

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL

CAROLINA RECK

DETECÇÃO DE *Mycoplasma synoviae* E *Orthoreovírus aviário*
EM LESÕES DE ARTRITES EM MATRIZ E FRANGO DE CORTE.

LAGES, SANTA CATARINA

2011

CAROLINA RECK

**DETECÇÃO DE *Mycoplasma synoviae* E *Orthoreovírus aviário*
EM LESÕES DE ARTRITES EM FRANGOS E MATRIZES DE CORTE.**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito para obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Miletto.

LAGES, SANTA CATARINA

2011

CAROLINA RECK

**DETECÇÃO DE *Mycoplasma synoviae* E *Orthoreovírus aviário*
EM LESÕES DE ARTRITES EM FRANGOS E MATRIZES DE CORTE.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti,
UDESC

Membros:

Prof. Dra. Lenita Moura Stefani
UDESC

Membros:

Prof. Dr. Hamilton Luiz Moraes
UFRGS

Lages, Santa Catarina, 25 /02/ 2011.

AGRADECIMENTOS

A minha duas famílias, pelo apoio e incentivo, durante o longo processo de formação, o qual ainda não acabou.

Ao meu orientador Luiz Claudio Miletti, pela oportunidade, por aceitar o desafio de me orientar, pelo ensinamento e paciência ao longo desses dois anos.

Ao Álvaro, por sempre estar disposto a me ajudar, pelas discussões construtivas, compartilhamento de conhecimento e principalmente, pelo seu apoio que conforta e me deixa mais forte para superar os desafios impostos pela vida.

A toda equipe do LABHEV, pelo grande aprendizado, amizade, pelas discussões, risadas, que de forma direta e indireta auxiliaram na produção desse trabalho.

Ao Professor Dr. Célso Pilati pelo processamento e apoio histopatológico.

A todos os amigos, colegas e profissionais, que de alguma forma contribuíram para o encaminhamento desse trabalho, seriam injusto citar nomes, pois correria o risco de esquecer alguém.

Aos mestres do curso de Pós-Graduação, pelo ensinamento, pelas dificuldades e oportunidades.

A CAPES e CNPq, pela bolsa de ensino e apoio financeiro.

A BIOVET, Merial, EMBRAPA, UFSC e demais abatedouros que auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

“ O aspecto mais triste da vida de hoje
é que a ciência ganha em conhecimento mais
rapidamente que a sociedade em sabedoria.”

ISAAC ASIMOV

RESUMO

RECK, Carolina. Detecção de *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus aviário* em lesões de artrites em frangos e matrizes de coíência Animal- Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

A artrite infecciosa em frangos e matrizes de corte representa um problema sanitário e econômico de grande impacto, provocando elevadas perdas de produtividade e nos processos de industrialização. O impacto econômico relacionado às perdas por problemas no aparelho locomotor normalmente são subestimados, pois geralmente são consideradas apenas as perdas no abatedouro, não contabilizando os descartes que ocorrem durante o período de alojamento. Os principais agentes etiológicos associados aos casos de artrites infecciosas em aves são o *Mycoplasma synoviae* (MS) e o *Orthoreovírus aviário* (ARV). O presente trabalho teve por objetivo detectar a presença de MS e ARV através de técnicas moleculares, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), respectivamente, em casos de artrites em frangos e matrizes de corte. Além disso, realizou-se estudos histopatológicos das articulações com artrites e desenvolvimento de um multiplex PCR. Para o estudo foram coletadas 150 amostras de lesões atríticas de matrizes de corte e 180 amostras de frango de corte, durante o período de 2009 e 2010. Do total das 150 amostras de matriz de corte submetidas a PCR para MS, 82,6% positivas e 20% foram positivas para ARV, destas 83,3% (25/30) foram positivas tanto para o MS, quanto para o ARV. A análise das amostras de frango de corte demonstrou positividade para o MS em 58,9% das amostras e 33,9% foram positivas para o ARV. As análises das lesões histopatológica demonstraram a presença de processo inflamatório crônico na cápsula sinovial e no tendão flexor digital. O processo inflamatório foi encontrado também nas amostras de articulações que foram negativas na PCR para ambos os agentes. A multiplex desenvolvida, apresentou resultados satisfatórios, amplificando genes do MS e ARV simultaneamente. Conclui-se que a prevalência de ARV nas granjas de frango e reprodutoras esta sendo subestimada, sendo maior do que a avaliada por especialistas na área, em Santa Catarina. A elevada incidência do MS em matriz no período de abate, demonstram falhas nos programas de bisseguranças, ou mesmo firma a crença de que é praticamente impossível livrar as granjas desse patógeno.

Palavras-chaves: Artrites. PCR. *Mycoplasma synoviae*. *Orthoreovírus aviário* Multiplex-PCR.

ABSTRACT

RECK, Carolina. Detecção de *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus aviário* em lesões de artrites em frangos e matrizes de ciência Animal- Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

The infectious arthritis in broiler and breeders, represents an economic and health problem resulting in severe economical losses due to retarded growth and down grading at slaughters . The etiological agents associated with cases of infectious arthritis in avian are *Mycoplasma synoviae* (MS) and *Orthoreovirus avian* (ARV). The objective of this study was to evaluate the occurrence of MS e ARV in infectious arthritis through molecular techniques, PCR (Polymerase Chain Reaction) and RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction). In addition, we carried out histopathological studies of joints with arthritis and development of a multiplex PCR. For the study 150 samples were collected from lesions of broiler and 180 samples of breeders. MS were detected in 82.6% and ARV were 20%, in breeders. The analysis of samples of broilers showed positivity to MS in 58.9% and 33.9% of samples were positive for ARV. The histopathology analysis of joints demonstrated the presence of infiltrate of heterophils in the synovial capsule and the digital flexor tendon. The inflammatory process has also been found in samples from joints that were negative by PCR for both agents. The developed multiplex, with satisfactory results, amplifying genes from MS and ARV simultaneamente. Conclude that the prevalence of Arv in broilers farms and breeding is being underestimated, which is higher than assessed by experts in Santa Catarina. The high incidence of MS in the breeders, showed flaws in biosecurity programs.

Keywords; Arthritis. *Mycoplasma synoviae*. *Orthoreovírus aviário*. PCR . Multiplex-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do <i>Orthoreovírus aviário</i>	24
Figura 2: Inoculação experimental de MS e ARV.....	32
Figura 3: Representação dos locais de coleta de amostras.....	33
Figura 4: Fratura do fêmur pela desarticulação coxo-femural.....	42
Figura 5: Características histológicas da capsula articular de animais experimentalmente infectados com ARV e MS.....	43
Figura 6: Aspectos histológicos do pulmão de animais experimentalmente infectados com ARV e MS.....	43
Figura 7: Aspectos histológicos do pericárdio de animais experimentalmente infectados com ARV e MS.	44
Figura 8: PCR para MS.....	45
Figura 9: PCR para ARV.....	46
Figura 10: Multiplex PCR.....	47
Figura 11: Sensibilidade da PCR-MS	47
Figura 12: Sensibilidade da PCR-ARV.....	48
Figura 13: Sensibilidade da m-PCR.....	48
Figura 14: Resultados da PCR para ARV e MS das amostras de matrizes e frangos de corte.....	49
Figura 15: PCR para MS de amostras de matrizes.....	50
Figura 16: PCR para ARV de amostras de frangos de corte	50
Figura 17: Aspectos anatomopatológicos das lesões de artrite observadas em amostras de campos oriundas de plantéis de frangos de corte.....	52
Figura 18: Aspectos anatomopatológicos observadas em amostras de campos oriundas de plantéis de matrizes de corte	52
Figura 19: Características histológicas da cápsula articular de frangos de corte.....	53
Figura 20: Aspecto histológico da articulação de matriz de corte.....	53
Figura 21: Corte histológico 5 µm de articulação de frango de corte positivo na RIFI para presença de antígenos do MS.....	54
Figura 22: Corte histológico 5 µm de articulação de frango de corte positivo na RIFI para presença de antígenos do ARV.....	55
Figura 23: Sequências do ARV.....	56
Figura 23: Sequências do MS.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Segmento genômicos, proteínas codificadas e sua localização nos vírions.....	23
Tabela 2: Classificação dos sorotipos do ARV.....	24
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) para detecção do MS e ARV.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV: *Orthoreovirus aviario*

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

D :Dalton

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTP: Deoxinucleotídeos trifosfatos

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

gx : força da gravidade

HA: hemaglutinação

HE: hematoxilina e eosina

HI: haemagglutination inhibition (Inibição da hemaglutinação)

k : Kilo (10^3)

LB: meio de crescimento bacteriano "Luria – Bertani"

M: Molar ou molaridade (mol/l)

MAPA: Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

ml : Mililitro

mL: mililitro

MS: *Mycoplasma synoviae*

OIE: Organização Mundial de Saúde Animal

PCR: *Polimerase Chain Reaction*

pmol: Picomol

PI; Período de Incubação

RNA: ácido ribonucléico

SOC: *Super optimal Broth Catabolic Repressuion*

Taq: “ *Thermus aquaticus*”

U: unidades

η : Nano (10^{-9})

μ : Micro (10^{-6})

μg : micrograma

μl : microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. <i>Mycoplasma synoviae</i>	14
2.2. <i>Orthoreovírus aviário</i>	22
3. OBJETIVO GERAL	30
3.1. Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. Controles positivos	31
4.2. Infecção experimental	31
4.3. Amostragem	32
4.4. Coleta das amostras	32
4.5. Extração de DNA (<i>Mycoplasma synoviae</i>)	34
4.6. Extração do RNA (<i>Orthoreovírus aviário</i>)	35
4.7. Reação de transcrição reversa (RT)-síntese do cDNA	35
4.8. Mensuração da quantidade de DNA e RNA	36
4.9. Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)	36
4.10. Reação em cadeia pela polimerase – PCR	37
4.11. Eletroforese	37
4.12. Padronização multiplex PCR (m-PCR)	38
4.13. Sensibilidade da PCR	38
4.14. Sequenciamento dos produtos da PCR	38
4.15. Processamento histopatológico	40
4.16. Imunofluorescência indireta (RIFI)	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Infecção experimental	42
5.2. Otimização da PCR individual	44
5.3. Padronização da PCR multiplex	46
5.4. Sensibilidade da PCR	47

5.5.	PCR das amostras de campo.....	49
5.6.	Processamento histopatológico.....	51
5.7.	Imunofluorescência indireta.....	54
5.8.	Análise do sequenciamento dos clones MS e ARV.....	55
6.	DISCUSSÃO	57
7.	CONCLUSÕES	63
8.	REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira tem participação fundamental na economia nacional, pois representa o mercado de carnes com maior projeção de crescimento anual. O Brasil lidera o ranking mundial de exportação de carne de frango, sendo que em 2009 apesar da crise mundial, exportou um total 3,6 milhões de toneladas de carne de frango, com um faturamento de mais de US\$ 6,9 bilhões de dólares (UBA, 2010.)

O Estado de Santa Catarina possui uma posição de destaque na cadeia avícola, os números relacionados à avicultura são extraordinários quando comparados com outras produções. Em 2009, foram alojados em Santa Catarina, 870 milhões de pintinhos de corte e 50 milhões de matrizes (ACAV, 2010). O setor em SC é responsável por 2,5% da produção mundial de frango, abate anualmente 700 milhões aves e emprega mais de 130 mil trabalhadores entre empregos diretos e indiretos (UBA, 2010). Apesar do crescimento da avicultura industrial é necessário diminuir de forma cada vez mais efetiva as perdas durante as fases de produção, abate e processamento (GIOTTO et al., 2008).

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 (MACHADO, 2010.). Entretanto a avicultura industrial baseada na produção e manejos intensivos aumentou proporcionalmente o desafio sanitário, pois as aves estão submetidas a altas densidades populacionais, o que favorece a rápida disseminação de doenças (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

Dentre os principais problemas de ordem sanitária que causam prejuízos no abate, devido a condenações *post-mortem*, destacam-se os problemas locomotores como, as artrites e tenossinovites infecciosas (ARMENDARIS, 2006).

O impacto econômico relacionado as perdas por problemas no aparelho locomotor normalmente são subestimados, pois geralmente são consideradas apenas perdas no abatedouro, não contabilizando os descartes que ocorrem

durante o período de alojamento. Giotto et al.(2008), verificou nas condenações de frango de corte em abatedouros em Santa Catarina durante o período de 2006 a 2007, que as artrites foram a segunda maior de condenação parcial, representando uma perda econômico de mais de R\$ 130 milhões de reais para o período.

Na fase de produção dos frangos, as artrites e tenossinovites infecciosas têm como principais conseqüências a redução do ganho de peso, piora na conversão alimentar, transtornos de locomoção e determinam à eliminação dos animais devido a entidade clínica conhecida como “perdas de pernas” (JORDA et al., 2001). Em matrizes de corte as perdas estão relacionadas à diminuição da produção e eliminação de aves de alto valor zootécnico.

Como principais agentes causadores de artrites infecciosas destacam-se o *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Orthoreovírus aviario* (ARV) (BACK, 2002; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; SAIF et al., 2003). Apesar do impacto nos índices de produtividade da avicultura industrial, existem poucas informações sobre os índices de ocorrência de *Orthoreovírus aviario* e *M. synoviae*, como causadores de artrites (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). As metodologias de rotina para diagnóstico de *Orthoreovírus aviario* (isolamento) e *Mycoplasma synoviae* (isolamento e sorologia) são laboriosas ou pouco representativas. (FIORENTIN et al., 2003; VAN DER HEIDE, 2000). Além disso, devido a fatores epidemiológicos como a transmissão vertical de ambos os agentes (MS e ARV), se tornam onerosos os programas de controle e/ou tratamento (DOBSON e GLISSON, 1992; SAIF et al., 2003). Sob estas circunstâncias é imprescindível estabelecer um diagnóstico rápido de MS e ARV .

O presente estudo objetivou detectar a presença dos agentes *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus aviario*, através de técnicas moleculares como PCR e RT-PCR, respectivamente, em casos de artrites em frangos e matrizes de corte, bem como padronizar e validar a multiplex PCR como teste diagnóstico capaz de detectar os dois agentes em uma única reação de PCR. Os dados obtidos poderão ser usados como ferramenta para auxiliar na implementação dos programas de controle e prevenção de artrite infecciosa e como conseqüência reduzir perdas por condenação de carcaças no abate, pela baixa eficiência da performance produtiva e descarte de animais nas unidades de produção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Mycoplasma synoviae*

O *Mycoplasma synoviae* (MS) causa doença infecciosa, caracterizada por inflamações nas membranas sinoviais e infecções subclínicas no aparelho reprodutor e trato respiratório superior em aves e perus, conhecida por Micoplasmose aviária (BACK, 2002). O MS pertence a Classe mollicutes, ordem *Mycoplasmatales* e família *Mycoplasmataceae*. A Classe mollicutes é composta por cinco ordens, seis famílias e 14 gêneros (DWIGHT e YUAN, 1999). Os mollicutes, do grego “pele macia”, são bactérias de formato ovóide ou pleomórfico geralmente comensais, saprófitos com ampla distribuição no Reino Animal. Os representantes desta classe não possuem parede celular, provavelmente como consequência a evolução generativa (RANZIN et al., 1998). Como não possuem parede celular, tem sua estrutura externa formada por uma membrana trilaminar composta por proteínas, glicoproteínas, glicolipídios, fosfolipídio e esteróis. Embora estruturalmente classificados como Gram-negativos, coram-se de forma insatisfatória pelo método de Gram (DWIGHT e YUAN, 1999). A ausência da parede celular torna estes agentes resistentes aos antibióticos que atuam na síntese da parede celular, como o caso das penicilinas, limitando os tratamentos envolvendo antimicrobianos (DWIGHT e YUAN, 1999).

Os micoplasmas apresentam dimensões semelhantes a vírus de 0,2 a 0,4 μm , sendo considerados os menores microorganismos de vida livre conhecidos. Da mesma forma, o genoma circular de dupla fita dos mollicutes, é o menor conhecido entre os procariotos, com cerca de 770 a 800 Kpb (NASCIMENTO, 2000). A composição básica do genoma inclui pouca guanina e citosina, variando de 23 a 40% (DWIGHT e YUAN, 1999). Os ribossomos dos micoplasmas são compostos por seqüências altamente conservadas, que podem ser utilizadas como marcadores filogenéticos. A porção 5S rRNAs dos micoplasmas é menor que em outros

procariontes, enquanto a porção 16S rRNA apresenta seqüências de nucleotídeos ausentes em outras bactérias (RANZIN et al., 1998).

As espécies de micoplasmas são freqüentemente deficientes em intermediários do metabolismo energético devido a seu reduzido genoma. Esta deficiência no metabolismo, no processo celular e na produção de energia impõe um estilo de vida estritamente dependente do hospedeiro, do qual os micoplasmas adquirem a maioria de seus nutrientes (RAZIN et al., 1998).

Existem mais de vinte espécies de micoplasma que infectam aves em geral, porém apenas quatro espécies têm significado econômico na avicultura são eles: *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. melleagridis* (BACK, 2002).

O MS foi inicialmente descrito por Olson em 1954, como agente etiológico da Sinovite Infecciosa que acometia perus e galinhas, entretanto foi considerada como espécie somente em 1982 (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). A enfermidade afeta aves de todas as idades, contudo, é mais severa em aves jovens (JORDA et al., 2001).

As principais perdas econômicas causadas pela infecção pelo MS são a diminuição na produção e qualidade dos ovos, baixa eclodibilidade (altas taxas de mortalidade embrionária e pintinhos inviáveis), queda na conversão alimentar, condenação no abate e do alto custo da medicação (DUFOR-GESBERT et al., 2006). A diminuição na taxa de postura e eclodibilidade esta na ordem de 5 - 10% (NASCIMENTO, 2000).

2.2. Epidemiologia

Os micoplasmas são considerados espécie-específicos, em alguns casos infectam diferentes espécies com estreito relacionamento filogenético, como *Mycoplasma gallinsepticum* (MG) e MS que são capazes de infectar galinhas, perus e outras aves domésticas (BACK, 2002). Por via de regra, micoplasmas que infectam aves não infectam mamíferos e os micoplasmas de mamíferos por sua vez não infectam aves (DWIGHT e YUAN, 1999).

O MS acomete aves de todas as idades, contudo a infecção é mais severa em aves jovens. A transmissão pode ocorrer por via vertical e horizontal, através de aerossóis, contato direto, equipamentos, veículos e pessoas contaminados, sendo a disseminação relativamente rápida entre aves alojadas no mesmo galpão (SAIF et

al., 2003).

O MS está amplamente distribuído em vários países com produção avícola, frequentemente encontrado em granjas de matrizes e frangos de corte. Estudos recentes realizados no Brasil, demonstraram uma prevalência do agente em 72,7% dos planteis avícolas (BUIM et al., 2009). Um reservatório importante de MS são as aves de vida livre, silvestres e as chamadas galinhas de “fundo de quintal” ou de subsistência, principalmente em propriedades localizadas nos redores de matrizeiros e granjas de frangos de corte (CASTRO et al., 2006). Estudos sorológicos recentes realizados nos Estados da Bahia e São Paulo, em galinhas de “fundo de quintal”, constaram uma positividade de 88,5% e 40,6% das galinhas para MS, respectivamente (BUCHALA et al. 2006; OLIVEIRA et al., 2010).

Os micoplasmas podem sobreviver sob forma desidratada por vários dias quando protegidos da luz solar, apesar da ausência de parede celular (DWIGHT e YUAN, 1999). O microorganismo permanece viável em excrementos de galinhas por um período de um a três dias a 20°C e em gema de ovo por 18 semanas a 37°C. Sobrevive menos de 8 horas em borracha, 8 a 12 horas sobre a madeira, até 2 a 3 dias nas penas, 1 a 2 dias no solo, 51 a 77 dias, sob condições de baixa umidade a 4 °C e 10 a 21 dia á 20°C (MAROIS et al., 2005).

O MS não é estável em pH 6,8 ou abaixo, sendo sensível a temperatura superior a 39°C. Devido à ausência da parede celular, é sensível a maioria dos desinfetantes utilizados nos programas de limpeza e desinfecção convencionais, como amônia quartenária, iodo e fenóis (NASCIMENTO, 2000).

Landman e Feberwee (2004), demonstraram a disseminação via aerossóis do MS, onde após aspersão de MS, 31,5% das aves apresentaram quadros de artrite. Neste mesmo estudo também demonstraram que aves contaminadas com o vírus da bronquite infecciosas das galinhas, apresentaram maior índice de artrite (50%).

2.3. Fatores de virulência e patogenia

Os micoplasmas se aderem intimamente a parede celular, principalmente do epitélio das serosas e mucosas do hospedeiro, causando doenças crônicas ou infecções de longa duração. O MS tem tropismos pelas diferentes serosas e mucosas, produzindo quadros de sinovites, associadas ao sistema locomotor (articulações) e ao trato respiratório (NASCIMENTO, 2000).

O período de incubação (PI) varia de acordo com a virulência da cepa, via de inoculação, fatores estressantes e forma de transmissão. Normalmente o PI é de 11 a 21 dias, entretanto em pintinhos contaminados através da via vertical o PI pode ser mais curto (JORDA et al., 2001).

Devido a ausência da parede celular o MS possui membrana plasmática tríplice composta de proteínas, glicoproteínas, glicolípídeos e fosfolípídeos. Estes elementos estruturais constituem os principais determinantes antigênicos, capazes de ativar e sensibilizar o sistema imune do hospedeiro, induzindo tanto uma resposta humoral quanto celular. Além disso, podem atuar como fatores tóxicos e mitogênicos (GYLES et al., 2004; RAZIN et al. 1998). São capazes de ativar macrófagos, desempenhando assim um papel importante na indução da produção de citocinas e, conseqüentemente, modulação da resposta inflamatória durante a infecção (CHAMBAUD et al., 1999).

As adesinas são o principal fator de virulência dos micoplasmas, sobretudo as hemaglutininas, responsáveis por sua adesão a hemácias (DWIGHT e YUAN, 1999; GYLES et al., 2004;). As adesinas permitem a fixação e colonização pela bactéria às superfícies serosas e mucosas. A perda da capacidade de aderência, por mutação ou modificação de genes que codificam para adesinas, resulta na perda da capacidade para produzir a infecção (BENCINA, 2002).

A proteína VhIA, codificada pelo gene *vhla*, é uma importante lipoproteína de superfície, antigênica e potencialmente hemaglutinante, sendo produzida em grande quantidade durante a infecção pelo MS (HONG et al., 2004). A VhIA é expressa como uma única proteína, entretanto sofre uma clivagem pós traducional dando origem a outras duas proteínas distintas, a MSPA (Major Surface Protein A) e a MSPB (Major Surface Protein B), ambas envolvidas nas atividades de hemaglutinação (HA) e hemadsorção (HAD) (HONG et al., 2004; NOORMOHAMMADI et al., 1997).

Os micoplasmas são mais suscetíveis a mutações que outras bactérias, isso pode ser explicado pela deficiência no sistema de reparo do DNA. As modificações freqüentes nos antígenos de superfície facilitam a evasão do micoplasma da ação sistema imune do hospedeiro, favorecendo sua sobrevivência e a infecção, principalmente quando aderido a célula (NASCIMENTO, 2000).

2.4. Sinais clínicos

As principais articulações afetadas, na infecção pelo MS, são tibiotaláricas, bolsas esternais e plantares. Pintinhos oriundos de matrizes infectadas, possivelmente apresentarão sinovite, estando a manifestação clínica nestes, associada à exposição a fatores estressantes e de manejo, como super lotação e má qualidade de cama do aviário (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; SAIF et al. 2003).

Durante o curso da doença as aves apresentam estertores respiratórios, sinovite com aumento das articulações, edema, principalmente no coxim plantar e articulação tíbio-tarso-metatarso, com acúmulo de exsudato seroso nos espaços articulares com conseqüente claudicação, letargia, e perda de peso (JORDA et al., 2001) . De um modo geral, em função da dificuldade de locomoção e de se manter em pé, as aves desenvolvem escaras de decúbito peitoral ou bursite esternal. Podem ocorrer infecções secundárias por *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp , agravando o quadro de artrite (NASCIMENTO, 2000). Algumas aves, apesar da infecção, podem não desenvolver a doença.

A infecção do trato respiratório quando ocorre infecção secundária por *Escherichia coli* é denominada aerossaculite silenciosa. Neste caso, há um agravamento do quadro e as perdas tende a ser muito mais expressivas (BACK, 2002).

Estudos recentes indicam que em plantéis de matrizes infectadas, as perdas estão associados a diminuição na produção de ovos e a uma síndrome conhecida como EAA - “eggshell apex abnormalities”, que se caracteriza por uma alteração (mancha) à ovoscopia, devido a fragilidade da casca na região da câmara de ar. A queda na produção de ovos esta estimada em 3% ao dia (FEBERWEE et al. 2010).

2.5. Lesões

Na necropsia, observa-se inflamação das articulações, com acúmulo de exsudato viscoso nas membranas sinoviais e tendões, principalmente da articulação tibiotalárica, tarsometatarsica e coxim plantar (BACK, 2002). Com a progressão da doença, o exsudato pode tornar-se caseoso e estende-se aos sacos aéreos e músculos adjacentes. Órgãos como rins e coração também podem ser acometidos (SENTES-CUE et al., 2005). As articulações das asas e bolsa do esterno, mesmo

com menor frequência, também podem apresentar lesões.

Lesões como hepatomegalia, esplenomegalia, rins edemaciados e pálidos, podem estar presente em menor grau de ocorrência (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). Sent Es-cue et al. (2005), também relataram infecção sistêmica causada por MS, com lesões na bolsa de Fabricius, baço, traqueíte, pericardite, hepatite e nefrite.

Microscopicamente nas lesões de artrite observa-se depósito de fibrina com acúmulo de heterófilos nos espaços sinoviais com infiltração de linfócitos e macrófagos (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). A sinovite é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias para dentro da cavidade articular, podendo ocorrer neovascularização, hiperplasia e hipertrofia das células que compõem a membrana sinovial. As membranas sinoviais, podem encontrar-se com formação de vilos e infiltração difusa a nodular, de linfócitos e heterófilos, que também podem ser observados nos tendões flexor digital e no extensor do metatarso 7 dias após a infecção (LOCKABY et al., 1998).

Na traquéia e nos sacos aéreos podem ser observados infiltrados de linfócitos e heterófilos (SAIF et al., 2003).

2.6. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico para a infecção pelo MS pode ser realizado por de provas sorológicas através de ensaios de soroaglutinação rápida (SAR) e imunoensaios como teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). O diagnóstico definitivo pode ser realizado através do teste de inibição da hemoaglutinação (HI), isolamento bacteriano e a técnica de PCR (GRASHOFF et al., 1995; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

A resposta imune humoral típica de uma ave começa com a produção de IgM, três e cinco dias após a infecção, seguido pela produção de IgG, 15 á 21 dias após o início da infecção (NASCIMENTO, 2000; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

A SAR é usada como procedimento sorológico inicial para aferir plantéis de aves livres de MS por ser rápido e simples, mas se caracteriza pela baixa especificidade devido ao aparecimento de falsos positivos e falsos negativos, indicado somente para procedimentos de triagem (FIORENTIN et al., 2003; NASCIMENTO, 2000). Além disso, na SAR podem ocorrer reação antigênica cruzada entre MG e MS, pois apresentam determinantes antigênicos similares

(REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; SANTOS et al., 2007a). Outras bactérias como o *Staphylococcus aureus* podem induzir reações falso positivas na SAR (KLEVEN , 1999). Reações de falso negativo constituem motivo de preocupação, pois uma vez não detectado, a população infectada permanece como uma fonte de infecção, dificultando o controle sanitário (FIORENTIN et al., 2003).

O teste de HI fundamenta-se na capacidade de alguns microrganismos apresentarem, em sua superfície, estruturas capazes de se combinarem com receptores específicos, presentes na superfície das hemácias, as hemaglutininas. Já o teste de ELISA detecta níveis de IgG circulantes. Atualmente estão disponíveis diversos Kits com ótimos índices de sensibilidade e especificidade, porém reações não específicas ainda podem ocorrer em se tratando de títulos mais tardios (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

O isolamento bacteriano tem suas limitações, pois dos representantes do gênero *Mycoplasma* spp. o MS é considerado o de maior dificuldade para o cultivo, devido a exigência de meios complexos com NAD (*adenina nicotinamida dinucleotídeo*) e tempo de replicação da bactéria (DWIGHT e YUAN, 1999). Nas análises bioquímicas o MS fermenta glicose e maltose, não fermenta lactose e é fosfatase negativo (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). As dificuldades de isolamento são maiores quando o quadro clínico do animal é crônico, onde há um número reduzido de bactérias viáveis devido o controle da infecção pelo sistema imune.

O emprego de técnicas baseadas na PCR para diagnóstico de MS tem sido cada vez mais utilizadas centros especializados, permitindo detectar micoplasmas com alta sensibilidade e especificidade sem a necessidade de isolamento (FIORENTIN et al., 2003). A PCR baseia-se na amplificação de sequências específicas de determinados genes. O principal alvo de amplificação é fragmento 16S rRNA, uma região altamente conservada com baixos níveis de variação genética. Outros genes atualmente também estão sendo utilizados em pesquisas como *vlhA* e 23S rRNA (DOMAŃSKA-BLICHARZ, 2009).

Estudos avaliando as diferentes técnicas de diagnóstico para MS constataram que a PCR é a mais sensível, possibilitando a detecção do agente e infecção mais precocemente que outras provas como o isolamento bacteriano, SAR e HI (FIORENTIN et al., 2003; POURBAKHS et al., 2010).

2.7. Tratamento e Controle

Uma vez os micoplasmas introduzidos na granja é difícil sua eliminação, requerendo na maioria das vezes um período de vazio sanitário para o sucesso da erradicação do agente (FIORENTIN et al, 2005). Os micoplasmas são sensíveis a maioria dos desinfetantes utilizados na avicultura, bem como aos antimicrobianos que interferem na síntese dos aminoácidos, ácidos nucléicos e metabolismo dos lipídios (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). Mesmos utilizando tratamentos com antimicrobianos em lotes positivos, é difícil erradicar o MS do galpão sem a implantação de um rígido programa de limpeza, desinfecção e vazio sanitário (NASCIMENTO, 2000).

O controle e monitoramento das micoplasmoses para aves reprodutoras estão contemplados no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, onde a Instrução Normativa nº 44 de 23 de agosto de 2001, regulamenta Normas Técnicas para o Controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. melleagridis*) (Brasil, 2001). A certificação negativa ocorre para lotes com resultados negativos em 10 amostras de soros testadas por SAR em aves com 12 semanas de vida e consecutivamente a cada três meses são realizadas monitorias de 150 amostras por núcleo. Quando os resultados são positivos no HI ou ELISA, a confirmação deve ser realizada por cultivo e/ou PCR (BRASIL, 1999). Os estabelecimentos avícolas de reprodução devem ser livres de *M. gallisepticum* e livres ou sob vigilância e acompanhamento para *M. synoviae*, desta forma é essencial o controle rigoroso do programa de biossegurança destes estabelecimentos.

2.2. *Orthoreovírus aviário*

O *Orthoreovírus aviário* (ARV), também denominado de reovírus devido a primeira classificação *Respiratory Enteric Orphan*, está associado a duas importantes manifestações clínicas nas aves, a artrite viral e a síndrome de má absorção, que causam grandes perdas para a avicultura industrial (BACK, 2002).

A artrite viral vem ganhando destaque na avicultura atual, por agir de forma negativa na cadeia produtiva. Transtornos locomotores como artrites e tenossinovites infecciosas são uns dos principais problemas de origem sanitária que ocasionam redução nos índices produtivos dos frangos e prejuízos no abate devido a condenações (MORETTI, 2006). As principais perdas econômicas causadas pelo ARV, estão relacionadas com o descarte de aves, mortalidade, piora da conversão alimentar, gastos com programa de prevenção/controle e condenação no abate (DOBSON e GLISSON, 1992).

O agente ARV foi descrito pela primeira vez em 1957 por Olson e colaboradores, que isolaram de galinhas com quadro de tenossinovite infecciosa um agente não sensível a clortetraciclina e furazolidona, denominado de “*agente da artrite viral*”. A caracterização e identificação do agente como reovírus só ocorreu em 1972, por Walke e colaboradores. No Brasil, o primeiro isolamento foi realizado por Bottino em 1975, em galinhas de postura e frangos de corte com processos inflamatórios articulares.

O *Orthoreovírus aviário* é um RNA vírus de fita dupla, não envelopado, icosaédrico, com aproximadamente 85 nm de diâmetro (FLORES et al., 2007). Pertence a família *Reoviridae*, gênero *Orthoreovirus*. Seu genoma viral pode ser separado em três classes de acordo com o tamanho em grande (large =L), médio (medium= M) e pequeno (small = S). A composição do genoma inclui, três segmentos grandes (*large*, L1, L2, L3), três segmentos médios (*medium*, M1, M2, M3) e quatro segmentos pequenos (*small*, S1, S2, S3, S4). O genoma viral codifica 12 proteínas, oito delas são estruturais e quatro não-estruturais, identificadas por letras gregas, de acordo com a classe de segmentos genômicos e consequentemente, suas respectivas massas moleculares (BENAVENTE e MARTINEZ-COSTA, 2007). As proteínas estruturais (λA , λB , λX , μA , μB , σA , σB e σC), constituem o capsídeo interno e externo, são produtos primários de tradução dos seus mRNAs codificados

(Tabela 1) (BENAVENTE e MARTINEZ-COSTA, 2007). As proteínas não estruturais estão presentes apenas nas células infectadas, desempenham importantes funções enzimáticas e regulatórias durante o processo de replicação viral (FLORES et al., 2007).

Tabela 1: Segmento genômicos, proteínas codificadas e sua localização nos vírions.

SEGMENTO	DENOMINAÇÃO	LOCALIZAÇÃO
L1	λA	Capsídeo interno
L2	λB	Capsídeo interno
L3	λC	Superfície, proteína de ligação com RNA
M1	μA	Capsídeo interno
M2	$\mu B, \mu BN, \mu BC$	Capsídeo externo, função na penetração e ativação da transcriptase
M3	$\mu NS ; \mu NSC, \mu NSN$	Não estrutural, liga-se ao RNA, ativa a transcrição secundária ; Não estrutural
S1	σC p10 p17	Capsídeo externo, ligação á célula; Não estrutural; permeabilidade, fusão; Não estrutural, retarda ciclo celular
S2	σA	Capsídeo interno, liga-se ao RNA, resistência ao IFN
S3	σB	Capsídeo externo.
S4	σNS	Não estrutural, liga-se no RNA

Fonte: BENAVENTE e MARTINEZ-COSTA, 2007.

A capacidade fusogênica dos reovírus tem sido alvo de estudos, onde demonstraram que essa capacidade é atribuída a proteína p10 (não estrutural), codificada pelo segmento S1 (BODÉLON et al., 2001). A proteína p17 está relacionada com alteração do ciclo celular, estudos recentes relatam que a p17 regula a proliferação celular através da ativação da p53 e p21 (BENAVENTE e MARTINEZ-COSTA, 2007).

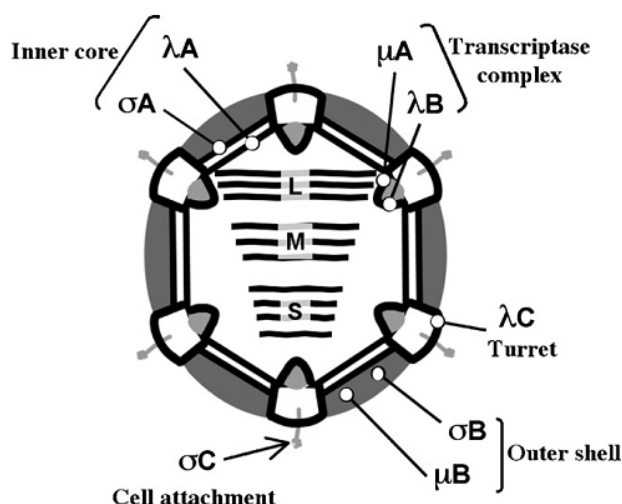


Figura 1: Representação esquemática *Orthoreovírus aviário*.

Fonte : BENAVENTE e MARTINEZ-COSTA, 2007

A classificação do ARV em sorotipos é baseada na expressão de antígenos específicos, padrões sorológicos e características de patogenicidade. Atualmente são descritos 11 sorotipos do vírus em aves, sendo os mais comumente diagnosticados: 2408; S1133 e o 1733 (Tabela 2). Destes, o S1133 está mais relacionado aos problemas de artrites e tenossinovites, o 2408 associado à síndrome da má absorção e o 1733 atua em ambos problemas (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; VAN DER HEIDE, 2000;).

Tabela 2: Classificação dos sorotipos do ARV .

Sorotipos	Associado	Patogenicidade
S1133	Artrite	Media
2408	Síndrome da má absorção, artrite	Alta
2035	Síndrome da má absorção, artrite	Media
2177	-	Não patogênico
1733	Síndrome da má absorção, artrite	Alta
3005	Fragilidade óssea	Média

Fonte: REVOLLEDO e FERREIRA, 2009

O ARV é resistente ao calor, capaz de resistir a 60°C por 8 a 10 horas, 56° por 22 a 24 horas, a 37°C por 15 semanas e a -20° por quatro anos. Também são

resistentes ao pH 3, formalina a 3%, lisol, esta característica deve-se ao fato do ARV não possuir envelope (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009). Savage e Jones (2003), demonstraram a estabilidade das partículas virais em insumos e resíduos de granja, nos quais o vírus permanece infectantes por dez dias em penas, na madeira, na ração e na superfície das casacas de ovos com a presença de material fecal. Na água, os vírions podem sobreviver por até dez semanas, perdendo pouca capacidade infecciosas (SAVAGE e JONES, 2003). São sensíveis ao etanol 70%, iodo orgânico a 0,5%, peróxido de hidrogênio a 5%, hipoclorito de sódio e a luz ultravioleta (SAIF, et al, 2003).

2.3. Epidemiologia

O agente ARV esta amplamente difundido nas granjas avícolas sendo relatado em diversos países com avicultura moderna (ROSENBERGER e OLSO, 1991). A transmissão ocorre tanto pela via vertical como através da via horizontal. A transmissão horizontal pode ocorrer de forma direta ou indireta, no entanto, há uma variação considerável entre as cepas virais, no que refere-se a capacidade de propagação (VAN DER HEIDE, 2000). Aves positivas excretam o agente pela via respiratória e pelas fezes, fonte primária de infecção para as outras aves, pois o ARV pode persistir por longos períodos nas tonsilas cecais (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

A transmissão através da via vertical foi demonstrada primariamente por Menendez e colaboradores em 1975, que verificaram índices de transmissão relativamente baixos, próximo a 1,7%. O vírus multiplica-se na membrana córioalantóide dos ovos embrionados de galinha (ROSENBERGER e OLSON, 1991).

Aves jovens são mais susceptíveis do que as aves adultas, sendo que a susceptibilidade a infecção pelo ARV diminui de forma linear conforme a idade aumenta. Em aves adultas a enfermidade é menos intensa e o período de incubação é mais prolongado (JONES e GEORGIU, 1984). No entanto, essa resistência se torna menor quando o vírus é inoculado diretamente, como por exemplo através de feridas ou lesões nos coxins plantares (TAKASE et al., 1984; JONES E GEORGIU, 1984).

A morbidade pode ser alta, atingindo 100%, já mortalidade é de 6 %, em alguns

casos pode chegar até 10%, o vírus pode persistir nos tendões dos animais infectados por pelo menos 22 semanas (REVOLLEDO e FERREIRA).

2.4. Patogenia

O período de incubação esta diretamente relacionado com a porta de entrada do ARV, ao sorotipo viral envolvido e a idade da ave, variando de 7 a 11 dias. Quando ocorre inoculação via coxim plantar, o período de incubação pode ser de apenas um dia (ROSENBERGER e OLSO, 1991). Pintinhos recém nascidos, infectados pela via vertical mantém o vírus em diferentes órgãos e tecidos, principalmente no fígado e intestino, transmitindo, via fezes ainda no incubatório para outros pintinhos já nas primárias horas após o nascimento (SAIF et al., 2003).

A replicação inicial do vírus ocorre na mucosa do trato digestivo e respiratório no período de 24 a 48 horas ocorre a viremia e ampla distribuição do agente para outros tecidos como tendões, tecidos linfóides, oviduto, persistindo nas tonsilas cecais e articulações (REVOLLEDO E FERREIRA, 2009; VASCONCELOS et al., 2001b). Jones et al. (1989), detectaram a presença de partículas virais no fígado e rins de frangos, seis horas após a inoculação experimental, demonstrando a ocorrência de viremia nas primeiras horas após a infecção. Assim que chega ao fígado, o ARV se replica nos hepatócitos, ocasionando a degeneração vacuolar e necrose, observadas uma semana após a inoculação (VASCONCELOS et al., 2001b; JONES et al., 1984). NI e KEMP (1995), também observaram a presença ARV após quatro dias da inoculação no coração, rins e articulações.

As lesões causadas pelo ARV não se limitam a quadros de tenossinovite e artrite, mas também estão associadas a distúrbios entéricos e respiratórios, hepatite, hidropericárdio, miocardite, pericardite e pancreatite (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; ROSENBERGER e OLSO, 1991). As lesões entéricas e no pâncreas levam ao decréscimo das enzimas pancreáticas e alterações no metabolismo hepático, que por sua vez causa má utilização dos nutrientes e conseqüentemente, doenças nutricionais secundárias (NI e KEMP, 1995).

2.5. Sinais Clínicos

Clinicamente as aves acometidas pelo ARV, apresentam um aumento do

volume dos membros pélvicos uni ou bilateral, devido ao edema e a proliferação de tecido conjuntivo fibroso e ósseo, principalmente na articulação tíbiotarso com o metatarso (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

Com o progresso da doença as aves apresentam severa dificuldade de locomoção devido à inflamação causada pela artrite e a sinovite. As aves com lesões apóiam-se no tarso, caracterizando um quadro denominado “perda de pernas”. Em casos mais severos, pode haver ruptura do tendão gastrocnêmico. Também é possível observar edema do tendão flexor digital. (ROSENBERGER e OLSO, 1991)

Em frangos de corte, devido a dificuldade de locomoção, ocorre redução do ganho de peso e piora da conversão alimentar (SAIF et al., 2003). A presença de outros agentes infecciosos como *E.coli*, *Mycoplasma synoviae* e *Staphylococcus aureus* podem agravar o quadro de artrite e aumentar consideravelmente os índices de mortalidade (BACK, 2002, REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

2.6. Lesões

Macroscopicamente observa-se inchaço nos tendões e nas articulações, podendo haver ruptura do tendão gastrocnêmico. A articulação pode conter pequena quantia de exsudato amarelo ou tingido de sangue e em alguns casos exsudato caseoso (JONES et al., 1989). Hemorragias puntiformes (petéquias) podem ser observadas nas membranas sinoviais, assim como pequenas erosões desenvolvem-se na cartilagem articular distal do tibiotarso (ROSENBERGER e OLSO, 1991).

No exame histopatológico observa-se nas articulações e áreas adjacentes, edema, necrose coagulativa, acúmulo de heterófilos, infiltrados perivascular de linfócitos e mononucleares (JONES et al., 1989; VASCONCELOS et al. 2001a). O aparecimento de infiltrado inflamatório com a presença de heterófilos e células mononucleares nas bainhas tendinosas, são características da fase aguda da doença (ROSENBERGER e OLSO, 1991).

Com a evolução da doença ocorre a formação de projeções vilosas na membrana sinovial, devido à hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais e periostite (VASCONCELOS et al. 2001a). A proliferação de tecido conjuntivo, formação de folículos linfóides e hiperplasia das células da membrana sinovial, caracterizam a fase de cronificação do processo articular. Há invasão de tecidos fibroso sobre os tendões, resultando em fibrose crônica, e conseqüentemente

instalação de metaplasia óssea e anquilose com imobilização do membro afetado (NI e KEMP, 1995; VASCONCELOS et al. 2001b). O tropismo do ARV e sua capacidade de replicação em fibroblastos são responsáveis pelas lesões observadas nos tendões nas fases crônicas da doença. Erosões na cartilagem articular são acompanhadas por um *pannus* de granulação, havendo atividade osteoblástica que produz áreas de osteoneogênes (ROSENBERGER e OLSO, 1991).

Lesões histológicas são bem evidentes em outros órgãos como no fígado onde é possível observar necrose hepática focal, vacuolização e regeneração de hepatócitos em decorrência da multiplicação do reovírus nos hepatócitos. Lesões no coração também é um achado frequente, no qual é possível observar infiltrado heterofílico, em alguns casos acompanhado de proliferação de células mononucleares (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo de ARV pode ser realizado com base nas lesões, sinais clínicos e histórico do lote. A confirmação do diagnóstico é realizada através do isolamento viral em ovos embrionados no saco da gema ou membrana córioalantóide (MCA). Via saco da gema resulta em morte embrionária entre o terceiro ao quinto dia após a inoculação, já a multiplicação do vírus na MCA resulta em formação de placas necróticas, com morte embrionária sete a oito dias pós-inoculação (REVOLLEDO e FERREIRA, 2001; ROSENBERGER e OLSO, 1991) .

Em cultivo celular o vírus replica-se em fibroblastos, rim, fígado e pulmão de galinha. Também podem ser utilizadas células de linhagem contínua como células VERO, BHK, GBK, RK. No cultivo celular o efeito citopatogênico é caracterizado pela formação de sincícios (GUNERATNE et al., 1982) .

O *Orthoreovírus aviário* pode ser diferenciado com facilidade de outros vírus, devido as suas características físico-químicas e presenças de grupo de antígenos específicos, que podem ser identificados através de ensaios de precipitação em Agar gel (AGP) (REVOLLEDO e FERREIRA, 2001).

A técnica de RT-PCR destaca-se como um método rápido e eficiente que pode ser utilizada com segurança para a detecção e diagnóstico do ARV. Os primers normalmente utilizados correspondem a sequências do gene S1, do sorotipo S1133 (HUNG et al., 2004).

Testes sorológicos como vírus neutralização e teste de ELISA também podem ser utilizadas para fins de diagnóstico, monitoramento ou triagem de planteis para infecção pelo ARV (LORENZINI et al., 1996; VAN DER HEIDE, 2000).

A patogenicidade das amostras pode ser determinada inoculando-se o vírus no coxim plantar de pintinhos tipo SPF (specific pathogen free) de 1 dia de idade. Amostras altamente patogênicas induzem intensa reação inflamatória 72 horas após a inoculação (ROSENBERGER e OLSO, 1991).

2.8. Prevenção e Controle

Não existe tratamento específico para infecção por ARV, por isso é fundamental trabalhar ferramentas de prevenção e controle da doença. Atualmente existem vacinas comerciais disponíveis no mercado, em sua grande maioria atenuadas, provenientes das sementes preparadas a partir da amostra S1133wt, isolada nos Estados Unidos (VAN DER HEIDE, 2000). A amostra S1133wt, quando no curso de uma infecção normal, causa um quadro clínico severo de artrite/tenossinovite, com moderada taxa de mortalidade (GOUVEA et al., 1983).

O uso destas vacinas em pintinhos de um dia de idade vai depender de sua atenuação, pois as mesmas induzem a formação de interferon em grande quantidade e isto faz com que a resposta a outras vacinas, em especial a de Marek fique prejudicada, dificultando a utilização da vacina em frango de corte (REVOLLEDO e FERREIRA, 2001).

A vacinação em reprodutoras é um método eficaz de controle, mas sua proteção é limitada a sorotipos homólogos. Nos pintinhos, a resistência natural aumenta com a idade à medida que a imunidade passiva diminui, por isso são necessários altos títulos nas reprodutoras para que não ocorra uma “falha” nesse equilíbrio, ou seja, aves com baixa imunidade passiva tornam-se susceptíveis à infecção antes de desenvolverem imunidade ativa (ROSENBERGER e OLSO, 1991).

Mesmo sendo um método eficaz para controle da reovirose em reprodutoras, a vacinação deve ser aliada a medidas de biosseguranças, limpeza e desinfecção que possibilitam a diminuição da pressão de infecção.

3. OBJETIVO GERAL

Detectar a presença dos agentes *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus aviário*, através de técnicas moleculares como PCR e RT-PCR, respectivamente, em articulações de frangos e matrizes de corte, com artrite, condenadas em abatedouros do Estado de Santa Catarina.

3.1. Objetivos específicos

- Diagnosticar *Mycoplasma synoviae* através da técnica de PCR.
- Diagnosticar *Orthoreovírus aviário* através da técnica de RT-PCR.
- Estudo histopatológico das articulações com artrites condenadas no abate.
- Estimar a incidência do MS e ARV em articulações com artrites condenadas no abate no Estado de Santa Catarina.
- Padronização Multiplex PCR para detecção de *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus aviário*. .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores - LABHEV e no Laboratório de Histologia Animal, ambos localizados no Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/UDESC, município de Lages-, SC.

4.1. Controles positivos

Como controles positivos foram utilizados amostras de DNA de MS cedidas gentilmente pela pesquisadora Dra. Clarissa Silveira Luiz Vaz (Embrapa Suínos e aves/Concórdia-SC) e cepa TS-11 presente na vacina viva Mycovax[®] doada pela empresa Merial[®]. Para o controle positivo do ARV, foi utilizada a cepa vacinal, amostras estirpe S1133 presente na vacina viva “Artrit-vet[®]”, gentilmente doadas pela Empresa Biovet[®].

4.2. Infecção experimental

Com o objetivo de padronizar a metodologia de coleta de material, acondicionamento das amostras e protocolo para as técnicas de PCR, realizou-se a infecção experimental mista de MS e ARV em frangos de corte. Foram utilizados 16 frangos com 10 dias de idade, alojados em cama, com fornecimento de ração e água *ad libitum*. A inoculação foi realizada utilizando amostras atenuadas de MS contendo aproximadamente $0,8 \times 10^6$ CFU da cepa TS11 de MS, através da via intranasal e podal e uma suspensão de ARV contendo $10^{4.8}$ DICT50 (Dose infectante em cultura de tecido 50%) /0,05 ml, através da via oral e podal, por três dias consecutivos (Figura 2). Após quatro semanas realizou-se a eutanásia e necropsia das aves seguido da coleta das amostras. Foram colhidos pulmões/sacos aéreos, fígado, baço, suabes do líquido sinovial (articulação tibiotarso), membrana sinovial e tendão flexor digital. As amostras foram coletadas fracionadas em três alíquotas, conservadas em nitrogênio líquido, sob refrigeração e em formalina a 10% tamponada.

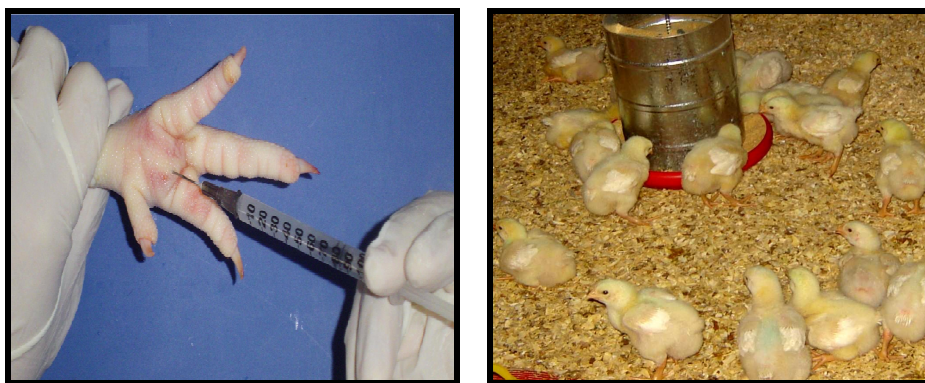


Figura 2: Inoculação experimental de MS e ARV. (a) inoculação no coxim plantar de $0,8 \times 10^6$ CFU da cepa TS11 de MS e $10^{4.8}$ DICT50/0,05 ml da cepa S1133 de ARV. (b) Pintinhos no box de experimentação.

4.3. Amostragem

A determinação do tamanho da amostra foi baseada em conceitos estatísticos e epidemiológicos, considerando a população de matrizes e frangos de corte como “infinita”, devido ao grande número de aves alojadas no Estado de Santa Catarina. Para esse estudo, o cálculo do número de amostras foi baseado considerando a representatividade para o ARV, devido a sua menor incidência. Como não há dados epidemiológico do agente no Brasil, considerou-se a incidência de 2% descrita por SAIF et al. (2003) e ROBERTSON et al. (2008), utilizando a metodologia proposta por De Canno e Roe (in THUSFILD, 2003), para uma população infinita (n), com 95% de confiabilidade, sendo o número mínimo de amostras necessárias, 149. Dessa forma, coletou-se 150 amostras de matrizes de corte e 180 amostras de frangos de corte, totalizando um total de 330 amostras. As amostras foram coletadas por ocasião do abate em abatedouros localizados nas regiões meio-oeste, norte e sul do Estado de Santa Catarina

4.4. Coleta das amostras

As amostras utilizadas nesse projeto foram coletadas durante o período de

2009 e 2010, provenientes de dois abatedouros de matrizes e quatro abatedouros de frango de corte, localizados nas regiões no meio-oeste, norte e sul do Estado de Santa Catarina (Figura 3).

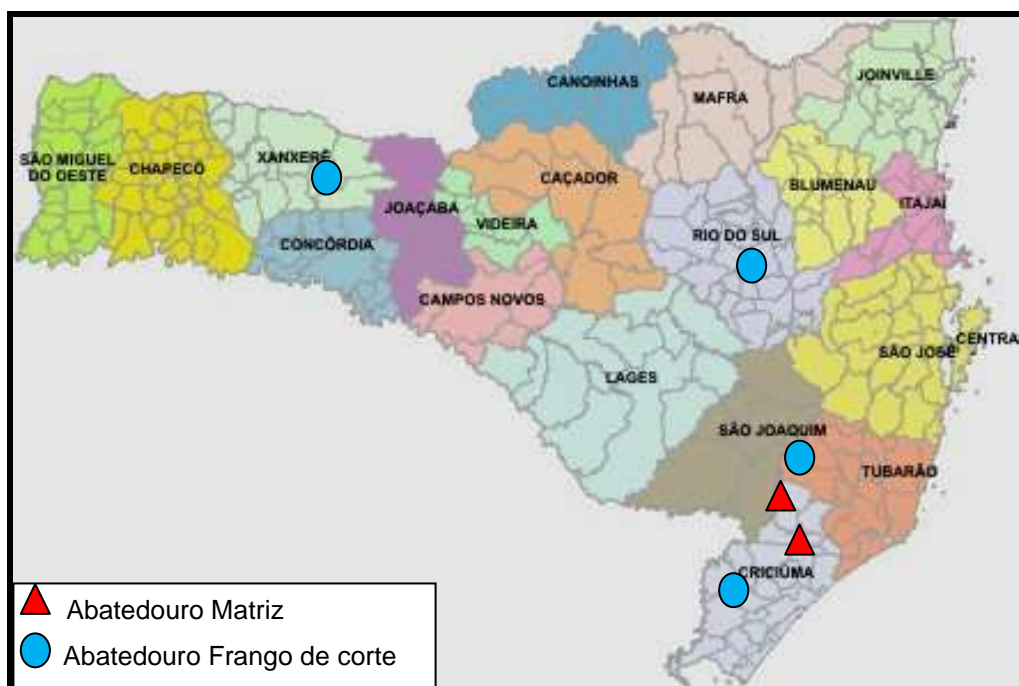


Figura 3: Representação dos locais de coleta de amostras.

Tanto nos abatedouros de matrizes, quanto nos de frango de corte, os critérios para a coleta das amostras foram articulações com artrite ou problemas locomotores, condenadas pelos Médicos Veterinários do Serviço de Inspeção.

Nos abatedouros de frango de corte, o volume diário de abate variava entre 12.000 a 125.000, devido ao grande número de aves abatidas, o volume de articulações condenadas era muito elevado. Os frangos abatidos tinham idade média de 42- 45 dias, já as matrizes estavam na fase de descarte, com idades próximas a 66 - 67 semanas.

As articulações condenadas eram seqüestradas para uma sala separada da linha de abate, onde se procedia à coleta da membrana sinovial, suabe do líquido sinovial, tendão e fragmentos da articulação. Cada amostra foi aliqüotada e acondicionada em: criotubos de 2 mL e imediatamente submersa em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C em botijão portátil; os suabes do líquido sinovial das articulações eram mantidos em PBS pH 7.2, e acondicionados em caixa

isotérmicas com gelo reciclável. Para as análises histopatológicas, fragmentos da articulação tibiotársica, foram fixados em formalina a 10% tamponada.

4.5. Extração de DNA (*Mycoplasma synoviae*)

Todos os procedimentos foram realizados em capela de exaustão de gases, utilizando os equipamentos de proteção individual (EPIs) necessários. Foram testados dois protocolos de extração de DNA: Protocolo 1 - extração térmica e Protocolo 2 - extração pelo fenol-clorofórmio. A extração foi realizada diretamente de amostras de articulação (suabe de líquido sinovial e fragmentos da cápsula articular) obtidos a campo e provenientes de animais experimentalmente infectados.

a) Protocolo 1- Térmico.

O protocolo térmico foi realizado conforme descrito por Fan et al. (1995). Resumidamente, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 100µL de PBS pH 7,2. Este procedimento foi repetido duas vezes. O pellet formado foi ressuspendido em 25µl de PBS e incubado em banho-maria a 100°C por 10 min. Em seguida foi colocado no gelo por 5 minutos, e submetido a uma nova centrifugação a 10.000xg por 6 min. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C.

b) Protocolo 2: Fenol –clorofórmio

As amostras de tecidos foram ressuspendidas em tampão de lise (10mM Tris pH 7,4, 10mM NaCl, 25mM EDTA, 1% SDS), com 100µg/ml de Proteinase K e incubados a 42°C por 12 horas. Após este período foram realizadas três lavagens com fenol, fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio e realizado a centrifugação a 14.000g por 10 minutos, desprezando o sobrenadante. O DNA extraído foi precipitado com isopropanol e, logo após, lavado com etanol 70%. O álcool foi descartado, restando o precipitado no fundo do microtubo, que permaneceu aberto a temperatura ambiente para completa secagem. Após completa secagem, o DNA resultante foi eluído em 50µl de água Milli-Q livre de RNase e mantido a -20°C.

4.6. Extração do RNA (*Orthoreovírus aviário*)

Todo o procedimento de extração do RNA foi realizado em capela de exaustão de gases, obedecendo rigorosas regras de biossegurança para a manipulação de produtos químicos. Além disso, todo o material utilizado foi previamente tratado com dietil pirocarbonato 0,1% (DEPC), a fim de diminuir a contaminação dos materiais com possíveis RNases. Para a extração de RNA foi utilizado o método do Trizol[®] (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Em suma, um fragmento de aproximadamente 100mg de tecido, foi homogeneizado em um microtubo de 1,5mL com 1,0mL de Trizol[®] e incubado à 15-30°C por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado 200µL de clorofórmio, homogeneizado por 15 segundos em agitador do tipo vórtex e incubando em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente procedeu-se a centrifugação do material à 12.000xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5mL e adicionado 500µL de isopropanol e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente para a precipitação do RNA. Após a precipitação, seguiu-se nova centrifugação a 12.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75%. O pellet foi secado a temperatura ambiente e o RNA ressuspendido em 50µL de água livre de RNase. Para finalizar, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 60°C e em seguida armazenadas a -20°C.

4.7. Reação de transcrição reversa (RT)-síntese do cDNA

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se o kit comercial “*Protoscript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis* (Biolabs[®])” seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi constituída em duas partes, a transcrição reversa e a amplificação propriamente dita. Na primeira fase adiciona-se em um microtubo 6µl do RNA extraído das amostras, 2µl *Random Primer Mix*, totalizando um volume de 8µl. Seguiu-se a desnaturação a 75°C por 5 minutos. Na segunda fase adicionou-se ao microtubo, 10µl de *M-MuLV Reaction Mix* e 2µl *M-MuLV Enzyme Mix*, obtendo um volume final de 20µl. Seguiu-se uma nova incubação no termociclador a 25° por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e no final 80°C por 5

minutos. O produto final foi eluído em 20µl de água Milli-Q, obtendo um volume final de 50µl, armazenado a -20°C até o momento do uso na reação de PCR.

4.8. Mensuração da quantidade de DNA e RNA

A quantidade de DNA e RNA das amostras controle foram mensuradas por densidade óptica em espectrofotômetro (*Biophotometer®* - eppendorf, Germany), observando-se a absorbância a 260 e 280nm, além das relações 260/280nm e 260/230nm.

4.9. Seleção dos Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Para amplificação do DNA foram selecionados oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada agente. Para o ARV escolheu-se parte da sequência do gene S1 do sorotipo do S1133, que possibilita um produto da amplificação (amplicon) de 532pb (XIE et al., 1997). No caso do MS as sequências de oligonucleotídeos escolhidas referem-se a uma sequência do gene 16S do rRNA, que amplificam um produto de 207pb (LAUERMAN, 1998). A sequência de oligonucleotídeos iniciadores específicos (primers) para detecção do ARV e MS, bem como o produto da respectiva amplificação está descrita na tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para detecção do MS e ARV.

Agente	Primers	Amplicon	Referência
ARV	MK87 F: 5'-GGT.GCG.ACT.GCT.GTA.TTT.GGT.AAC-3' MK88 R: 5'- AAT.GGA.ACG.ATA.GCG.TGT.GGG - 3'	532pb	Xie, et al., 1997
MS	F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3' R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'	207pb	Lauerman, 1993

F = forward R = reverse

4.10. Reação em cadeia pela Polimerase – PCR

A amplificação foi executada através da técnica de PCR, onde foram realizadas reações individuais para cada agente. Para técnica de PCR foram usados 5µl das amostras de ácidos nucleicos para um volume final de 20µl. As concentrações dos componentes da reação foram 200µM de cada dNTP, 16 pmol de oligonucleotídeo *forward* e 16pmol do oligonucleotídeo *reverse* (MS e ARV), 2,5U de Taq DNA polimerase. Para definir a concentração do cloreto de magnésio (MgCl₂) foram testadas diferentes gradientes de concentrações (1,5mM, 2,0mM, 2,5mM, 3,0mM e 3,5mM). Água Milli-Q estéril foi utilizado para completar o volume final de 20µL da reação.

Para detecção do MS a reação de amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto. Para anelamento dos *primers* foram testadas diferentes temperaturas, 50°, 52°, 55°C por 1 minuto, seguido de extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para detecção do ARV foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto. Para anelamento dos *primers* foram testados as temperaturas de 48° e 50° C por 1 minuto, seguido de extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

4.11. Eletroforese

Com o objetivo de realizar a detecção dos produtos da PCR, 5µL do produto amplificado pela reação de PCR foi homogeneizado em 2µL de tampão de carregamento (azul de bromofenol) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE (Tris-borato-EDTA). Como padrão molecular utilizou-se marcador de 100pb. A eletroforese foi realizada em cuba eletroforética com fonte, nas condições de 90 V por 70 minutos. Em seguida corou-se o gel em solução de Brometo de Etídeo por aproximadamente 30 minutos. O produto amplificado foi visualizado sob iluminação de luz ultravioleta em fotodocumentador digital *MiniBIS Pro® BioAmerica Inc.*

4.12. Padronização multiplex PCR (m-PCR)

Para a determinação da viabilidade de detecção simultânea do DNA do gene dos dois agentes em uma única etapa de reação, foi padronizado um ensaio de multiplex-PCR, utilizando os *primers* do ARV e MS na mesma reação. A otimização das condições da reação para um dado conjunto de oligonucleotídeos iniciadores, como a determinação das concentrações, tempo e temperaturas de reação, é de fundamental importância para otimização do ensaio de multiplex-PCR. Observou-se a eficiência da reação frente a diferentes gradientes de concentrações de cloreto de magnésio (2,5 mM, 3,0 mM, 3,5 mM e 4,0 mM), por ser importante co-fator enzimático da Taq polimerase.

A reação foi incubada a 94°C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto. Para a amplificação foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (48°C, 50°C, 52°C e 55°C) por 1 minuto, seguido de extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para a visualização do produto da amplificação pela PCR, realizou-se corrida em gel de agarose a 1,5% em TBE em cuba eletroforética com fonte, nas condições de 90V por 70 minutos. O produto amplificado foi visualizado sob iluminação de luz ultravioleta em fotodocumentador digital *MiniBIS Pro*® BioAmerica Inc.

4.13. Sensibilidade da PCR

Para medir a sensibilidade da técnica foram realizadas M-PCR, PCR individuais para MS e ARV com DNA e cDNA nas seguintes concentrações de DNA: 100ng, 50ng, 25ng, 10ng, 1ng, 0,5ng e 0,2ng.

4.14. Sequenciamento dos produtos da PCR

Para confirmação da especificidade da reação, foi realizado o sequenciamento dos produtos de PCR amplificados do MS e ARV. Conforme os seguintes passos:

- a) Eletroforese e Clonagem dos gene 16S do rRNA do MS e gene S1 ARV em pGEM®-T Easy.

Em um gel de agarose na concentração de 1,5 % preparado com TBE (Tris-borato-EDTA) foi adicionado 30µl de PCR de cada gene (MS e ARV) submetidos a 90V por 80 minutos. Em seguida o gel foi corado em solução de Brometo de Etídeo 0,5µg/mL por aproximadamente 30 minutos e visualizados sob iluminação de luz ultravioleta. As bandas com tamanho correspondentes a amplificação da sequência do MS (207pb) e ARV (532pb) foram excisadas do gel com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e o DNA contido em cada banda foi purificado utilizando-se o kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen).

Cada gene foi ligado ao plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega), utilizando o seguinte protocolo:

- 5µl de 2x Rapid Ligation Buffer
- 1µl do vetor pGEM®-T Easy (50ng)
- 3µl do inserto (produto de PCR purificado)
- 1µl da enzima T4 DNA ligase (1U)
- As reações ocorreram a 4°C por 12 horas.

- b) Transformação dos plasmídeos recombinantes em *Escherichia coli* DH5α.

Para a realização da transformação foram utilizadas células de *E. coli* DH5α previamente tornadas competentes. Aliquotas de 50µl de células bacterianas foram homogeneizadas com 5µl da ligação de cada gene em microtubos de 1,5ml e incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida foi realizado um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e nova incubação no gelo por 90 segundos. Posteriormente foram adicionados 200µl de meio SOC (bacto-triptona 2%, bacto-extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10mM, glicose 20mM e água) em cada tubo, os mesmos foram incubados a 37°C sob agitação de 120rpm por 1 hora. Após esta incubação, 200µl de cada transformação foram plaqueadas em meio ágar LB sólido contendo 100µg/ml de ampicilina, Xgal e IPTG, para que ocorresse a formação de colônias azuis (não contêm inserto ligado ao plasmídeo) ou brancas (contêm um inserto ligado ao plasmídeo). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

A comprovação da presença dos insertos e o tamanho dos mesmos foi realizada através da amplificação por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando-se iniciadores específicos para o vetor *pGEM-T Easy*, pGEM-F (5'- ACG CCA AGC TAT TTA GGT GAC ACT ATA -3') e EXCEL-R (5'- GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG AAT- 3') (10pmol/reação de cada iniciador). Assim, as colônias que apresentaram positivas para a presença de inserto através da PCR foram selecionadas para seqüenciamento.

c) Sequenciamento dos clones MS e ARV

O sequenciamento dos clones foi realizado em um equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire). As reações de seqüenciamento foram preparadas a partir do DNA plasmidial e o Kit *DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE/Amersham Biosciences, Buckinghamshire) conforme especificações do fabricante. Em resumo, as reações foram realizadas na presença de 5,0pmol dos iniciadores pGEM-F e EXCEL-R e aproximadamente 800ng de DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, ligação dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 60°C por 80 segundos. Posteriormente, os produtos marcados foram precipitados com isopropanol 70% e etanol absoluto, para retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram então eletroinjetados a 2KV por 100 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 7KV.

As seqüências obtidas foram analisadas quanto à sua qualidade utilizando-se o pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phrap.org) sendo consideradas somente as seqüências com qualidade Phred>20. A confirmação da identidade dos fragmentos realizou-se utilizando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Todas as etapas de sequenciamento e análise das seqüências obtidas foram realizadas no Laboratório de Bioinformática da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.15. Processamento Histopatológico

Para análise histopatológica as amostras foram fixadas em formalina á 10%

tamponada. Após, os tecidos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina, posteriormente foram cortados em micrótomo na espessura de aproximada de cinco micras (μm), corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados em microscópio óptico

4.16. Imunofluorescência Indireta (RIFI)

a) Anticorpos Anti-reovirus e Anti-mycoplasma synoviae

O anticorpo anti-reovirus utilizado foi adquirido da Empresa CÉLULA B - *Serviço de produção de Anticorpos*, cepa S1133 produzidos em coelhos.

Os Anticorpos anti-mycoplasma synoviae foram produzidos a partir de antígeno estrutural presente na membrana celular do M. synoviae gentilmente doados pela Pesquisadora Dra. Clarissa Vaz (Embrapa). A produção do anticorpo foi realizada no Laboratório de Imunologia e doenças infecciosas da UFSC, em camundongos Balb/C SPF (fêmeas nove semanas). Foram realizadas três imunizações intraperitoneal em intervalos de 14 dias, utilizando 50ug do antígeno purificado.

b) Preparação das lâminas

Os cortes histológicos de aproximadamente 5 μm foram fixados em lâminas pré-tratadas com poly-L-lisina. Em seguida as lâminas foram submetidas ao processo de reativação antigênica, bloqueio, seguida de marcação com anticorpo primário e secundário. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo Anti-reovirus e anticorpo anti-mycoplasma synoviae. Para o anticorpo secundário foram empregados na marcação anticorpo *anti-rabbit* em goat marcado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen®) e anticorpo *anti-mouse* em goat marcado com FITC(Invitrogen®).

c) Leitura e interpretação

Para a leitura foi utilizado microscópio de imunofluorescência e objetiva com aumento 20 e 40x. As amostras que apresentaram fluorescência foram consideradas positivas.

Toda a técnica de imunofluorescência foi realizada na UFSC, no Laboratório de imunologia e doenças infecciosas em Florianópolis.

5. RESULTADOS

5.1. Infecção experimental

As aves inoculadas experimentalmente apresentaram clinicamente redução do ganho de peso, retardo no desenvolvimento, dificuldade de locomoção, leve edemaciação e hiperemia da região da articulação tíbiotársica e coxim plantar. Na necropsia foi possível observar artrite moderada a em todas as aves, fragilidade óssea, evidenciada pela de fratura do fêmur ao realizar a desarticulação coxo-femural (Figura 4), aumento do líquido sinovial, que em alguns casos apresentava aspecto turvo. O exame histopatológico das articulações revelou infiltrado inflamatório mononuclear moderado difuso na cápsula sinovial e no tendão flexor digital (Figura 5). Além disso, foi possível observar no fígado, coração e baço infiltrado inflamatório heterofílico e mononuclear severo (Figura 6) e no trato respiratório, infiltrados difusos de linfócitos e heterófilos nas mucosas da traquéia e sacos aéreos, sendo mais severo nos pulmões (Figura 7). Em 43,75% (7/16) das aves foi possível observar necrose hepática focal.

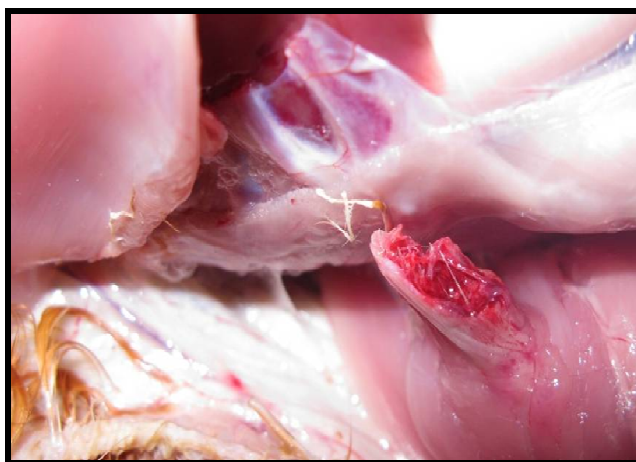


Figura 4 : Fratura do fêmur pela desarticulação coxo-femural, evidenciando fragilidade óssea de corrente a infecção pelo ARV.

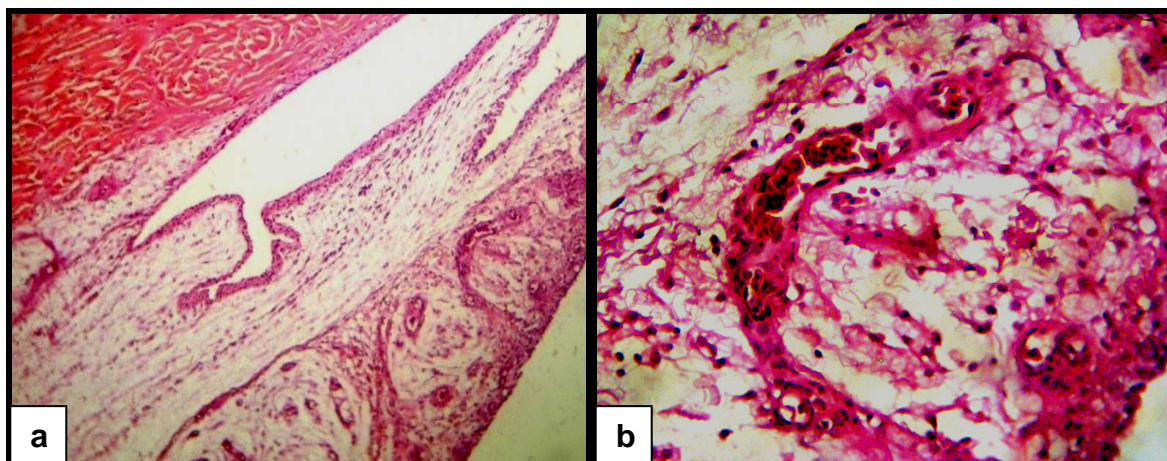


Figura 5: Características histológicas da capsula articular de animais experimentalmente infectados com ARV e MS. (a) Presença de infiltrado inflamatório. (b) Presença predominante de heterófilos. Coloração de H&E obj. 10 e 40x respectivamente.

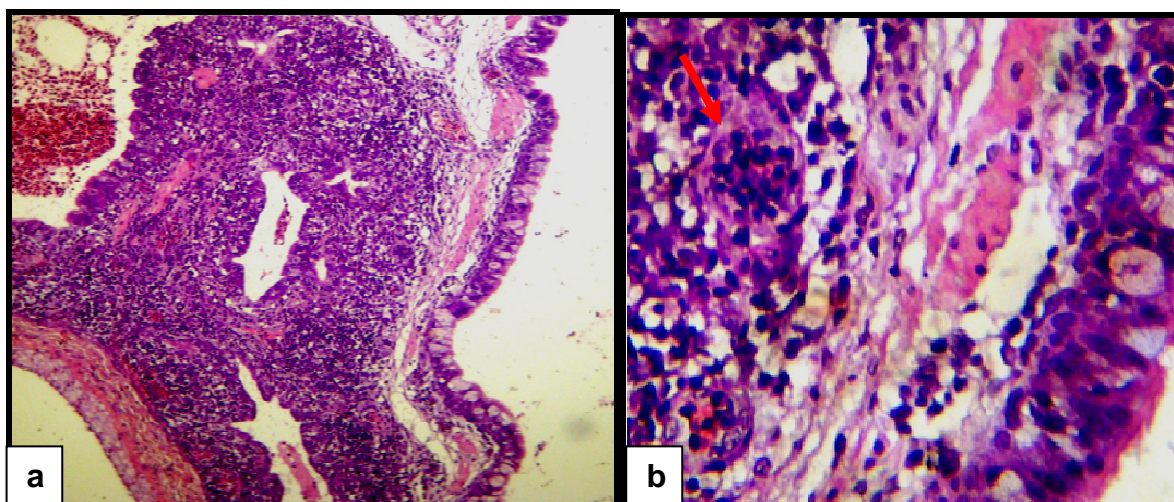


Figura 6: Aspectos histológicos do pulmão de animais experimentalmente infectados com ARV e MS. (a) Presença de infiltrado inflamatório difuso no pulmão. (b) Células gigantes na parede alveolar (seta). Coloração de H&E obj. 10 e 40x respectivamente.

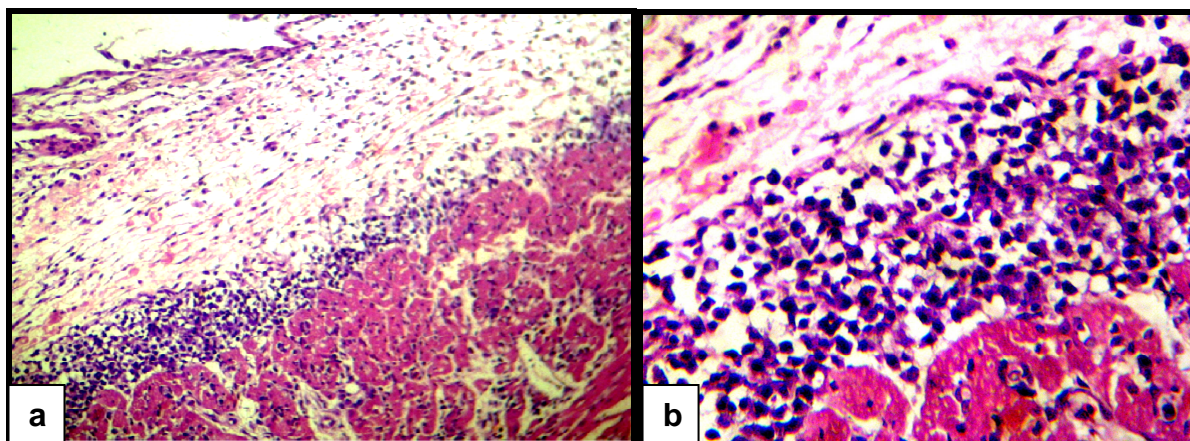


Figura 7: Aspectos histológicos do pericárdio de animais experimentalmente infectados com ARV e MS. (a) presença de infiltrado inflamatório heterofílico e mononuclear severo. (b) infiltrado inflamatório heterofílico e mononuclear. Coloração de H&E obj. 10 e 40x respectivamente

As amostras foram submetidas ao teste de PCR para detecção de MS e ARV. Quando analisadas separadamente, todas as amostras de pulmões/sacos aéreos foram positivas para MS na PCR, já as amostras de membrana sinovial 81,25% (13/16) foram positivas na PCR para MS e 93,75% (15/16) foram positivas na PCR para o ARV. As amostras de tendão flexor digital, foram submetidas a PCR para verificar a presença de ARV, sendo que em todas ocorreu a amplificação do fragmento esperado (532pb). Igual resultado foi obtido de amostras de fígado, onde todas as amostras testadas foram positivas na PCR para ARV. Quando realizado análise das amostras coletadas através de suabes do liquido sinovial, 87,5% (14/16) foram positivas na PCR para MS.

5.2. Otimização da PCR individual

A PCR para detecção do MS e ARV individualmente foi padronizada com volume final de reação de 20 μ L.

a) PCR- *Mycoplasma synoviae* (PCR-MS)

Para a reação de 20 μ L, utilizou-se: 2,0 μ L Tampão PCR 10X; 1,0 μ L de dNTP; 1,4 μ L (3,5mM) de $MgCl_2$; 0, μ L de cada primers (20pmol/ μ L); 0,5 μ L de *Taq* DNA

polimerase (5U/ μ L) e 8,5 μ L de Água Milli-Q estéril. Para a amplificação foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (50°, 52°, 55°C), a temperatura que apresentou melhor resultado foi 50°C. Desta forma ficou definido o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (Figura 9).

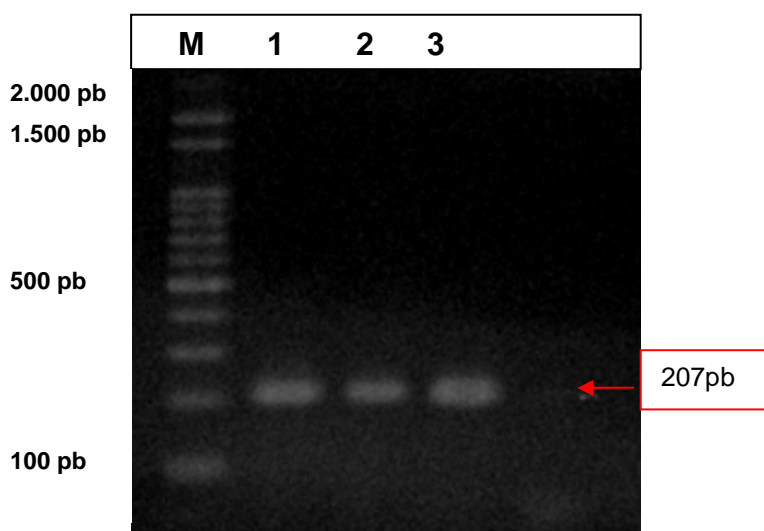


Figura 8: PCR para MS: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; 1, 2, 3, controle positivo MS, amplificando 207 pb.

b) *Orthoreovirus aviario* (PCR-ARV)

Para o ARV, foram utilizadas as seguintes condições para o volume final de 20 μ L: 2,0 μ L Tampão PCR 10X¹; 1,0 μ L de dNTP; 1,4 μ L de MgCl₂ (3,5mM); 0,8 μ L de cada primers (20pmole/ μ L); 0,5 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e 8,5 μ L de Água Milli-Q estéril. Para a amplificação, a temperatura na qual a reação apresentou melhor eficiência foi 50°C. Desta forma o protocolo definido foi o seguinte: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C

por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (Figura 10).

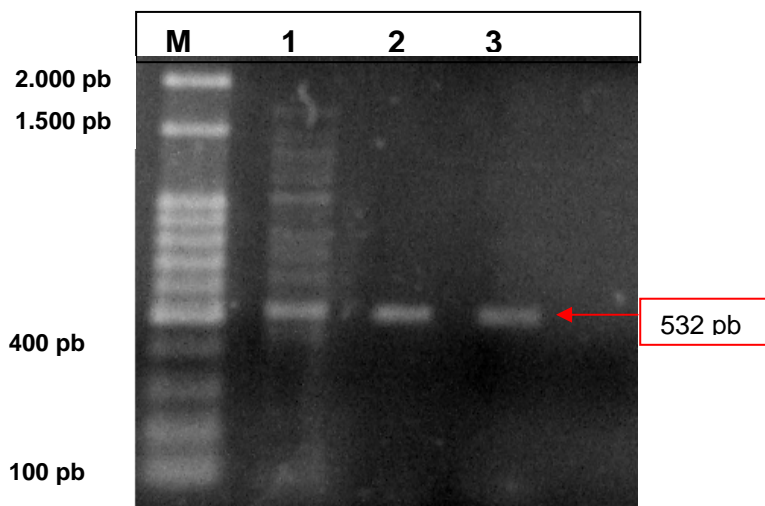


Figura 9: PCR para ARV: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; 1, 2, 3, controle positivo ARV, amplificando 532 pb.

5.3. Padronização da PCR multiplex

A PCR multiplex foi padronizada para um volume final de 20µL. Para tal, usou-se 2,0µL Tampão PCR 10X; 2,8µL de dNTP (10 mM); 1,4µL de MgCl₂ (3,5mM); 0,75µL de cada primers (MS e ARV) (20pmole/µL); 0,5µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL); 2µL de DNA (MS) e 2µL de cDNA (ARV) e 6,3µL de Água Milli-Q estéril. Para a amplificação foram testadas diferentes temperaturas de anelamento (48°C, 50°C, 52°C e 55°C), a temperatura na qual a reação apresentou melhor eficiência foi a 50°C, possibilitando a definição do seguinte protocolo: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos (Figura 11).

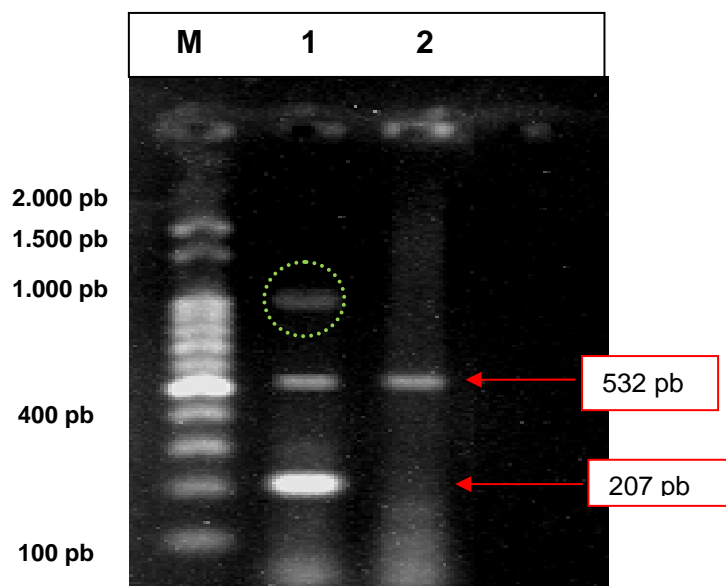


Figura 10: Multiplex PCR: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; 1 - m-PCR , amplificando MS 207 pb e ARV 532 pb; 2 controle positivo ARV; no detalhe banda inespecífica com aproximadamente 1000pb .

5.4. Sensibilidade da PCR

Na PCR individual, o limite de detecção para o ARV foi de 0,5ng de cDNA e para o MS de 0,5ng. Já na m-PCR o limite de detecção foi de 1ng de DNA extraído de MS e cDNA de ARV (Figura 11, 12 e 13).

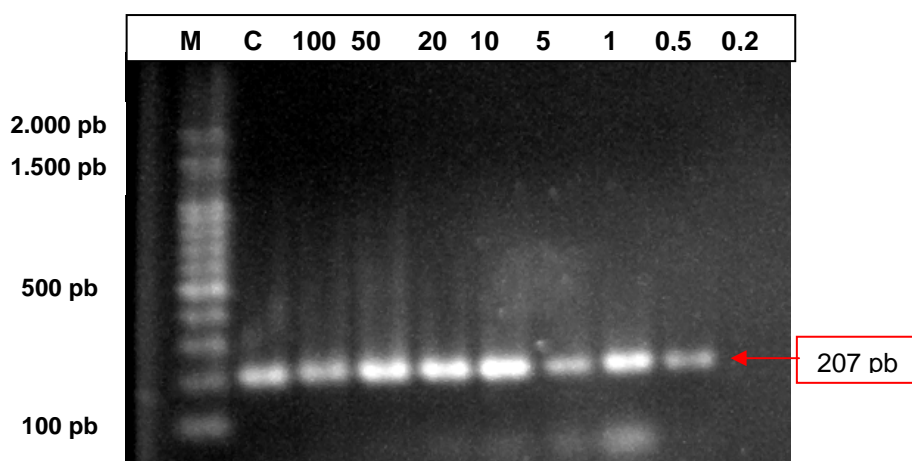


Figura 11: Sensibilidade da PCR-MS : Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; C- controle positivo; Concentrações de DNA diluição á 0,2- 100ng .

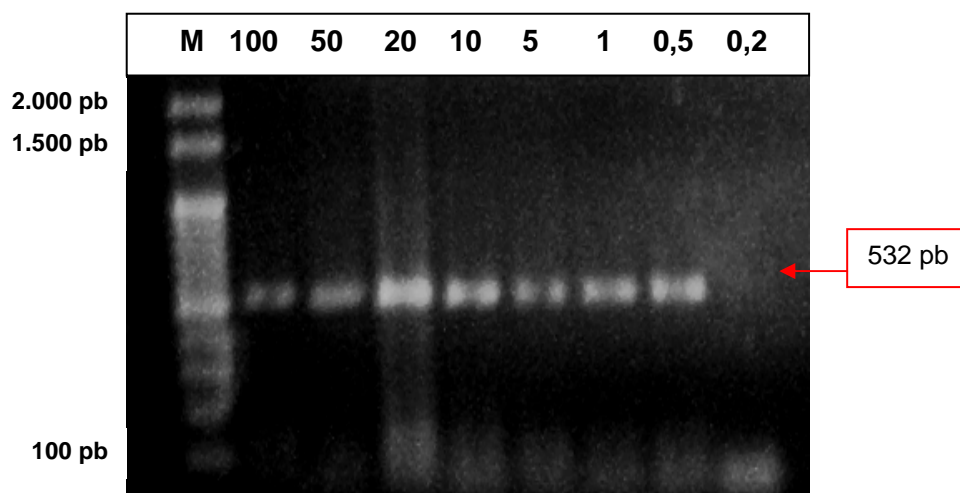


Figura 12: Sensibilidade da PCR-ARV : Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; C- controle positivo; Concentrações de 0,2- 100ng.

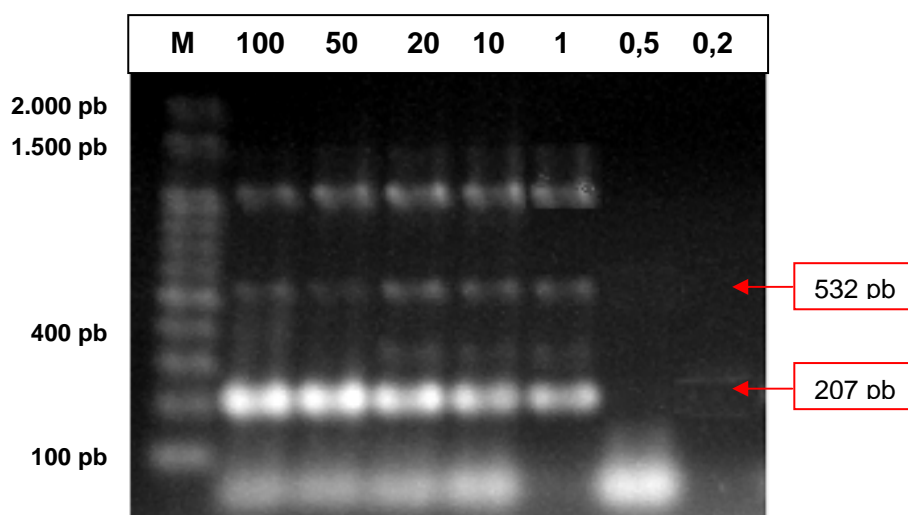


Figura 13: Sensibilidade da m-PCR: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; C- controle positivo; Concentrações de 0,2- 100ng.

5.5. PCR das amostras de campo

Do total das 150 amostras de matrizes de corte submetidas a PCR, 82,6% (124/150) foram positivas para MS, possibilitando a identificação de um produto de amplificação na eletroforese de aproximadamente 207pb, enquanto que 17,4% (26/150) foram negativas (Figura 14).

As amostras positivas para o ARV totalizaram 20% (30/150), destas 83,3% (25/30) foram positivas também para MS, somente 16,6% (5/30) foram positivas para o ARV (Figura 14 e 15). As amostras negativas tanto para MS quanto para ARV totalizam 14% (21/150), entretanto, é importante ressaltar que, os animais negativos na PCR para ambos agentes, provinham de lotes com animais positivos na PCR para MS e ARV.

Do total de 180 amostras oriundas de planteis de frango de corte, 58,9% (106/180) foram positivas na PCR para o MS e 33,9% (61/180) para ARV, respectivamente (Figura 16). Destas, 18, 33% (33/180) amostras foram positivas tanto para MS, quanto para ARV, e um total de 7,22% (13/180) foram negativas na PCR tanto para o MS , quanto para ARV (Figura 14).

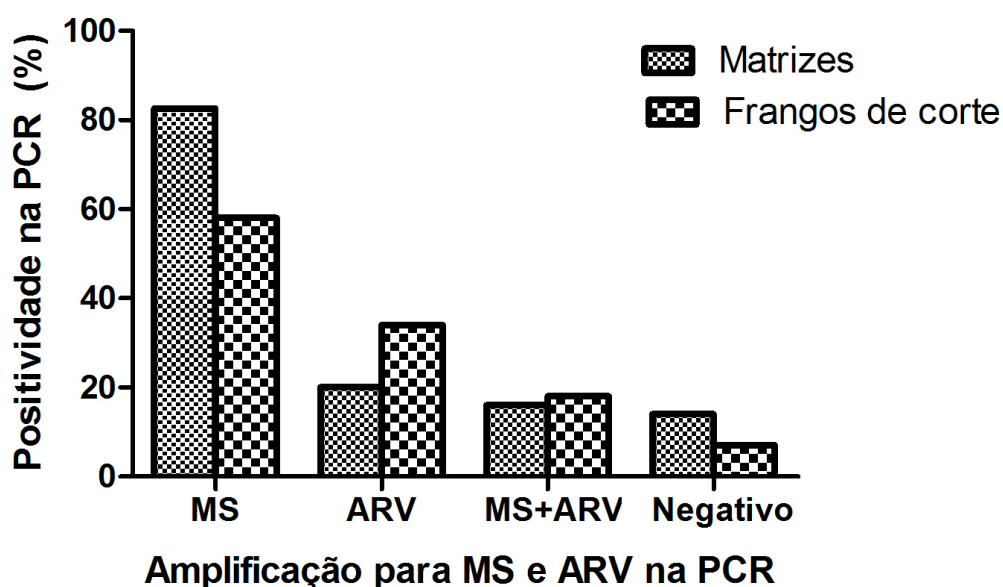


Figura 14: Resultados da PCR para ARV e MS das amostras de matrizes e frangos de corte.

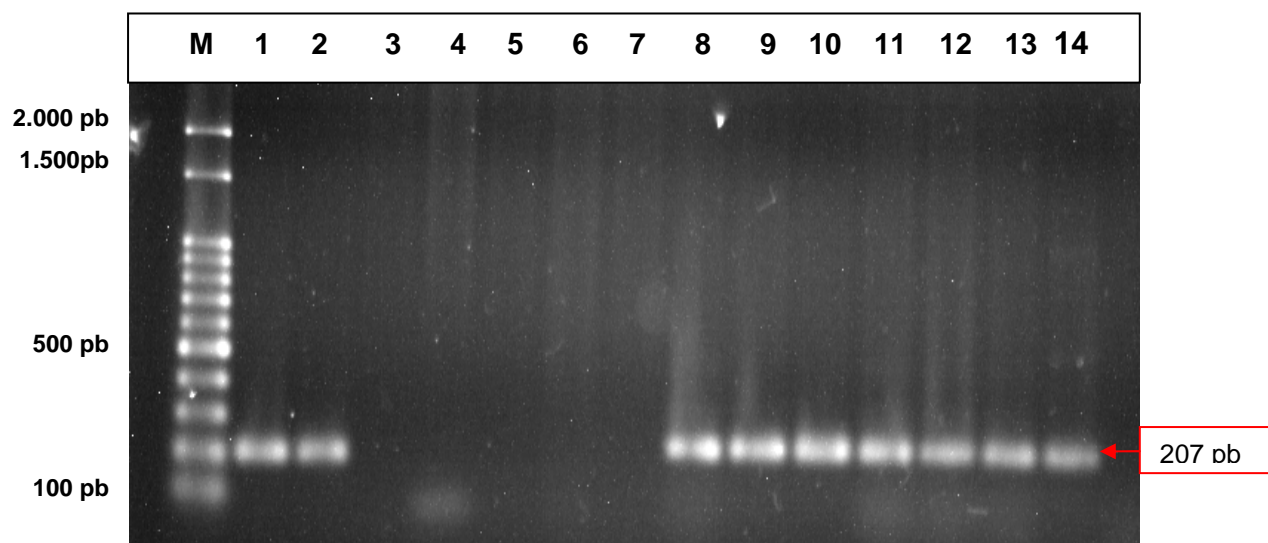


Figura 15: PCR para MS de amostras de matrizes: Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; amostras 1, 2, 8,9,10,11,12,13 e 14 amplificação MS 207pb; 3-7 amostras negativas.

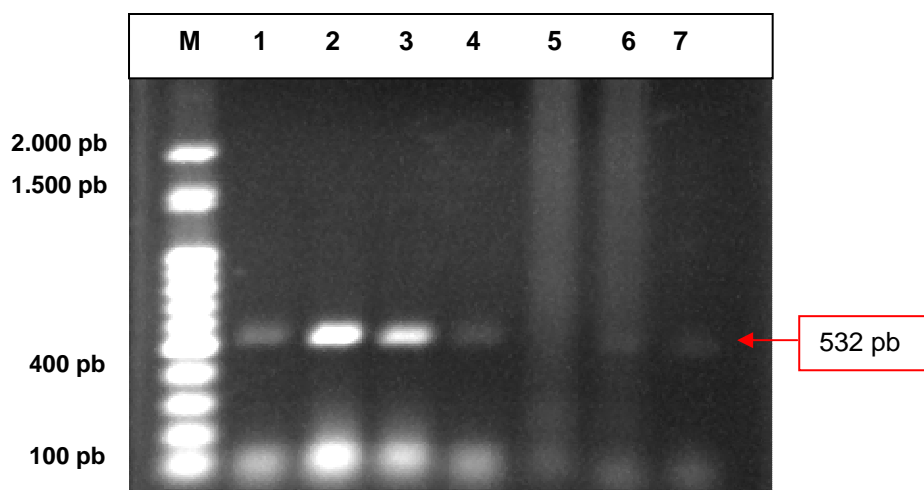


Figura 16: PCR para ARV de amostras de frangos de corte. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio; M – marcador de massa molecular 100pb; 1, 2, 3, 4, 6,7 amplificação ARV 532pb; amostra 5 foi negativa.

5.6. Processamento histopatológico

Macroscopicamente, observou-se que as lesões de artrite em matrizes foram mais evidentes que as lesões encontradas nos frangos de corte. Em ambos os grupos foi possível observar casos de articulações com a presença de exsudato caseoso, aumento do líquido sinovial e petéquias na membrana sinovial (Figura 17).

Todas as amostras de matrizes analisadas apresentavam calo no coxim plantar (pododermatite) (Figura 18), já nas amostras frango de corte a incidência de calo foi menor, apenas 16.1% (29/180) das amostras analisadas, e mesmo estes quando presentes possuíam grau leve. A presença de calo no coxim plantar é uma característica marcante nos lotes de matrizes abatidas visto que praticamente todos os animais apresentam este tipo de lesão bem evidente. No que se refere aos lotes de frangos de corte, provavelmente pela idade, a frequência deste tipo de lesão é menor.

Considerando a presença de material purulento nas articulações analisadas, 8,33% (15/180) das amostras oriundas de plantéis de frangos de corte, e 8,66% (13/150) das amostras de matrizes de corte apresentaram esta característica bem evidente.

O exame histopatológico das articulações revelou infiltrado inflamatório mononuclear difuso, acúmulo de heterófilos na cápsula sinovial e em alguns casos no tendão flexor digital nas amostras de matrizes e de frangos de corte (Figura 19). Em amostras de matrizes foi possível observar hiperplasia e hipertrofia das células sinoviais com formação de vilos, acúmulo de heterófilos nos espaços sinoviais com infiltrado linfocítico (Figura 20).

As amostras que não foram positivas na PCR para nenhum dos agentes, apresentaram no exame histopatológico lesões características de inflamação, como acúmulo de heterófilos.

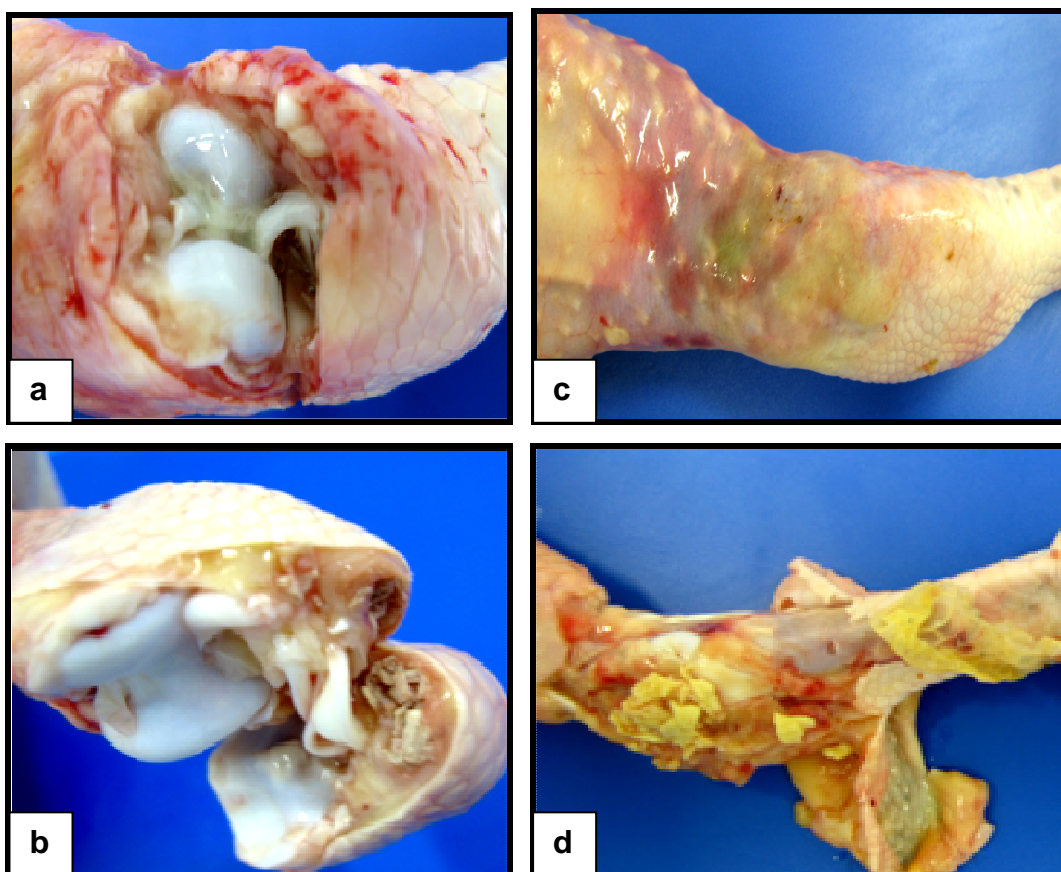


Figura 17: Aspectos anatomopatológicos das lesões de artrite observadas em amostras de campos oriundas de plantéis de frangos de corte. (a) aumento de líquido sinovial com aspecto turvo. (b) material caseoso em articulação com artrite. (c) Artrite severa. (d) presença de material caseoso em articulação com artrite.

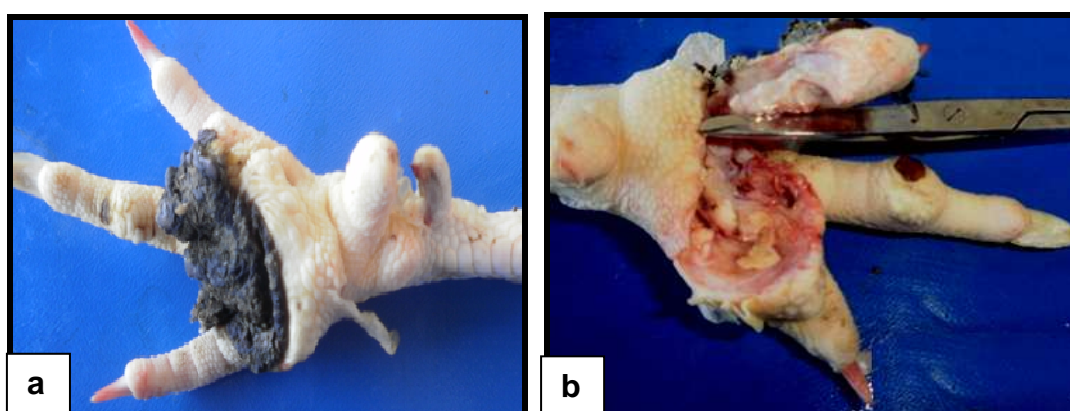


Figura 18: Aspectos anatomopatológicos observadas em amostras de campos oriundas de plantéis de matrizes de corte. (a) pododermite. (b) pododermatite, presença de material caseosos.

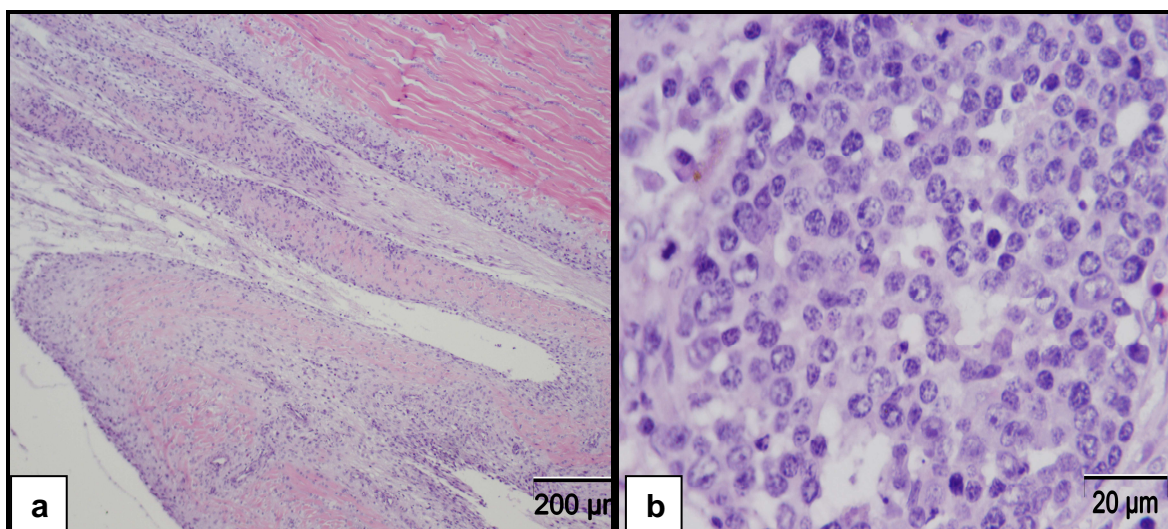


Figura 19: Características histológicas da cápsula articular de frangos de corte. (a) Presença de infiltrado inflamatório. (b) Presença predominante de heterófilos. Coloração de H&E obj. 10 e 40x respectivamente.

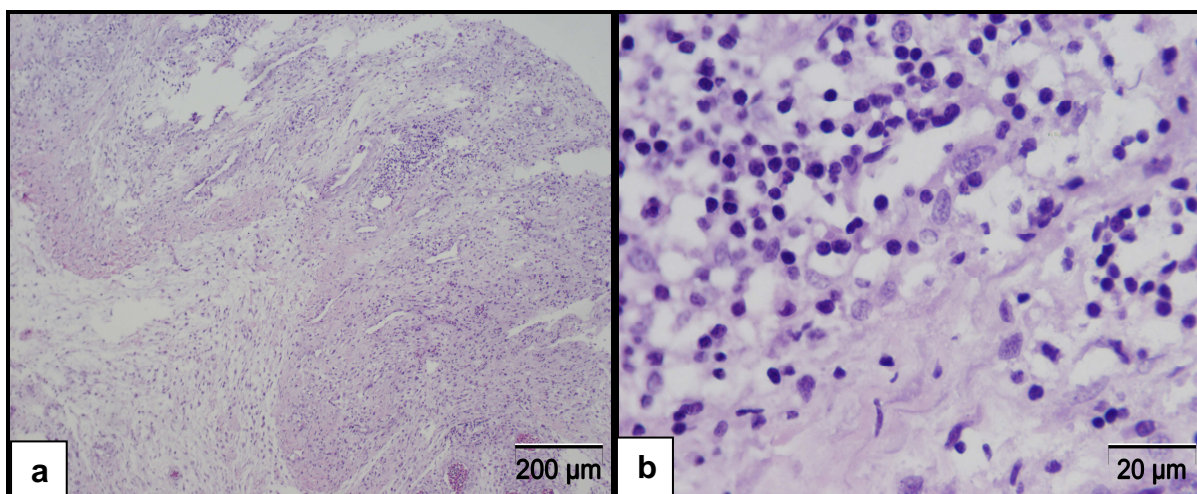


Figura 20: Aspecto histológico da articulação de matriz de corte. (a) Presença de infiltrado linfocítico com presença de heterófilos, hiperplasia e desestruturação da cartilagem. (b) Presença infiltrado inflamatório com predominância de linfócitos. Coloração de H&E obj. 10 e 40x respectivamente.

5.7. Imunofluorescência Indireta

As amostras de campo de matrizes e frango de corte foram positivas no ensaio de RIFI (Figuras 21 e 22),

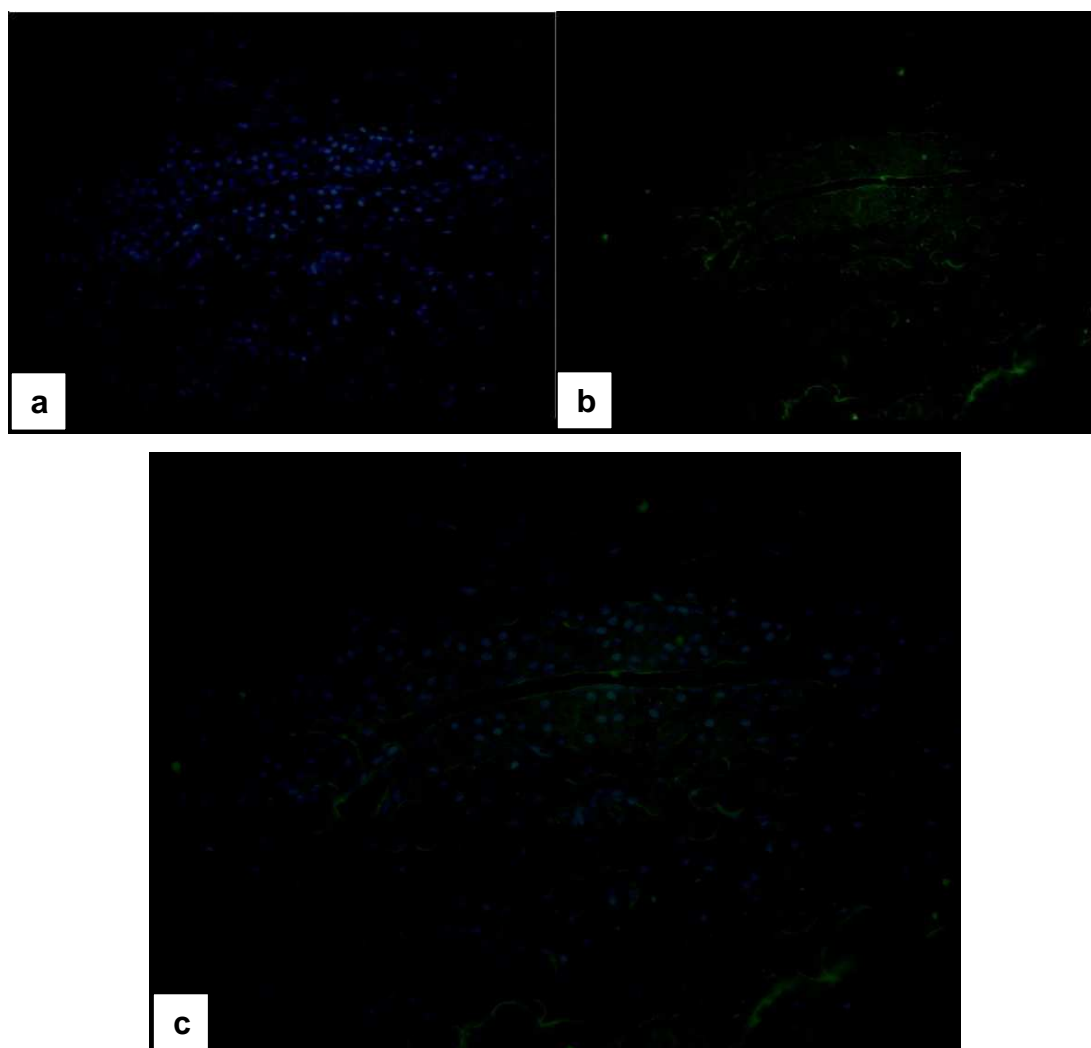


Figura 21: Corte histológico 5 μ m de articulação de frango de corte positivo na RIFI para presença de antígenos do MS. (a) marcação com DAPI. (b) marcação com anti-mouse in goat marcado com FITC. (c) sobreposição A e B, sugerindo a presença de antígenos na superfície de células da membrana sinovial da camada interna.

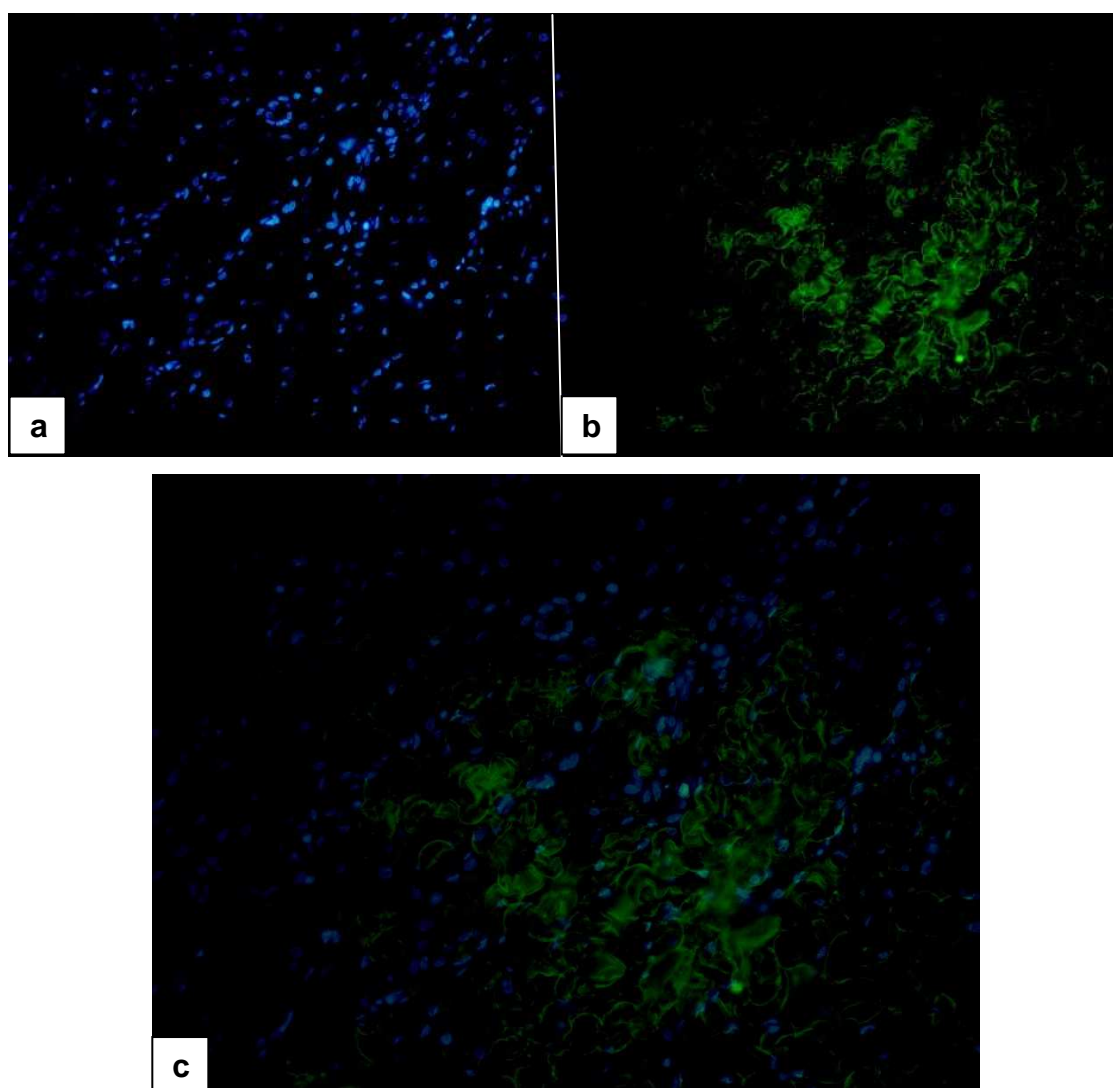


Figura 22: Corte histológico 5 μ m de articulação de frango de corte positivo na RIFI para presença de antígenos do ARV. (a) marcação com DAPI. (b) marcação com anti-rabbit in goat Alexa Fluor 488.(c) sobreposição A e B, demonstrando a presença de antígenos na superfície de células da membrana sinovial (superfície externa).

5.8. Análise do sequenciamento dos clones MS e ARV

As construções dos insertos selecionados, foram submetidos ao sequenciamento a fim de verificar a natureza da sequência dos genes isolados. Quando analisadas através do programa de bioinformática BLAST (Basic Local

Alignment Search Tool), as seqüências obtidas foram 100% fidedignas para MS e 98% para ARV (Figuras 23 e 24). Os resultados obtidos demonstraram a fidelidade de transcrição e a especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores empregados (primers).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EU526387.1	Avian orthoreovirus strain H806 segment S1, complete sequen	429	429	99%	4e-117	98%
DQ868791.1	Avian orthoreovirus strain P100 segment S1, complete sequen	429	429	99%	4e-117	98%
DQ868790.1	Avian orthoreovirus strain S1133wt segment S1, complete seq	429	429	99%	4e-117	98%
DQ868789.1	Avian orthoreovirus strain Fahey-Crawley segment S1, comple	429	429	99%	4e-117	98%
FF057398.1	Avian orthoreovirus isolate T-98 segment S1, complete sequer	429	429	99%	4e-117	98%
FF057397.1	Avian orthoreovirus isolate C-98 segment S1, complete sequer	429	429	99%	4e-117	98%
DQ643975.1	Avian orthoreovirus strain G-98 segment S1, complete sequen	429	429	99%	4e-117	98%
DQ643974.1	Avian orthoreovirus strain B-98 segment S1, complete sequen	429	429	99%	4e-117	98%
DQ198854.1	Muscovy duck reovirus strain YH segment 3, complete sequen	429	429	99%	4e-117	98%
DQ191363.1	Muscovy duck reovirus strain YJL segment S1, complete sequ	429	429	99%	4e-117	98%
AY438594.1	Avian orthoreovirus strain 2408 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY438592.1	Avian orthoreovirus strain 919 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY438590.1	Avian orthoreovirus strain OS161 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY438589.1	Avian orthoreovirus strain 1017-1 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY438588.1	Avian orthoreovirus strain 601SI p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY438587.1	Avian orthoreovirus strain T6 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY436510.1	Avian orthoreovirus strain 918 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AY436508.1	Avian orthoreovirus strain 750505 p17 gene, complete cds	429	429	99%	4e-117	98%
AF330703.1	Avian reovirus strain S1133 segment S1, complete sequence	429	429	99%	4e-117	98%
AF218358.1	Avian reovirus strain 176 segment S1 membrane fusion protein	429	429	99%	4e-117	98%
AF004857.1	Avian reovirus strain 1733 segment S1, 10 kDa protein, 17 kDa	429	429	99%	4e-117	98%
U39002.1	Avian reovirus (S113) S1 mRNA, complete cds	424	424	99%	2e-115	98%

Figura 23: Sequências do ARV depositadas no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI, similaridade de 98% .

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AE017245.1	Mycoplasma synoviae 53, complete genome	111	223	84%	3e-22	100%
AM073015.1	Mycoplasma synoviae 16S rRNA gene	111	111	84%	3e-22	100%
U04545.1	Mycoplasma synoviae WVU1853 16S rRNA gene, partial s	111	111	84%	3e-22	100%
X52083.1	M. synoviae 16S rRNA gene	111	111	84%	3e-22	100%
AB018053.1	Mycoplasma sp. Pen1 gene for 16S rRNA, partial sequen	100	100	84%	6e-19	96%
EU859984.1	Mycoplasma sp. CSL7529-conjunctiva 16S ribosomal RNA	100	100	84%	6e-19	96%
EU859981.1	Mycoplasma sp. CSL7491-lung 16S ribosomal RNA gene, p	100	100	84%	6e-19	96%
FM165076.1	Mycoplasma sp. 2F1AT partial 16S rRNA gene, type strain	100	100	84%	6e-19	96%
EU714238.1	Mycoplasma sp. CSL7503-lung 16S ribosomal RNA gene a	100	100	84%	6e-19	96%
NR_025184.1	Mycoplasma glycyphilum strain 485 16S ribosomal RNA, p	100	100	84%	6e-19	96%
DQ223547.1	Mycoplasma sp. Ms03 16S ribosomal RNA gene, partial se	100	100	84%	6e-19	96%
U73903.1	Mycoplasma edwardii 16S ribosomal RNA gene sequence	100	100	84%	6e-19	96%
NR_029174.1	Mycoplasma felis strain ATCC 23391 16S ribosomal RNA,	100	100	84%	6e-19	96%
AB576869.1	Mycoplasma californicum gene for 16S rRNA, partial sequ	95.3	95.3	81%	3e-17	96%
NR_029166.1	Mycoplasma californicum strain ST-6 16S ribosomal RNA,	95.3	95.3	81%	3e-17	96%
EU797451.1	Mycoplasma canimucosale strain HRC689 16S ribosomal R	95.3	95.3	81%	3e-17	96%
AY774638.1	Mycoplasma canimucosale 16S rRNA gene, type strain 16	95.3	95.3	81%	3e-17	96%
AF527624.1	Mycoplasma sp. HRC689 16S ribosomal RNA gene, 16S/23	95.3	95.3	81%	3e-17	96%
AF412989.1	Mycoplasma verecundum 16S ribosomal RNA gene, partia	95.3	95.3	84%	3e-17	95%
NR_025914.1	Mycoplasma meleagridis strain 17529 16S ribosomal RNA	95.3	95.3	71%	3e-17	100%
NR_025964.1	Mycoplasma simbae strain LX 16S ribosomal RNA, partial	95.3	95.3	81%	3e-17	96%

Figura 24: Sequências do MS depositadas no banco de dados públicos do Centro Nacional de Informação Biotecnológica, o NCBI, similaridade de 100% .

6. DISCUSSÃO

A artrite infecciosa em frangos e matrizes de corte representa um problema sanitário e econômico de grande impacto para a avicultura moderna mundial, causando grandes perdas na produção e processos de industrialização (BERCHIERI JUNIOR e MACARI, 2000). Fatores predisponentes como alta densidade animal, excesso de umidade na cama e elevada concentração de amônia no ambiente afetam o desempenho e tornam as aves mais suscetíveis a infecções (COELHO et al., 2009).

As metodologias tradicionais para o diagnóstico de *Orthoreovirus aviario* (isolamento) e *Mycoplasma synoviae* (isolamento e sorologia) são laboriosas ou pouco representativas, visto que no caso da sorologia, a presença de anticorpos circulantes, não reflete o quadro lesional ou a expressão clínica da doença (DWIGHT e YUAN, 1999; VAN DER HEIDE, 2000). Além disso, devido a fatores epidemiológicos como a transmissão vertical de ambos os agentes, tornam-se onerosos os programas de controle e/ou tratamento (SAIF et al., 2003; XIE et al. 1997).

Atualmente, a biologia molecular tem sido amplamente utilizada como ferramenta para o desenvolvimento de ensaios voltados ao diagnóstico de diversas enfermidades. A técnica de PCR, por sua rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, pode ser empregada para fundamentar e complementar estudos epidemiológicos e diagnósticos (BERCHIERI JUNIOR e MACARI, 2000). A especificidade de um ensaio baseado na PCR depende da estringência da reação e complementaridade dos *primers* utilizados para a detecção do patógeno alvo (MILES e NICHOLAS, 1998).

As técnicas moleculares empregadas neste estudo mostraram-se eficientes para detecção de MS e ARV em lesões de artrite. De acordo com Fiorentin et al.(2003), a técnica de PCR para detecção de MS, é mais sensível que outros testes, detectando a presença de MS em aves antes que outras provas diagnósticas como o isolamento, soro aglutinação em placas e HI.

Com relação ao ARV não há dados na literatura comparativos de técnicas de diagnóstico. Xie e colaboradores (1997), demonstraram a eficiência da técnica de RT-PCR para detecção de pequenas quantidades de RNA de ARV, permitindo a

amplificação direta de amostras clínicas ou ambientais, evitando etapa extra de cultura celular.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, foi acompanhado o abate de um total de 330.110 aves (matrizes e frangos de corte), entretanto não foi contabilizado o total de condenações por artrite no período. Contudo, foi possível observar que o volume de articulações sequestradas pelo serviço de inspeção foi elevado, principalmente nos abates de matrizes de corte. Esse fato é explicado pela idade e ao peso corporal das mesmas ao abate (KOMIYAMA et al., 2010).

A micoplasmose aviária pode estar associada a quadros respiratórios e locomotores, causando grandes perdas para os sistemas de produção avícola mundial (BUIM, 2006). Uma vez introduzido na granja o *Mycoplasma* sp., torna-se difícil a eliminação do agente (FIORENTIN, 2005).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram elevados níveis de infecção por MS em matrizes de corte com lesões de artrite, sendo detectado através da PCR o agente em 82,6% (124/150) das amostras. Resultados semelhantes foram encontrados por Dufour-gesbert, et al. (2006), que detectou a presença do agente em 87% das amostras de suabes de traquéia coletadas de plantéis de matrizes na França. Pourbakhsh et al. (2010), observaram em Teerã, uma prevalência de 30,74% de MS em granja de matrizes com sinais clínicos sugestivos da infecção pelo MS.

A infecção por MS em granjas de reprodutoras é altamente relevante tendo em vista a capacidade de disseminação e a possibilidade de transmissão vertical do agente (ORSI et al., 2004). Buim et al. (2009), utilizando a técnica de PCR multiplex para diagnosticar MS e MG detectaram alta prevalência de micoplasmas em granjas de reprodutora, sendo 72,72% desta positivas para os agentes com predominância de MS. Em um estudo sobre a prevalência de MS em granjas de matrizes no Estado de São Paulo, utilizando como teste de diagnostico a SAR, observou uma positividade para MS de 19,54% das granjas testadas (CARDOSO et al., 2003).

No Brasil é obrigatório o controle e certificação de estabelecimentos avícolas de reprodução quanto à presença de micoplasmoses. O MAPA determina monitorias nestes estabelecimentos a cada três meses para verificar a presença de MS e/ou MG, conferindo às granjas certificados, para daí sim poderem comercializar os pintinhos (BRASIL, 1999).

A diferença entre os dados encontrados está provavelmente, relacionada ao delineamento experimental dos trabalhos, pois em estudos de prevalência coleta-se amostras de animais com ou sem sinais clínicos e/ou lesões da doença, ou seja, o oposto realizado nesse trabalho onde buscou-se detectar a presença de MS em lesões de abate. Contudo, essa discrepância entre os dados de prevalência com os dados deste estudo sugerem que alguns fatores possam contribuir para uma ocorrência maior do MS em lesões de abate, como a idade das reprodutoras no abate (acima e 66 semanas), programa de biossegurança de cada granja, uso de tratamentos com antibacterianos por longos períodos. Fiorentin et al (2003), constataram aparente erradicação de MS em granjas de matrizes, que foram submetidas a tratamento intensivo com antibacterianos para o controle de *E. coli.*, entretanto, em aves que já apresentam lesões nos sacos aéreos ou membranas sinoviais, tornam-se mais limitada a resposta ao tratamento (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

Considerando a detecção do MS, através da PCR, a partir de suabes de articulação ou amostras de tecido, não houve diferença significativa entre os níveis de detecção para os diferentes tipos de amostras. Neste caso, optou-se por trabalhar com suabes de articulação devido ao custo, maior agilidade e praticidade na colheita e processamento laboratorial. Dados correspondentes foram descritos por Machado (2010), que comparou coleta de suabe da traquéia e escarificação da traquéia para isolamento de MG.

Em frangos de corte, estudos contemplando as causas de condenação no abate, elegem artrite como uma das principais causas de condenação parcial (GIOTTO et al., 2008; MORETTI, 2006).

Na análise das amostras de articulações oriundas de planteis de frangos de corte, foram observado que 58,9% (106/180) foram positivas na PCR para o MS. Minharro et al. (2001), observaram a presença de MS através da técnica de PCR em 25,80% das lesões de sacos aéreos em frangos de corte condenados devido a presença de aerossaculite no Estado de Goiás. Da mesma forma que em matrizes, dados e estudos acerca das causas das lesões de artrite em frangos de corte são escassos. Feberbwe et al. (2008), verificaram que a prevalência de MS em granjas de frangos de corte da Holanda foi de 6%, segundo aos autores essa prevalência baixa pode ser devido ao intenso uso de antibacterianos.

Nesse estudo, a detecção de MS através da PCR a partir de suabes de

articulação (líquido sinovial) foi alta, tanto em matrizes 82,6%, quanto em frangos de corte 58,9%. A presença de MS no líquido sinovial não necessariamente indica que o mesmo tenha invadido a articulação e ocasionando lesões (ALAFALEQ et al., 1989). Senties-Cue, et al. (2005), detectaram a presença de MS em diversos órgãos como fígado, baço, traquéia, sacos aéreos e articulações.

Para a detecção do ARV através da RT-PCR, em amostras oriundas de plantéis de matrizes de corte, observou-se positividade para o agente em 20% (30/150) das amostras. Pesquisas sobre a prevalência do ARV nas unidades de produção avícolas do Brasil são escassas. Lorenzini et al., (1996), através de um levantamento sorológico para ARV, utilizando teste de ELISA, em matrizes de corte no Estado do Rio Grande do Sul observaram a presença de anticorpo para reovírus em 90,5% das amostras analisadas, sendo que as aves não eram vacinadas. A detecção de anticorpos revela o contacto das aves com os agentes, demonstrando a presença ou a circulação do mesmo nos respectivos plantéis (BUCHALA et al., 2006). Dobson e Glisson (1992), estudaram o impacto econômico de um caso de infecção por ARV em reprodutoras pesadas e em seus descendentes, considerando parâmetros como: diminuição da eclodibilidade, custos com vacinação e medicação (matrizes e frangos), mortalidade, descarte, perdas no abate (frangos) e qualidade da progênie. A perda total, considerando o lote de reprodutoras com 8.750 galinhas e um lote com 25.200 frangos, a perda estimada foi de aproximadamente US\$ 48.000,00.

A incidência de ARV nas lesões de artrite de frangos de corte foi de 33,9% (61/180), destes 18,33% (33/180) foram positivos também para MS. O diagnóstico de ARV em plantéis de matrizes e frangos de corte já foi relatado em vários países com avicultura industrial expressiva. As principais perdas econômicas associadas a infecção pelo *Orthoreovirus aviario* em frangos de corte estão relacionadas com claudicação, baixo desempenho, diminuição do ganho de peso e piora conversão alimentar (GLISSON e DOBSON, 1992). No Brasil há poucos dados disponíveis sobre a prevalência do agente em granjas comerciais, entretanto profissionais de campo relatam com frequência quadros clínicos sugestivos da infecção pelo agente em granjas de frangos de corte. Bokaie et al. (2008), sugeriram que a soroprevalência para anticorpos contra reovírus em frangos com idade de abate na província de Teerã foi de 98,3%. Quando este cenário foi transposto para aves de subsistência (“fundo de quintal”) no Estado do Rio Grande do Sul, Santos et al.

(2007b), detectaram a presença de anticorpos contra ARV em 21,6% das amostras analisadas. Aves de subsistência representam um risco para a avicultura industrial, devido a precária condição sanitária e impossibilidade de manejo controlado e principalmente a livre circulação de agentes infecciosos no ambiente (BUCHALA et al., 2006). A presença do ARV e a ocorrência de lesões pela infecção esta diretamente relacionada ao sorotipo envolvido, podendo altos títulos virais influenciar os níveis de virulência do ARV (JONES et al., 1989) .

A RIFI sugere a co-localização dos antígenos do ARV e MS, demonstrando que os dois podem estar associados nos casos de artrites. Foi possível identifica a presença de antígenos do ARV na superfície de fibroblastos constituintes da camada externa da membrana sinovial e na região do tendão flexor digital. Já antígenos de superfície do MS na superfície interna da membrana sinovial, principalmente junto ao endotélio vascular.

Não foi possível correlacionar a presença dos agentes nas lesões encontradas no abatedouro com a incidência a campo de casos clínicos ou históricos, devido a dificuldades impostas por parte das Empresas integradoras. Sabe-se que aves que apresentam sinais clínicos de artrite, caso não respondam ao tratamento, são eliminadas do lote, não chegando ao abate.

A análise histopatológica das lesões revelou a presença de processo inflamatório na membrana sinovial e no tendão flexor digital. Resultados semelhantes também foram encontrados na infecção experimental, onde se observou infiltrado mononuclear moderado difuso na cápsula sinovial. Nas amostras de articulações, negativas na PCR para ambos os agentes (MS e ARV) constatou a presença de processo inflamatório.

Através da análise histopatológica das amostras de campo não foi possível diferenciar artrites caudas pelo ARV das causada pelo MS. Em matrizes, constatou-se nas lesões a presença de infiltrado linfocitário, hiperplasia e desestruturação da cartilagem, lesões compatível com processo crônico.

Nos animais submetidos a infecção experimental pelo MS e ARV, foi possível observar no trato respiratório infiltrados difusos de linfócitos e heterófilos na mucosa traqueal e sacos aéreos, compatível com as lesões causadas pelo MS. No fígado, coração e baço observou-se infiltrado inflamatório heterofílico e mononuclear severo nas diferentes serosas e necrose hepática focal, lesões compatíveis com as causadas pela replicação do ARV (VASCONCELOS et al. 2001b).

Outros agentes como a *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, por serem oportunistas podem estar associados com o agravamento dos casos de artrite, tanto de atrites infecciosas, quanto das atrites assépticas, entretanto, nesse estudo não foi pesquisado a presença dos mesmos.

A multiplex-PCR, uma variação derivada da PCR, é um ensaio rápido e eficiente, traz vantagens por propiciar em uma só reação a análise de detecção de múltiplos patógenos (HENEGARIU et al., 1997). A multiplex-PCR, padronizada neste trabalho, apresentou resultados satisfatórios, amplificando sequências específicas dos genes alvos (MS e ARV), contudo, houve amplificação de uma banda inespecífica com aproximadamente 1000 pb. Isso provavelmente deve-se ao fato de haver ocorrido interações entre os primers utilizados na reação, visto que foram testados diversos protocolos (EDWARDS E GIBBS, 1994). O conjunto de primers sintetizados para esse experimento não foram desenhados especificamente para o desenvolvimento da M-PCR, assim sendo, uma das possibilidades para a não amplificação da banda inespecífica seria redesenhar os primers. De acordo com Henegariu et al. (1997), os pares de primers para uma M-PCR devem iniciar em CG para manter a estabilidade de anelamento, já que existem pontes de hidrogênio triplas entre eles.

O teste de sensibilidade da PCR e da Multiplex, demonstrou a capacidade de detectar concentrações mínimas de DNA e cDNA em 1ng. A sensibilidade de detecção depende das condições de estrigência da reação, da pureza e da quantidade de DNA e RNA.

Os resultados obtidos no sequenciamento e posteriormente analisados pelo BLAST demonstraram a fidelidade de transcrição e a especificidade, os resultados foram fidedignos tanto para o MS, quanto para o ARV.

7. CONCLUSÕES

As técnicas moleculares, PCR, RT-PCR e m-PCR, mostraram-se eficientes para detecção de MS e ARV em lesões de artrite de matrizes e frango de corte, podendo ser incorporadas na rotina de diagnóstico para os respectivos agentes a partir de material articular.

A elevada incidência do ARV e MS, detectados pelos métodos moleculares foi confirmada pelo estudo histopatológico das lesões, que revelou alta prevalência de casos de artrite infecciosa como causa de condenação por ocasião do abate.

A incidência de MS e ARV, como causa de artrite em granjas de matrizes e frangos de corte, é subestimada em Santa Catarina, sugerindo a necessidade de reavaliar os programas sanitários das respectivas criações.

8. REFERÊNCIAS

ALAFALEQ, A.; BRADBURY, J.M.; JONES, R. C.; METWALI, A. M. Mixed infection of turkeys with *Mycoplasma synoviae* and reovirus: Field and experimental observations. **Avian Pathology**, v.18, p.441-453, 1989.

ARMENDARIS, P. Abate de aves dados de condenações – Serviço de Inspeção Federal. In.: SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA DA UFSM, 5, 2006, Santa Maria. **Anais...**, Santa Maria, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO-ABEF. Relatório anual 2008/2009. Disponível em: <<http://www.oabef.com.br>> Acesso em: 09 de fev. 2009.

BACK, A. **Manual de doenças de aves**. Cascavel: Alberto Back, 2002. 246p.

BENAVENTE, J.; MARTINEZ-COSTA, J. Avian reovirus: structure and biology. **Virus Research**, v.123, p.105-119, 2007.

BENCINA: Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas, 31:535-547 **Avian Pathology**, v.31, n.6, p. 535- 547, 2002.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. 490p.

BOKAIE, S.; SHOJADOOST,B.;POURBAKHSH, S.A.; POURSEYYED, S.M.; SHARIFI, L. Soroprevalence survey on *Orthoreovirus aviario* infection of broiler chickens in Tehran province. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.9, n.2, 2008.

BRASIL. 19 de setembro de 1994. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos legais. Portaria Ministerial 193. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa M. 44 de 23 de agosto de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2001, Seção 1, p.5.

BOTTINO, J.A.; HIPOLITO, O.; JULY, J.R.; PINTO, A.A. Agente viral isolado de casos de artrite em frango de corte e em galinhas de postura. **O Biológico**, v.41, p. 168-169, 1975.

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I. Detecção de resposta sorológica contra *Mycoplasma* em aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.143-148, 2006.

BUIM, M. R.; GUASTALLI, E. A. L.; TOGASHI, C. K.; GAMA, N. M. S. Q.; OLIVEIRA, R. A. Micoplasmose aviária e associações patológicas em aves de postura comercial. In:

REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 19, 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2006.

BUIM, M.R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A.J.P. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.7, p.552-556, 2009.

CARDOSO A.L.S.P. et al. Prova de soroaglutinação rápida em galinhas reprodutoras como monitoria sorológica de micoplasmoses. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, p. 96-99, 2003.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z. Reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.23-26, 2006.

CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I. Detecção de resposta sorológica contra *Mycoplasma* em aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.143-148, 2006.

COELHO, L.C; FONSECA, N.A.N.; PINHEIRO, J.W.; ANTONICHELI, M.; SETE, C.; ROCHA, L.M.; VIEIRA, M.L.L. Prevalência de lesões cutâneas e artrite em frangos de corte em uma região produtora no estado do Paraná. In: Zootec, 2009, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2009.

DOBSON, K.N.; GLISSON, J.R. Economic impact of a documented case of *Orthoreovirus aviaris* infection in broiler breeders. **Avian diseases**, v.36, p.788-791, 1992.

DOMAŃSKA-BLICHARZ, K.; TOMCZYK, G.; MINTA, Z. Comparison of different molecular methods for detection of *Mycoplasma synoviae*. **Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy**, v.53, p.357-360, 2009.

DUFOUR-GESBERT, F.; DHEILLY, A.; MAROIS, C.; KEMPF, I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. **Veterinary Microbiology**, n.114, p. 148–154, 2006.

DWIGHT C. H.; YUAN C.Z. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 446p.

EDWARDS, M.C. ; GIBBS, R. A. Multiplex PCR: Advantages, Development, and Applications. **Genome Research**, v.3, p.65-75, 1994.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v.39, p.729-735, 1995.

FEBERWEE A.; MORROW S.A.G.; NOORMOHAMMADI, A.H.; LANDMAN, W.J.M. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities after a dual infection with *M. synoviae* and IBV D1466. In: Congress of the International Organization for Mycoplasma, 18., 2010, Siena. **Proceedings...** Siena, p.11-16.

FEBERWEE, A. ; VRIES, T. S.; LANDMAN, W.J.M. Seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* in Dutch commercial poultry farms. **Avian Pathology**, v.37, n.6, p. 629-633, 2008.

FIORENTIN, L. Vacinas e vacinações para micoplasmas. In: Ave Expo Américas 2005; FORUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: 2005. p.32-34.

FIORENTIN, L.; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; ANTUNES, S.C.; COSTA, J.L.A.; SONCINI, R.A.; VIEIRA, N.D. Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic *Mycoplasma synoviae* Infection. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p. 37 - 43, 2003.

FIORENTIN, L.; SONCINI, R.A.; COSTA, J.L.A.; MORES, M.A.Z.; TREVISOL, I.M.; TODA, M.; VIEIRA, N.D. Apparent eradication of *Mycoplasma synoviae* in broiler breeders subjected to intensive antibiotic treatment directed to control *Escherichia coli*. **Avian Pathology**, v.32, p. 213-216, 2003.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Editora : UFSM, Santa Maria, 2007. 769 p.

GIOTTO, D.B. et al . Impacto econômico de condenações post mortem de frangos de corte em um matadouro-frigorífico na região sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35, 2008, Gramado. **Anais...** Gramado, 2008.

GYLES, C.L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. Iowa: Blacwell Publishing. 2004. 456p.

GRASHOFF, M.; SCHUMACHER, L.; HAUSER, H. *Mycoplasma* Detection by the *Mycoplasma* PCR ELISA. **Biochemica**, n.3, 1995.

GUNERATNE, J.R.M.; JONES, R.C.; GEORGIU, K. Some observations on the isolation and cultivation of avian reoviruses. **Avian Pathology**, v.11, p. 453-462, 1982.

HENEGARIU, O; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v.23, n.3, p.504-511, 1997.

HONG, Y.; GARCÍA, M.; LEITING, V. ; BENCINA, D.; DUFOUR-ZAVALA, L.; ZAVALA, G.; KLEVEN, S.H. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. **Avian Diseases**, v. 48, p. 606 - 616, 2004.

HUNG, L. et al. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Avian Pathology**, v. 33, p. 171- 180, 2004.

JONES, R. C.; ISLAM, M. R.; KELLY, D. F. Early pathogenesis of experimental *Orthoreovirus aviario* infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 18, n. 1, p. 239-253, 1989.

JONES, R.C.; GEORGIU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. **Avian Pathology**, v. 13, p.441-445, 1984.

JORDA, F.; PATTISON, M.; ALEXANDER, D.; FARAGHER, T. **Poultry Diseases**. 5 ed. London: WB Saunders, 2001. 750p.

KLEVEN, S.H. Aspectos clínicos e laboratoriais da micoplasmose aviária. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, 1990. **Anais...** 1999, p. 27-31.

KOMIYAMA, C.M.; MENDES, A.A.; SANFELICE, C.; CAÑIZARES, M.C.; ROÇA, R.O.;

TAKAHASHI, S.E.; RODRIGUES, L.; CAÑIZARES, G.I.L.; PAZ, I.C.L.A.; CARDOSO, K.F.G. Qualidade físico-química e sensorial da carne de peito de matrizes pesadas de descarte. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p.1623-1629, 2010.

LANDMAN, W.J.M.; FEBERWEE, A. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. **Avian Pathology**, v.33, n.6, p.591-598, 2004.

LAUERMAN L.H. **Mycoplasma PCR Assays**: Nucleic Acid Amplification Assays for diagnosis of animal diseases. Department of Agriculture and Industries: Alabama, 1998. 150p.

LOCKABY, S. B. ; E J. HOERR, L. H. LAUERMAN, AND S. H. KLEVEN. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in Broiler Chickens. **Veterinary Pathology**, n. 35, p.178-190, 1998.

LORENZINI, G.; BAVARESCO, A.; RIBEIRO, A.R.; RODRIGUES, O.; SALLE, C.P. Sorologia para Reovírus em matrizes de corte de três integrações avícolas, utilizando um Kit ELISA comercial. **Aquivos Faculdade Veterinária**, v.2, n.2, 1996.

LWANGA, S.K.; LEMESHOW, S. Sample size determination in health studies: a practical manual. **World Health Organization**, 1991.

MACHADO, L.S. **PCR na detecção de Mycoplasma gallisepticum e Escherichia coli patogênica em frango de corte com aerossaculite pela Inspeção Sanitária Federal**. 2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2010.

MAROIS, C.; PICAULT, J.P. ; KOBISCH, M.; KEMPF, I. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. **Veterinary Research**, n.36, p. 759–769, 2005.

McMANUS, J.F.A.; MOWRY, R.W; **Staining methods: histologic and histochemical**. 3. ed. London: Hoeber Medical Division Harper & Row, 1965, 423 p.

MILES, R.; NICHOLAS, R. **Mycoplasma Protocols**. Methods in Molecular Biology,. Humana Press: New Jersey, 1998. 331p.

MINHARRO S., LINHARES G.F.C., ANDRADE M.A., ROCHA P.T. & SANTANA A.P. 2001. Envolvimento de *Escherichia coli*, de *Mycoplasma gallisepticum* e de *Mycoplasma synoviae* em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, n.2, p.111-117.

MORETTI, D. L. **Monitoramento dos registros de condenação de frango de cortes abatidos no SIF 2485, no período de 1995 a 2005: avaliação das series históricas e análises críticas**. 2006. 201f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MORROW, C.J.; BELL, I.G.; WALKER, S.B.; MARKHAM, P.FH.; THORP, B.H.; WHITHEAR, K.G. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. **Australian Veterinary Journal**, v.67, n.4, 1990.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). Doenças das aves. Campinas: FACTA, 2000. p.217-224.

NI, Y. ; KEMP, M. A comparative study os avian *Orthoreovírus aviario* pathogenicity: virus pread and replication and induction os lesions. **Avian Diseases**, v.39, p. 554-566, 1995.

NOORMOHAMMADI, A.H.; MARKHAM, P.F.; WHITHEAR, K.G.; WALKER, I.D.; GUREVICH, V.A.; LEY,D.H.; BROWNING, G.F. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. **Infection and Immunity**, v.65, n.2, p. 2542-2547, 1997.

OLIVEIRA, C.A.C.; LOPES. B.G.S.; SILVA, P.S.; RAMOS, I.; MAIA, P.C.C.; FERNANDES, L.M.B. Sinovite infecciosa em galinhas de quintal criadas no entorno de matrizeiros no pólo avícola da Bahia . In: Simpósio Apícola, 7, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, 2010.

ORSI, M.A.; RIBEIRO, S.A.; FERRATI, A.R.; MENDONÇA, A.O.; SILVA, E.V. Estudo soroepidemiológico da micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, p.176, 2004.

POURBAKHS, S.A.; SHOKRI, G.R.; BANANI, M.; ELHAMNIA, F.; ASHTARI, A. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. **Archives of Razi Institute**, v. 65, n. 2, p.75-81, 2010.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and Pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology** , v.62, p.1094-1156, 1998.

REKIK, M. R.; SILIM , A.; BERNIER, G. Serological and pathogenic characterization of avian reoviruses isolated in Quebec. **Avian Pathology**, v. 20, p.607-617, 1991

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. Barueri: Manole, 2009. 510p.

ROBERTSON, M. D.; WILCOX, G. E.; KIBENGE, F. S. B. Prevalence of reoviruses in commercial chickens . **Australian Veterinary Journal**, v.61, p.319–322, 1984.

ROSENBERGER, J.K.; OLSON, N.O. *Orthoreovírus aviario* Infections. In: CALNEK, B.W. et al. Diseases of pultry, 9.ed. Iowa State University Press, Ames: Iowa.1991, p. 639-647.

SAIF, Y.M. et al. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State, 2003. 1231p.

SANTOS, B.M.; GÓMEZ, S.Y.M.; DE PAULA, A.C.B. Confabilidade de um teste de triagem para Micoplasmose aviária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.1, n.1, p.18-23, 2007a .

SANTOS, H.F.; LOVATO, L.T.; FLÔRES, M.L.; TREVISI, I.M.; MAZZUTTI, K.C.; PAN, K.A. Anticorpos contra vírus em galinhas de terreiro do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, 2007b.

SAVAGE, C.E.; JONES, R.C. The survival of avian *Orthoreovírus aviario* on materials associated with the poultry house environment. **Avian Pathology**, v.32, n.4, p. 419-425, 2003.

SENT ES-CUE, G.; SHIVAPRASAD, H.L.; CHIN, R.P. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broile rchickens. **Avian Pathology**, v.34, n.2, p. 137-142, 2005.

SHAPOURI, M.R.S. et al. Cloning, sequencing, and expression of the S1 gene of avian reovirus. **Journal of General Virology**, v.76, p.1515-1520, 1995.

TAKASE, K.; NISHIKAWA, H.; KATSUKI, N.; YAMADA, S. Pathogenicity of Avian Reoviruses isolated from tendons and sheaths of chickens with leg weakness. **Avian Pathology**, v.44, 1984.

THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 556p.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTORES- UBA. Relatório anual 2008. Disponível em: <<http://www.uba.org.br>> Acesso em: 09 de fev. 2009.

VAN DER HEIDE, L. The history of avian Reovirus. **Avian Disease**, v.44, p.638-641, 2000.

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

VASCONCELOS,S.B.S.; BOTTINO, J.A.; GUERRA, J. L.; JEREZ, J.A. Lesões viscerais induzidas experimentalmente pela inoculação de uma amostra artrotrópica de reovírus em frangos de corte (*Gallus gallus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.2, p. 84-87, 2001b.

XIE,Z.; FADL, A.A.; GIRSHICK, T.; KHAN, M.I. Amplification of avian *Orthoreovírus aviário* RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction.**Avian Diseases**, v.41, p.654–660, 1997.