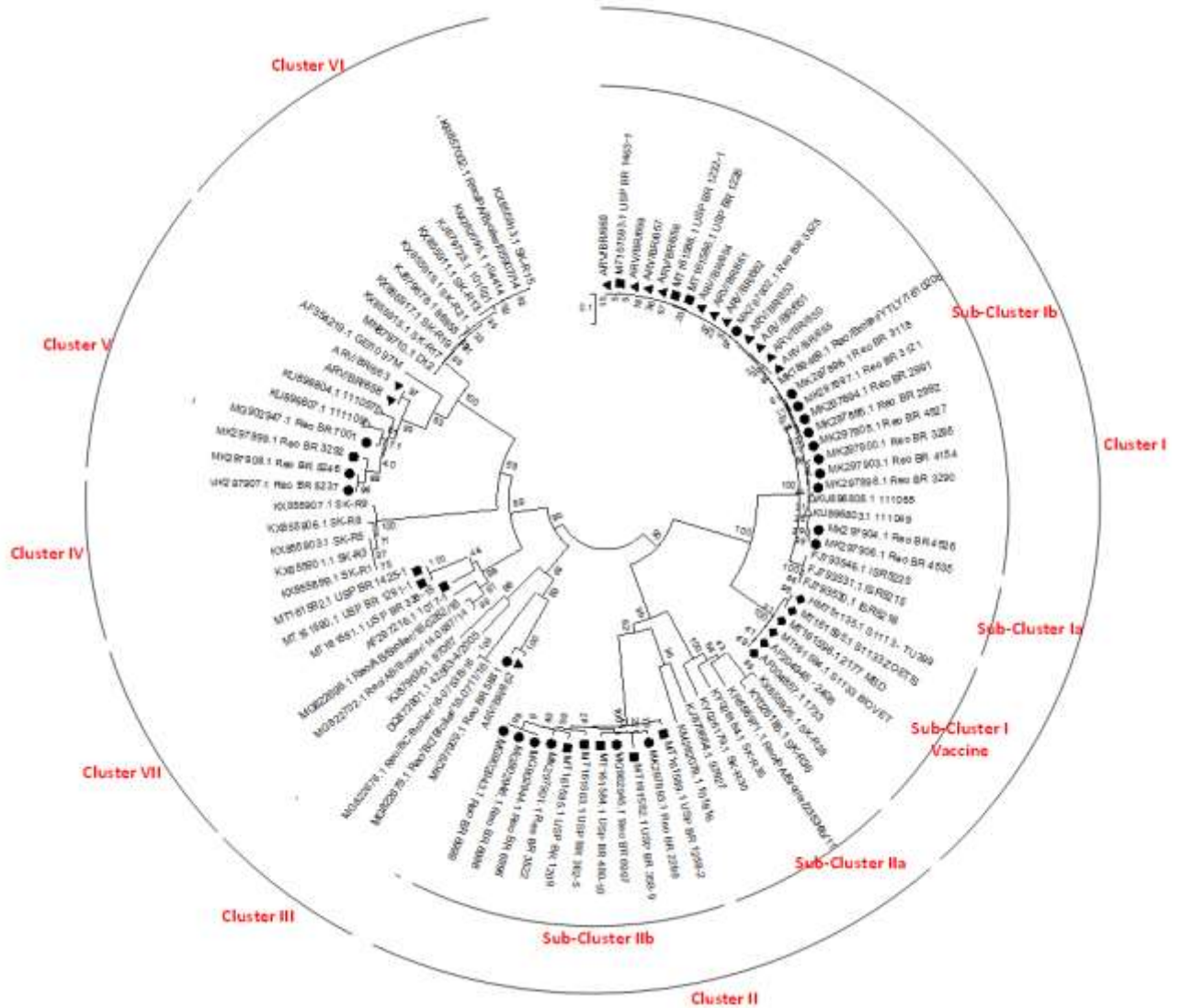


Figura 5. Árvore filogenética baseada em sequências de nucleotídeos parciais do gene σC de cepas de ARV sequenciadas neste estudo e de sequências de cepas de referência recuperadas do GenBank. As análises foram realizadas no software MEGA 6.0 com o método de neighbour-joining, baseado no modelo Jukes-Cantor com 1.000 réplicas de bootstrap. ▲ Isolados brasileiros de ARVs do presente estudo. ● Isolados brasileiros de ARVs dos estudos de Souza et al. (2018) e Carly et al. (2020). ■ Isolados brasileiros de ARVs do estudo de De La Torre et al. (2021). ▼ Isolados brasileiros de ARVs do estudo de Bampi (2016).

	Sigma C Protein of Avian Reoviruses	% Nucleotide Identities																																		
		(1)-	(2)-	(3)-	(4)-	(5)-	(6)-	(7)-	(8)-	(9)-	(10)-	(11)-	(12)-	(13)-	(14)-	(15)-	(16)-	(17)-	(18)-	(19)-	(20)-	(21)-	(22)-	(23)-	(24)-	(25)-	(26)-	(27)-	(28)-	(29)-						
Cluster I	1-) AF0004657.1 L755	100%	99.81%	99.81%	98.80%	75.14%	74.99%	74.21%	74.28%	74.28%	74.98%	75.75%	73.69%	74.70%	73.79%	74.58%	74.58%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%			
	2-) MT161594.1 S1133_BOVET	97.00%	100%	99.81%	98.80%	75.14%	74.99%	74.21%	74.28%	74.28%	74.98%	75.75%	73.69%	74.70%	73.79%	74.58%	74.58%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%		
	3-) MT161596.1 Z177_MJD	97.00%	97.00%	100%	98.80%	75.14%	74.99%	74.21%	74.28%	74.28%	74.98%	75.75%	73.69%	74.70%	73.79%	74.58%	74.58%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	74.98%	
	4-) MT161596.1 S1133_20ETIS	99.41%	97.47%	97.47%	100%	74.75%	74.38%	74.80%	75.79%	74.84%	75.57%	75.27%	74.37%	74.41%	74.79%	75.16%	74.58%	75.98%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	74.37%	
	5-) KU956003.1 L11049	73.83%	75%	75%	74.47%	100%	97.39%	97.29%	97.73%	97.4%	97.68%	98.12%	97.68%	97.13%	97.1%	98.10%	97.68%	97.68%	98.65%	94.47%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	94.80%	
	6-) MW075264.1 ARV/BR/050	72.54%	73.75%	73.75%	73.17%	96.62%	100%	98.34%	97.71%	97.93%	94.58%	95.14%	98.42%	97.71%	97.71%	98.26%	98.63%	98.10%	97.28%	94.08%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	
	7-) MW075285.1 ARV/BR/051	73.83%	75%	75%	74.47%	97.09%	97.5%	100%	97.87%	98.06%	98.03%	98.17%	98.47%	97.87%	97.87%	98.03%	98.35%	98.35%	97.48%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
	8-) MW024553.1 ARV/BR/055	73.83%	75%	75%	74.47%	95.93%	95%	100%	97.87%	98.06%	98.03%	98.17%	98.47%	97.87%	97.87%	98.03%	98.35%	98.35%	97.48%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
	9-) MW045522.1 ARV/BR/054	73.25%	74.41%	74.41%	73.83%	96.54%	95.62%	97.09%	99.41%	100%	98.65%	98.14%	98.65%	98.49%	99.8%	99.03%	98.65%	98.49%	97.2%	94.28%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%
	10-) MW045523.1 ARV/BR/055	74.41%	75.58%	75.58%	75%	97.09%	98.23%	98.83%	96.51%	97.09%	100%	95.18%	95.01%	98.20%	98.05%	99.01%	98.65%	98.65%	97.88%	94.94%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%
11-) MW045527.1 ARV/BR/058	73.54%	73.75%	73.75%	73.12%	97.54%	96.47%	98.12%	98.87%	97.5%	100%	98.77%	98.53%	98.13%	97.79%	97.98%	97.98%	98.12%	97.28%	94.08%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	94.39%	
12-) MW045528.1 ARV/BR/060	74.41%	75.58%	75.58%	75%	97.09%	96.87%	98.25%	97.09%	97.09%	100%	100%	98.47%	98.47%	98.47%	98.47%	98.47%	98.47%	98.47%	94.28%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
13-) MW045529.1 ARV/BR/061	73.25%	74.41%	74.41%	73.83%	96.54%	95.62%	97.09%	99.41%	95.03%	96.87%	100%	98.65%	98.14%	98.65%	98.49%	99.8%	99.03%	98.65%	98.49%	97.2%	94.28%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
14-) MW045530.1 ARV/BR/062	73.25%	74.41%	74.41%	73.83%	96.54%	95.62%	97.09%	99.41%	95.03%	96.87%	100%	98.65%	98.14%	98.65%	98.49%	99.8%	99.03%	98.65%	98.49%	97.2%	94.28%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
15-) MK257902.1 Reo_BR_3528	73.83%	75%	75%	74.47%	98.23%	97.5%	100%	98.83%	97.97%	98.25%	100%	99.37%	98.47%	97.47%	98.25%	100%	100%	97.09%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%		
16-) MT161596.1 USP_BR_1226	74.41%	75.58%	75.58%	75%	97.09%	96.87%	98.25%	97.09%	97.09%	100%	100%	97.09%	97.09%	97.09%	97.09%	97.09%	97.09%	97.09%	94.28%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
17-) MT161596.1 USP_BR_1483.1	73.83%	75%	75%	74.47%	96.54%	95.62%	97.09%	95.93%	96.51%	97.09%	100%	98.75%	98.82%	95.93%	96.51%	98.25%	98.03%	100%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	94.40%	
18-) MK257895.1 Reo_BR_2592	73.83%	75%	75%	74.47%	98.23%	97.5%	100%	98.83%	97.97%	98.25%	100%	99.37%	98.47%	97.47%	98.25%	100%	100%	97.09%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%	97.47%		
19-) MK257893.1 Reo_BR_2290	41.80%	43.01%	43.01%	42.44%	44.71%	41.67%	44.10%	44.10%	42.8%	43.8%	44.70%	42.5%	44.70%	43.6%	42.6%	44.70%	44.70%	44.1%	44.7%	100%	93.52%	48.93%	88.53%	95.7%	96.94%	47.38%	45.78%	47.28%	47.28%	47.28%	47.28%	47.28%	47.28%	47.28%		
20-) MK257901.1 Reo_BR_3522	38.75%	40%	40%	39.39%	41.81%	41.25%	42.11%	41.21%	40.8%	41.81%	41.81%	41.81%	41.81%	40.6%	40.6%	41.81%	41.81%	41.21%	41.81%	100%	46.23%	65.52%	66.67%	98.38%	47.34%	47.34%	48.38%	45.44%	45.44%	45.44%	45.44%	45.44%	45.44%	45.44%	45.44%	
21-) MW075268.1 ARV/BR/062	41.34%	45.34%	45.34%	44.76%	44.13%	43.23%	45.34%	44.76%	44.76%	45.34%	41.87%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	44.76%	100%	67.1%	54.62%	54.62%	51.84%	53.89%	52.83%	54.62%	51.63%	51.63%	51.63%	51.63%	51.63%	51.63%	51.63%	
22-) MK257909.1 Reo_BR_5481	44.76%	45.34%	45.34%	44.76%	43.01%	43.62%	44.76%	44.18%	44.18%	44.76%	41.27%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	44.18%	100%	54.41%	53.47%	53.47%	52.47%	52.01%	51.01%	51.01%	51.01%	51.01%	51.01%	51.01%	51.01%	51.01%		
23-) MW045524.1 ARV/BR/058	44.1%	44.33%	44.33%	44.3%	41.09%	36.97%	41.4%	43.02%	42.4%	43.02%	36.07%	42.4%	42.4%	42.4%	42.4%	42.4%	43.02%	41.09%	42.4%	36.0%	50%	49.50%	100%	93.64%	50.83%	50.83%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%			
24-) MK023947.1 Reo_BR_7001	43.27%	41.80%	41.80%	41.27%	41.80%	38.12%	41.27%	42.44%	41.80%	41.80%	38.12%	41.27%	41.80%	41.80%	41.27%	41.27%	41.80%	41.80%	40.11%	38.18%	45.37%	45.34%	100%	93.64%	50.83%	50.83%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%		
25-) MK257907.1 Reo_BR_5237	41.80%	42.44%	42.44%	41.80%	41.44%	38.75%	41.80%	41.27%	40.99%	42.44%	36.75%	41.80%	40.99%	40.99%	41.80%	41.80%	42.44%	41.44%	40.09%	38.79%	47.09%	46.53%	52.4%	100%	100%	98.43%	52.98%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%		
26-) MK257905.1 Reo_BR_5248	41.80%	42.44%	42.44%	41.80%	41.44%	38.75%	41.80%	41.27%	40.99%	42.44%	36.75%	41.80%	40.99%	40.99%	41.80%	41.80%	42.44%	41.44%	40.09%	38.79%	47.09%	46.53%	52.4%	100%	100%	98.43%	52.98%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%			
27-) KU956007.1 L113339	41.27%	41.80%	41.80%	41.27%	41.80%	38.12%	41.27%	42.44%	41.80%	41.80%	38.12%	41.27%	41.80%	41.80%	41.27%	41.27%	41.80%	41.80%	41.27%	38.39%	45.37%	45.34%	36.5%	50%	100%	93.64%	50.83%	50.83%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%	49.7%		
28-) MT161596.1 USP_BR_1293.1	41.80%	42.44%	42.44%	41.80%	41.44%	38.75%	41.80%	41.27%	40.99%	42.44%	36.75%	41.80%	40.99%	40.99%	41.80%	41.80%	42.44%	41.44%	40.09%	38.79%	47.09%	46.53%	52.4%	100%	100%	98.43%	52.98%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%			
29-) MT161596.1 USP_BR_1423.1	41.80%	42.44%	42.44%	41.80%	41.44%	38.75%	41.80%	41.27%	40.99%	42.44%	36.75%	41.80%	40.99%	40.99%	41.80%	41.80%	42.44%	41.44%	40.09%	38.79%	47.09%	46.53%	52.4%	100%	100%	98.43%	52.98%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%	58.95%			

Figura 6 - Porcentagens de identidade para nucleotídeos parciais e sequências deduzidas de aminoácidos do gene / proteína σ C de isolados brasileiros de ARVs e cepas vacinais. Os isolados de ARV e as cepas de vacina são separados em grupos I, II, III, V e VII conforme a análise filogenética definida do gene σ C.

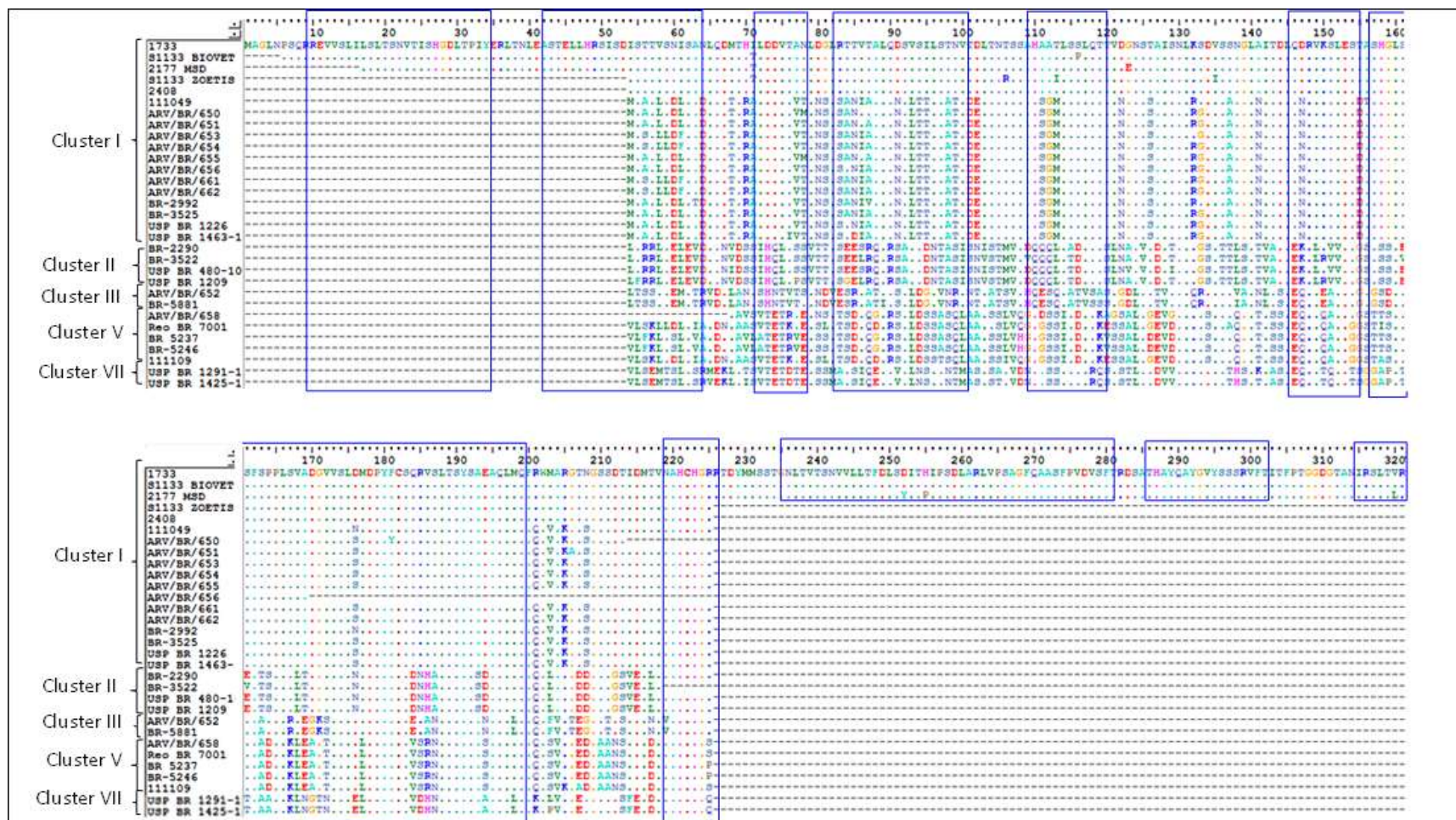


Figura 8 - Alinhamento de sequência múltipla de sequências de aminoácidos deduzidas da proteína σ completa ou parcial da cepa de referência da vacina (1733) e isolados brasileiros de ARV separados nos clusters I, II, III, V e VII, foram determinados usando Clustal W. Idêntico os resíduos de aminoácidos em relação à cepa de referência são representados por pontos, e as variáveis relacionadas a essa cepa de referência são identificadas pelo código de aminoácidos da primeira letra. Os sítios antigênicos que compreendem os epítopos lineares de células B / anticorpo para a cepa ARV da vacina 1733 foram previstos pelo software Kolaskar e Togaonkar Antigenicity incluído no Immuno Epitope Database (<http://tools.iedb.org/bcell/>) e foram destacados em azul caixas, incluindo os resíduos de aminoácidos 9 a 35, 43 a 64, 72 a 78, 83 a 101, 109 a 120, 146 a 155, 157 a 198, 219 a 224, 236 a 281, 286 a 304 e 315 a 321, e esses locais foram expandidos para as sequências de aminoácidos de outros isolados brasileiros de ARV. Os travessões identificam os códons não sequenciados e as posições de aminoácidos não deduzidas para cepas de vacinas ARV e isolados brasileiros.

6. DISCUSSÃO

Cepas de ARVs foram identificadas em granjas de aves localizadas em diferentes regiões do Brasil e em várias regiões do mundo, sendo esses vírus o patógeno mais relevante associado a artrite, tendinite e tenossinovite em frangos (Souza et al., 2018, Carli et al., 2020, De la Torre et al., 2021, Ayalew et al., 2017). Lesões associadas à infecção por ARV foram estudadas, e nossos resultados confirmam as alterações anátomo-histopatológicas descritas anteriormente para alterações patológicas, como tenossinovite, pernas abertas e inflamação dos extensores tarsometatarsais e digitais e tendões flexores (Sharafeldin et al., 2014). Nesse contexto, os avicultores brasileiros estão preocupados com os crescentes prejuízos causados por problemas locomotores, principalmente no que diz respeito à condenação dos animais afetados ao abate. Pereira et al. (2020) mostraram que a condenação parcial por artrite afetou 3,17% das aves abatidas ao longo de três meses (agosto a outubro de 2019) em abatedouro no sul do Brasil, porém o agente causador não foi identificado. Souza et al. (2018) descobriram que a condenação parcial do abate por artrite ou tendinite com infecção ARV diagnosticada afetou 5% dos frangos abatidos e que a morbidade chegou a 60% em alguns bandos.

Curiosamente, no presente estudo a evolução das lesões microscópicas foi caracterizada aos 21, 28 e 35 dias de idade de frangos de corte infectados com ARV, destacando-se a predominância na fase inicial de reação inflamatória aguda com infiltração mononuclear e heterófila acentuada nos tecidos do tendão, incluindo o início da proliferação do tecido conjuntivo. Essas lesões teciduais foram mudando gradativamente nos estágios finais para lesões caracterizadas por uma proliferação acentuada de tecido conjuntivo nas regiões subcutânea e peritendínea, bem como a ocorrência de congestão e a presença de regiões hemorrágicas e depósitos de fibrina. Uma evolução semelhante do perfil histopatológico também foi registrada, tanto em aves infectadas naturalmente como em aves infectadas experimentalmente (Ayalew et al, 2017; Troxler, 2013; Souza et al, 2018).

Todos os bandos investigados neste estudo mostraram soroconversão para antígenos do Reovírus Aviário, usando um método ELISA para titulação de anticorpos IgG anti-ARV. A presença de anticorpos anti-ARV em pintos de um dia,

demonstra que as galinhas reprodutoras entraram em contato com o Reovírus Aviário, uma vez que não foram vacinadas contra este vírus e considerando que 32,8% dos títulos de IgG presentes nas galinhas são transferidos para os pintinhos (Gharaibeh, S., Mahmoud, K. e Al-Natour, M., 2008. Resultados semelhantes foram relatados por Ayalew et al. (2017), destacando que 98,3% das fazendas em uma região específica do Canadá eram soropositivos para antígenos ARV no momento do abate (entre 33 e 42 dias). Por sua vez, um estudo realizado com aves de quintal em Bangladesh mostrou prevalência variando de 68 a 85,71% de positividade, em diferentes regiões do país (Islam et al, 2020). Considerando também que a meia-vida média de anticorpos ARV maternos em pintos é de 4,7 dias (Gharaibeh, S. e Mahmoud, K., 2013), é hipotetizado que o aumento de anticorpos anti -Anticorpos ARV encontrados na idade de abate neste estudo podem ser resultado do contato de chi de frango ckens com cepas ARV circulando em granjas avícolas, e que os anticorpos maternos transferidos não podem apresentar reação cruzada significativa com essas cepas e não foram suficientes para proteger as aves contra a infecção. Essa hipótese foi validada neste estudo pelos achados em pintos de um dia de vida da granja avícola do estado da Bahia, que apesar de apresentarem altos títulos de anticorpos anti-ARV (GMT = 3.370), desenvolveram tenossinovite típica, mantiveram altos níveis de anticorpos títulos (GMT = 2.804) na idade de abate e tiveram cepas de ARV isoladas de suas amostras de articulações afetadas.

A filogenia de sequência parcial do gene σ C dos isolados de ARV brasileiros neste estudo classificou a maioria deles no Cluster I (11/14 isolados de ARV brasileiros). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos no Brasil, nos quais 11 isolados de um total de 17 foram classificados em um subgrupo Ib do Cluster I (Carli et al, 2020), e dois outros isolados do estudo de Bampi (2016) foram agrupados no mesmo cluster I, além de outros três isolados brasileiros de ARV identificados no cluster I por De La Torre et al. (2021). A identidade média das sequências de nucleotídeos e de ácidos deduzidos do gene / proteína σ C encontrados nos isolados brasileiros de ARV do Cluster I desses estudos foi alta. No entanto, existe uma baixa identidade entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene / proteína σ C de isolados brasileiros de ARV e de cepas vacinais. Além disso, o isolado baiano (ARV / BR / 652) classificado no Cluster III,

apresentou elevada identidade de nucleotídeos e aminoácidos para o gene / proteína σ C do isolado paulista (Reo / BR / 5881) em 2017 estudado por Carli et al, 2020. Os outros dois isolados dos estados de Minas Gerais pertencentes ao Cluster V (ARV / BR / 658 e ARV / BR / 663), ao contrário, apresentaram identidades médias ligeiramente inferiores com em relação a cinco isolados brasileiros de ARV do estado de Santa Catarina (ARV 111109 - 2015), ou do estado do Paraná (Reo / Br / 7001 - 2013, Reo / BR / 5237 - 2016, Reo / BR / 5246 - 2017 e Reo / BR / 3292 - 2016), que foram caracterizados anteriormente por Bampi (2016), Souza et al. (2018) e Carli et al, (2020). Ao contrário de estudos anteriores sobre a filogenia de isolados de ARV brasileiros (Souza et al., 2018, Carli et al., 2020, De la Torre et al., 2021), o presente estudo não identificou isolados de ARV classificados nos Clusters II e VII. No entanto, nossos resultados não apenas corroboram achados anteriores sobre a epidemiologia molecular de isolados brasileiros de ARV, mas também evidências adicionais de que cepas de ARV variantes são prevalentes e amplamente distribuídas em granjas localizadas em diferentes regiões do Brasil, e esses vírus apresentam diferenças marcantes em seus σ gene / proteína C em relação às cepas de vacinas ARV convencionais.

As análises das sequências de aminoácidos deduzidas de parte da proteína sigma C de isolados brasileiros de ARVs mostraram que esses vírus alteraram partes relevantes de suas estruturas proteicas secundárias, de modo que se distanciaram das cepas vacinais de referência, como as cepas 1733 e S1113, principalmente em regiões de proteínas que constituem sítios antigênicos preditos que podem favorecer a fuga desses vírus da imunidade induzida pela vacina composta com essas cepas de referência dos ARVs. Além disso, neste processo de evolução dinâmica, algumas mutações pontuais também ocorrem em alguns sítios antigênicos desta proteína desses isolados em relação a outros isolados de ARV brasileiros identificados de 2013 a 2019 em granjas de outras regiões deste país (Bampi, 2016, Souza et al., 2018, Carli et al., 2020, De La Torre et al., 2021). De fato, a maioria dos sítios antigênicos previstos para a proteína σ C da cepa da vacina ARV 1733 neste estudo já havia sido identificada e descrita para outras cepas de ARV, e também foi enfatizado que esses sítios concentram um maior número de variações

nos resíduos e aminoácidos que os compõem. (Goldenberger et al., 2010, Ayalew et al., 2017, Palomino-Tapia et al., 2018, De La Torre et al., 2021).

Com base no processo de evolução mencionado anteriormente, pode-se presumir que a imunidade pós-infecção em frangos de corte afetados tem sido insuficiente e incapaz de bloquear a infecção por ARV de aves suscetíveis e parcialmente imunes e, em vez disso, parece favorecer a seleção do vírus de escape variantes, mesmo na ausência de vacinação contra esse vírus, o que usualmente exerceria uma maior pressão imunológica para a seleção de variantes do vírus, como ocorre com a evolução de outros vírus de RNA (Domingo, 2019). Portanto, o uso de vacinas autógenas foi proposto para aumentar o espectro de proteção para os desafios por cepas de ARV variantes de campo (Ayalew et al, 2017) e Palomino-Tapia et al. (2018), ainda, sugerem que as cepas de ARV contidas na vacina autógena devem ter pelo menos 95% de similaridade de sua proteína σ C em relação aos vírus de campo, para se obter um resultado de proteção satisfatório. Por fim, para o controle efetivo da infecção por ARV em aves comerciais, é necessária a adoção de um levantamento epidemiológico contínuo e adequado dos vírus que circulam no campo, associado à caracterização clínica e patológica da infecção por ARV em frangos, em conjunto com uma caracterização molecular e imunológica precisa dos isolados de ARV.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, no presente estudo 14 isolados de ARV semelhantes a isolados de ARV brasileiros recentes classificados nos clusters I, III ou V em relação ao gene / proteína σ C, e com diferenças genéticas e antigênicas relevantes neste gene / proteína em relação à vacina ARV cepas, estão envolvidas na etiologia da artrite-tenossinovite em frangos de corte criados em bandos de aves de três regiões brasileiras, conforme evidenciado pelos dados clínicos, patológicos e sorológicos das aves afetadas. Além disso, a grande variabilidade observada nos sítios antigênicos preditos desses isolados brasileiros de ARV ressalta a importância da busca de novas alternativas para a formulação de vacinas mais eficazes que incluam cepas de vírus autóctones a serem utilizadas no país.

8. REFERÊNCIAS

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.

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. **Scientific Reports**, 7, 3565.

Bampi, R.A. (2016) **Pathogenicity of variant field isolates of avian reovirus and molecular characterization of Brazilian variants from commercial broilers**. Thesis (M.S.)–University of Georgia, 2016. <https://athenaeum.libs.uga.edu/handle/10724/35541>.

Carli, S. D., Wolf, J. M., Gräf, T., Lehmann, F. K. M., Fonseca, A. S. K., Canal, C. W. Lunge, V. R. & Ikuta, N. (2020). **Avian Pathology**. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1804528>.

De la Torre, D., Astolfi-Ferreira, C. S., Chacón, R. D., Puga, B. & Ferreira, A. J. P. (2021). Emerging new avian reovirus variants from cases of enteric disorders and arthritis/tenosynovitis in Brazilian poultry flocks. **British Poultry Science**. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1864808>.

DAVIS, J. F., KULKARNI, A., FLETCHER, O. (2013) Reovirus Infections in Young Broiler Chickens. <https://doi.org/10.1637/10515-021313> -Case.1.

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.

Domingo E. (2019) Chapter 4 - Interaction of virus populations with their hosts. In: **Virus as populations: composition, complexity, quasi species, dynamics, and biological implications**. 2nd Edition, Academic Press, New York, p. 123-166.

Gharaibeh, S., Mahmoud, K. & Al-Natour, M. Field Evaluation of Maternal Antibody Transfer to a Group of Pathogens in Meat-Type Chickens. (2008). **Poultry Science**, 87:1550–1555. doi:10.3382/ps.2008-00119.

Gharaibeh, S. and Mahmoud, K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. (2013). **Poultry Science** 92 :2333–2336. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03249> .

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 Pathology**: J. W. V. P. A 39, 189–199.

Islam, M. S., Sabuj, A. A. M., Haque, Z. F., Pongit, A., Hossain, M. G. & Saha, S. Seroprevalence and risk factors of avian reovirus in backyard chickens in different areas of Mymensingh district in Bangladesh. (2020). **Journal Of Advanced Veterinary and Animal Research**. Vol 7, No. 3, pg 546–553.

JONES, R. C., 2000. Avian Reovirus infections. **Rev. Sci. Tech.** 19, 614-625.

JONES, R. C. and GUNERATNE, J. R. M., (1984). The Pathogenicity of some avian reoviruses with particular reference to tenosynovitis. **Avian Pathology**. 13:173-189..

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, 1984

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., T.W. Jordan, and S. Lioupis. 1975. Characteristics of reovirus isolated from ruptured gastrocnemius tendons of chickens. **Vet Rec.** 96:153–154.

Liu, H. J., Lee, L.H., Hsu, H.W., Kuo, L.C. and 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., Y. Tang, P. A. Dunn, E. A. Wallner-Pendleton, L. Lin and E. A. Knoll. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania. (2015) USA, 2011-2014. **Sci. Rep.** 5:14727.

MEANGER, J. et al. Tissue tropism of avian reoviruses is genetically determined. **Veterinary Research.** v.30, n.5, p.523-529, 1999.

Okino, C. H., Mores, M.A.Z, Trevisol, I.M., Coldebella, A., Montassier, H.J. and Brentano, L. (2017) Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. **PLoS One** 2017;12:e0172275.

Palomino-Tapia, V., Mitevski, D., Inglis. T., Van Der Meer, F. and Abdil-Careem, M.F. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012-2017 based on partial sigma (σ)C gene. (2018) **Virology.** 522:138-146.

Pereira, T. R., Francois, E. P. & França, I. Evaluating the causes of arthritis condemnation in a Brazilian slaughterhouse. 2020 PSA, 109th Annual Meeting Abstracts, pg 22, abstract no 41.

Sharafeldin, T. A., Mor, S. K., Bekele, A. Z., Verma, H., Goyal, S. M. & Porter, R. E. The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthritis. (2014). Vol. 43, No. 4, 371–378, <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2014.940496> .

Souza, S. O., De Carli, S., Lunge, V.R., Ikuta, N., Canal, C.W., Pavarini, S.P. and Driemeier, D. (2018) Pathological and molecular findings of avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis in poultry flocks from Brazil. **Poultry Science**, pey239, <https://doi.org/10.3382/ps/pey239> .

Tang, Y. and H. Lu. (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.

Troxler, S., Rigomier, P., Bilic, I., Liebhart, D., Prokofieva, I., Robineau, B. & Hess, M. Identification of a new reovirus causing substantial losses in broiler production in France, despite routine vaccination of breeders. (2013). **Veterinary Record**, 172: 556. doi: 10.1136/vr.101262.

Wickramasinghe, R., Meanger, J., Enriquez, C.E., Wilcox, G.E., 1993. Avian reovirus proteins associated with neutralization of virus infectivity. **Virology** 194, 688– 696.

Zhong, L., Gao, L., Liu, Y., Li, K., Wang, M., Qi, X., Gao, Y. and Wang, X. (2016). Genetic and pathogenic characterization of 11 avian reovirus isolates from northern China suggest continued evolution of virulence. **Scientific Reports**, 6:35271, DOI: 10.1038/srep35271.