

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

ELIZABETH BAGGIO BATISTA

**DOENÇAS VIRAIS REEMERGENTES EM MATRIZES E FRANGOS DE CORTE
NO SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

LAGES, 2023

ELIZABETH BAGGIO BATISTA

**DOENÇAS VIRAIS REEMERGENTES EM MATRIZES E FRANGOS DE CORTE
NO SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Trabalho apresentado ao Curso de Pós graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande

Coorientador: Dr. André Fonseca

**LAGES, SC
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

BAGGIO BATISTA, ELIZABETH
DOENÇAS VIRais REEMERGENTES EM MATRIZES E
FRANGOS DE CORTE NO SUL DO ESTADO DE SANTA
CATARINA / ELIZABETH BAGGIO BATISTA. -- 2023.
78 p.

Orientador: RENATA ASSIS CASAGRANDE
Coorientador: ANDRÉ FONSECA
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

1. Reovírus aviário. 2. Adenovírus. I. ASSIS
CASAGRANDE, RENATA. II. FONSECA, ANDRÉ . III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal. IV. Titulo.

ELIZABETH BAGGIO BATISTA

**DOENÇAS VIRAIS REEMERGENTES EM MATRIZES E FRANGOS DE CORTE
NO SUL DO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Trabalho apresentado ao Curso de Pós graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande

Coorientador: Dr. André Fonseca

BANCA EXAMINADORA

Renata Assis Casagrande

Renata Assis Casagrande, Doutora (Orientadora)
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

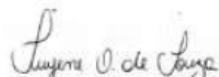
Membros:



Eduardo Muniz, Doutor
Zoetis



Rosecler Alves Pereira, Doutora
Rosevetbr Patologia Veterinária



Suyene Oltramari de Souza, Doutora
Atitus Educação



David Germano Gonçalves Schwarz
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Lages, 17 de novembro de 2023.

RESUMO

Adenoviroses e reoviroses são doenças virais remergentes na avicultura, causando prejuízos em toda a cadeia produtiva. O objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento de Reovírus aviário (ARV) nas condenações por artrite em frangos de corte pesados oriundos de matrizes não vacinadas, e descrever um surto de hepatite por corpúsculo de inclusão (IBH), causada pelo *Fowl Aviadenovirus* (FAdV) em matrizes de frango de corte. Para tanto, o estudo foi dividido em dois momentos. O primeiro momento contempla o estudo das condenações por artrite, onde foram coletados aleatoriamente 150 membros pélvicos condenados pela causa “artrite” pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), provenientes de 30 lotes junto à linha de inspeção no momento da condenação. Para a detecção de ARV, a partir de *pool* de cinco tendões gastrocnêmio de cada lote, foi realizado reação em cadeia da polimerase em tempo real sucedida de transcrição reversa (RTqPCR) utilizando os primers ReoS-F1, ReoS-R1 e ReoS-F2, ReoSR2 e o sequenciamento pelo método Sanger com amplificação do gene σC. Para análise macroscópica e histopatológica foram avaliados os tendões gastrocnêmio, flexor e extensor digital e cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica. As lesões foram classificadas em quatro níveis que variaram de G0 (sem alterações) até G3 (maior grau de lesão). Na avaliação dos escores de lesão macroscópicas observou-se maior porcentagem de lesão no tendão gastrocnêmio se comparado ao tendão extensor e flexor digital. As alterações histológicas situaram-se no peritendão e musculatura adjacente aos tendões, no tendão gastrocnêmio, flexor e extensor digital onde foram observados infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos por ora com agregados linfoides, hemorragia e exsudato fibrinoso. Na histologia a predominância de lesão grau no grau 1 (discreto). ARV foi detectado em 50% dos lotes por RTqPCR. No sequenciamento se identificou a estirpe na linhagem VI. A melhor concordância entre os métodos de diagnóstico no teste de *Kappa Fleiss* foi macroscopia versus histopatologia. Conclui-se que metade dos lotes foram positivos para ARV sem correlação com aumento da condenação por artrite. No segundo estudo foi realizado o diagnóstico de um surto de Adenovirose por transmissão vertical em matrizes de frango de corte. As matrizes apresentaram, na primeira semana de idade, aumento da mortalidade diária e taxa de mortalidade cumulativa até os 15 dias de idade de 11,13%. Macroscopicamente o fígado apresentou aumento acentuado, com coloração vermelho pálido e padrão

lobular evidente. Histologicamente, no fígado havia degeneração e necrose vacuolar multifocal coalescente leve a acentuada com os núcleos dos hepatócitos difusamente aumentados e presença de corpúsculos de inclusão basofílicos. No coração havia infiltrado de linfócitos e plasmócitos moderado, além de trombose no epicárdio. FAdV foi detectado por PCR em amostras de fígado, utilizando primers específicos para o gene hexon (52 K-fw e 52 K-rv) e foi submetido ao sequenciamento da região hipervariável deste gene (Hex L1) para análise filogenética, revelando FAdV - D sorotipo 11. Esse parece ser o primeiro relato de FAdV-D sorotipo 11 como agente causador de surto com transmissão vertical de IBH em matrizes de corte no Brasil.

Palavras-chave: Patologia aviária; tenossinovite viral; hepatite viral; frango de corte.

SUMMARY

Adenoviruses and reoviruses are emerging viral diseases in poultry farming, causing losses throughout the production chain. The objective of this study was to investigate the involvement of Avian Reovirus (ARV) in arthritis condemnations in heavy broiler chickens from unvaccinated breeders and to describe an outbreak of inclusion body hepatitis (IBH), caused by Fowl Aviadenovirus (FAdV) in broiler breeders. To this end, the study was divided into two moments. The first moment includes the study of condemnations for arthritis, where 150 pelvic limbs condemned for the cause of "arthritis" by the Federal Inspection Service (SIF) were randomly collected, from 30 flocks from the inspection line. For the detection of ARV, from a pool of five gastrocnemius tendons from each flock, real-time polymerase chain reaction followed by reverse transcription (RTqPCR) was performed using the primers ReoS-F1, ReoS-R1 and ReoS-F2, ReoS-R2 and sequencing by the Sanger method with amplification of the σ C gene. For macroscopic and histopathological analysis, the gastrocnemius, digital flexor and extensor tendons and the articular cartilage of the tibiotarsometatarsal joint were evaluated. Lesions were classified into four levels that ranged from G0 (no lesions) to G3 (highest degree of lesion). When evaluating macroscopic lesion scores, a higher percentage of lesions were observed in the gastrocnemius tendon compared to the extensor and digital flexor tendons. The histological changes were located in the peritendon and muscles adjacent to the tendons, in the gastrocnemius, flexor and digital extensor tendons where infiltration of heterophils, macrophages, lymphocytes, plasma cells with lymphoid aggregates, hemorrhage and fibrinous exudate were observed. In histology, the predominance of lesions was grade 1 (mild). ARV was detected in 50% of flocks by RTqPCR. In sequencing, the strain was identified as lineage VI. The best agreement between diagnostic methods in the Fleiss Kappa test was macroscopy versus histopathology. It is concluded that half of the flocks were positive for ARV with no correlation with an increase in arthritis condemnation. In the second study, an outbreak of Adenovirus caused by vertical transmission in breeders was diagnosed. The broiler breeder rearing showed, in the first week of age, an increase in daily mortality and the cumulative mortality rate up to 15 days of age was 11.13%. Macroscopically, the liver showed a marked increase, with a pale red color and an evident lobular pattern. Histologically, in the liver, there was mild to severe coalescent multifocal vacuolar degeneration and necrosis with diffusely enlarged

hepatocyte nuclei and the presence of basophilic inclusion bodies. There was a moderate infiltration of lymphocytes and plasma cells in the heart, in addition to thrombosis in the epicardium. FAdV was detected by PCR in liver samples, using specific primers for the hexon gene (52 K-fw and 52 K-rv) and was subjected to sequencing of the hypervariable region of this gene (Hex L1) for phylogenetic analysis, revealing FAdV -D serotype 11. This appears to be the first report of FAdV-D serotype 11 as the causative agent of an outbreak with vertical transmission of IBH in broiler breeders in Brazil.

Keywords: Avian pathology; viral tenosynovitis; viral hepatitis; poultry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Escores de lesões macroscópicas em frangos de corte com idades de abate entre 40 a 47 dias, condenados pelo SIF por artrite. 1-G1: Pele Grau 1 com hemorragia discreta. 1-G2: Pele Grau 2 com hemorragia moderada; 1-G3: Pele Grau 3 com hemorragia acentuada; 2-G1: Tendão gastrocnêmio Grau 1 com espessamento discreto, exsudato seroso discreto (asterisco); 2-G2: Tendão gastrocnêmio Grau 2 com espessamento moderado, hemorragias petequiais sem ruptura (asterisco); 2-G3: Tendão gastrocnêmio Grau 3 com espessamento acentuado, hemorragia acentuada e rompimento total (seta) 31
- Figura 2 – Histopatologia do tendão gastrocnêmio (A-B-D) (asterisco). (A) Peritendão com agregados linfoides (seta) Grau 1 HE. Obj. 4. (B) Agregados linfoides (seta) Grau 1 (seta) HE. Obj. 20. (C) Peritendão, gastrocnêmio. Infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos associada a macrófagos contendo pigmento granular acastanhado (hemossiderina) no citoplasma (seta) com hemorragia focalmente extensa acentuada (asterisco) Grau 2 Obj. 4. (D) Musculatura adjacente ao tendão com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e agregados linfoides (seta) Grau 1 HE. Obj. 10. Histopatologia da cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica (E-F) (asterisco). Exsudação fibrinosa, hemorragia, infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos Grau 2 Obj. 4. 33
- Figura 3 – Tendão flexor digital (asterisco). (A-B) Peritendão com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (seta) Grau 1 HE. Obj. 20. (C-E) Tendão extensor digital (asterisco). (C) Peritendão. Infiltrado discreto de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e hemorragia multifocal discreta (seta) Grau 2. HE. Obj. 4. (D) Peritendão com agregados linfoides (seta) Grau 1. HE. Obj. 20. (E) Peritendão com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e, plasmócitos (seta), além de necrose focal (cabeça de seta) Grau 2 HE. Obj. 4. F. Aumento maior de necrose focal tendão extensor digital (seta). HE. Obj. 10x..... 34
- Figura 4 - Árvore filogenética de estirpes Reovírus Aviário com base na variabilidade da sequência Sigma C. As estirpes de vírus agrupadas em 6 clusters de genotipagem. O isolado do presente trabalho está no cluster VI (área coloração verde) identificado como OQ99498. A árvore foi construída pelo método de junção de vizinhos com o modelo de distância genética Jukes-Cantor..... 36
- Figure 5 - Outbreak of FAdV-11 as a cause of inclusion body hepatitis in broiler chickens. A) Nine-day-old broiler birds with FAdV-11 infection showing clinical signs of lethargy and depression. B) Macroscopic appearance of the liver in a 9-day-old broiler with FAdV-11 infection. Markedly enlarged liver with an accentuated lobular (asterisk)..... 56
- Figure 6 - Curve of the daily mortality rate of the farm over the first 15 days of rearing period. Daily measurements represent the number of dead birds divided by the population at risk..... 57

Figure 7 - Outbreak of FAdV-11 as a cause of inclusion body hepatitis in broiler chickens. A) Liver: marked multifocal to coalescent necrosis of hepatocytes (asterisk). HE. Obj. 4x. Scale bar: 200 μ m. B) Liver: focally extensive, marked necrosis of hepatocytes (asterisk), surrounded by hepatocytes containing basophilic intranuclear inclusion bodies (arrow). HE. Obj. 40x. Scale bar: 20 μ m. C) Liver: hepatocytes containing basophilic intranuclear inclusion bodies (arrows), diffuse, pronounced. HE. Obj. 40x. Scale bar: 20 μ m. D) Heart: inflammatory infiltrate composed of lymphocytes and plasmocytes in the epicardium, diffuse, moderate (arrow), accompanied by focal thrombosis, moderate (asterisk). HE. Obj. 40x. Scale bar: 20 μ m..... 58

Figure 8 - FAdV antibodies titer from outbreak chickens at 9, 49, and 70 days of age. 59

Figure 9 - Phylogenetic analysis of FAdVs, based on the comparison of the 590 bp L1 region of hexon gene. The isolated from this study was classified as FAdV-D serogroup 11, identity ID 1223 (purplish area in the figure). The evolutionary analysis were conducted in MEGA5..... 60

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Classificação dos escores de análise macroscópica dos membros pélvicos de frango de corte abatidos de 40 a 47 dias de idade condenados por artrite..... | 26 |
| Tabela 2 - Classificação dos escores de lesões histológicas do tendão gastrocnêmio; tendão flexor digital; tendão extensor digital e cartilagem da articulação tibiotarsometatarsica de membros pélvicos de frango de corte abatidos de 40 a 47 dias de idade, condenados por artrite..... | 26 |
| Tabela 3 - Escores de lesão macroscópica e histológica de membros pélvicos condenadas pelo SIF por artrite em frangos de corte abatidos com idades entre 40 a 47 dias..... | 30 |
| Tabela 4 - Comparação dos indicadores zootécnicos de frangos de corte abatidos entre 40 a 47 dias, condenados por artrite pelo SIF entre lotes positivos e negativos na RTqPCR para Reovírus Aviário (ARV)..... | 35 |
| Tabela 5 - Análise de concordância de Kappa entre macroscopia, histopatologia e RTqPCR em tendão gastrocnêmio de 30 lotes de frangos de corte condenados por artrite..... | 37 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

RNA- Ácido ribonucleico

DNA - ácido desoxirribonucleico

ARV –Reovírus Aviário

σC – Sigma C

dsRNA - RNA fita dupla

RSS - Síndrome da Refugagem, em inglês *runtting-stunting*

MAS – Síndrome da má absorção

CT- Cycle threshold

IBH - Hepatite por corpúsculo de inclusão

HPS - Síndrome da hepatite-hidropericárdio

AGE- Erosão de moela Adenoviral

CAV- Anemia Infecciosa

FAdV - *Fowl aviadenovirus*

SPF - Specific-pathogen-free

ELISA - ensaio de imunoabsorção enzimática

RTqPCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real sucedida de Transcrição

Reversa

GPD- Ganho de peso diário

CA – Conversão alimentar

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| 2.1 OBJETIVOS GERAIS..... | 14 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 3.1 REOVÍRUS AVIÁRIO | 15 |
| 3.1.1 Histórico e agente etiológico | 15 |
| 3.1.2 Infecção e transmissão..... | 15 |
| 3.1.3 Sinais clínicos | 16 |
| 3.1.4 Métodos de diagnósticos | 17 |
| 3.2 ADENOVÍRUS..... | 18 |
| 3.2.1Histórico e agente etiológico | 18 |
| 3.2.2 Hepatite por corpúsculo de inclusão (IBH) | 19 |
| 3.2.3 Síndrome da hepatite-hidropericárdio (HPS)..... | 20 |
| 3.2.4 Erosão de moela Adenoviral (AGE) | 20 |
| 3.2.5 Diagnóstico..... | 21 |
| 4 ARTIGO 1 | 22 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.2.1 Colheita das amostras | 25 |
| 4.2.2 Avaliação macroscópica e histológica..... | 25 |
| 4.2.3 RTqPCR, sequenciamento e filogenia | 26 |
| 4.2.4 Análise estatística | 28 |
| 4.3 RESULTADOS | 28 |
| 4.4 DISCUSSÃO | 37 |
| 4.5 CONCLUSÃO..... | 43 |
| 4.6 REFERÊNCIAS | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 5 ARTIGO 2 | 50 |
| 5.1 INTRODUCTION..... | 52 |
| 5.2 MATERIAL AND METHODS..... | 53 |
| 5.2.1 Case History | 53 |
| 5.2.2 Sample collection | 53 |
| 5.2.3 Serology | 54 |
| 5.2.4 DNA extraction | 54 |
| 5.2.5 PCR amplification of the hexon gene | 55 |
| 5.2.6 Sequencing and analysis..... | 55 |
| 5.3 RESULTS..... | 56 |
| 5.4 DISCUSSION | 60 |
| 5.5 CONCLUSIONS | 63 |
| 5.6 REFERENCES..... | 63 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 70 |
| 6 REFERÊNCIAS GERAIS | 71 |

1 INTRODUÇÃO

A produção de carne de frango no Brasil é um dos setores do agronegócio que mais se destacam na geração de empregos diretos e indiretos sendo que no último ano foram produzidos cerca de 14,5 milhões de toneladas de carne de frango e 32% foram destinados à exportação (ABPA, 2022). O sucesso na cadeia de frango brasileira é resultado de um intenso trabalho de seleção, melhoramento genético, adoção de técnicas de manejo e medidas de biosseguridade. Os patógenos *Salmonella* spp. e *Mycoplasma* spp. tem grande relevância na saúde animal e pública, dessa forma ambos vêm sendo controlados ao longo dos anos por meio de trabalho conjunto entre Ministério da Agricultura, Serviço Veterinário Oficial Estadual, médicos veterinários e produtores.

As doenças causadas por agentes virais por sua vez, também possuem grande relevância econômica. Uma das preocupações geradas por alguns tipos de vírus é a capacidade das alterações em seus genótipos ao longo do tempo, prejudicando o desenvolvimento de imunidade específica para aves e podendo causar surtos. Atualmente, são utilizadas na avicultura dezenas de vacinas virais bem estabelecidas as quais são utilizadas nos programas de imunização dos lotes progenitores com grande êxito na maioria dos casos, inclusive responsáveis pelo controle e erradicação de algumas doenças em plantéis comerciais. Entretanto, existem algumas doenças virais remergentes como reovirose e adenovirose, que estão sendo relatadas por pesquisadores em diversos continentes, sendo responsáveis por perdas zootécnicas e mortalidades variadas (METTIFOGO et al., 2014; MATOS et al., 2016; SOUZA et al., 2018; DE CARLI et al., 2020; DE LA TORRE, et al., 2021, BERTRAN et al, 2021).

As artrites são classificadas em dois grupos: origem infeciosa e não infeciosa. Nos casos infecciosos, podem estar envolvidos Reovírus, *Mycoplasma synoviae*, *Salmonella Pullorum-Gallinarum* entre outros (GUO, et al, 2019; RECK, et al, 2019; DE LA TORRE, et al., 2021).

A artrite viral no frango de corte além dos prejuízos zootécnicos, ainda pode influenciar nas condenações totais ou parciais por artrite nos abatedouros com proporções variadas. Em um levantamento realizado por Oliveira et al., (2016), entre o período de 2006 a 2011, a artrite foi apontada como a quinta maior causa de condenações registradas no Serviço de Inspeção Federal Brasileiro. Já nas matrizes

de frango de corte, os problemas locomotores por Reovírus são causadores de prejuízos, pois geralmente culminam com dificuldade de locomoção, perda de peso, perda na produção de ovos, aumento do número de aves eliminadas e refugagem.

Estudos demonstram que as estirpes envolvidas nos surtos de Reovirose apresentam grande variação em relação às estirpes vacinais. Esta variação das estirpes interfere negativamente na eficiência das vacinas, sendo que as vacinas utilizadas atualmente, não protegem as aves de todos os subtipos patogênicos (LU et al., 2015; SELLERS, 2017; DE CARLI et al., 2020).

As vacinas autógenas são uma forma de melhorar a assertividade da conferência de imunidade mais específica com os desafios de campo. Para isto, a monitoria das estirpes circulantes deve ser contínua, com atualização das vacinas à medida que as estirpes evoluem (PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

Além disso, a adenovirose também é uma doença remergente na avicultura comercial com sinais clínicos e mortalidade variados. Nos últimos anos tem sido associada à quadros de hepatite por corpúsculo de inclusão (IBH), síndrome da hepatite-hidropericárdio (HPS) e erosão adenoviral de moela (AGE) (KAJÁN et al., 2019; BERTRAN et al., 2021).

A IBH em galinhas é caracterizada por morte aguda, necrose no fígado com corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos nos hepatócitos (RADWAN et al., 2019). A mortalidade em casos experimentais varia de 30 a 50% aos 9 dias pós-infecção (MATOS et al., 2016). No Brasil, até 2022 havia sido documentada somente a detecção do Adenovírus aviário nos plantéis. O diagnóstico da doença foi realizado em machos reprodutores de três semanas de idade, relacionado à hidropericárdio e hepatite por corpúsculos de inclusão (HHS) caracterizado pelo isolado FAdV E, co-infectado com vírus da anemia das galinhas (CAV) (MARÍN, et al., 2023). Dentro dos plantéis, uma das principais perdas relacionadas ao Adenovírus são as perdas por mortalidade (MITTAL et al., 2013; MATOS et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo foi descrever em frangos de corte, o envolvimento do Reovírus nas condenações por artrite em um abatedouro sob Inspeção Federal e a ocorrência de mortalidade em matrizes pela transmissão vertical de adenovírus no Sul do estado de Santa Catarina. Ambos englobam a análise macroscópica, histopatológica, molecular e genotípica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o envolvimento de Reovírus nas condenações por artrite de membros pélvicos em frangos de corte, não vacinados e oriundos de matrizes não vacinadas para este vírus, condenados em abatedouro sob Inspeção Federal utilizando diagnóstico macroscópico, histolopatológico e molecular;
2. Comparar as taxas de condenações por artrite em frangos de corte por sexo, idade, e diagnóstico molecular positivo para reovírus;
3. Comparar se os isolados a campo de reovírus são semelhantes às estirpes presentes nas vacinas comerciais;
4. Realizar investigação epidemiológica e avaliar o envolvimento do Adenovírus em casos de alta mortalidade em matrizes;
5. Realizar o diagnóstico de adenovirose por exames macroscópico, histolopatológico e molecular.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 REOVÍRUS AVIÁRIO

3.1.1 Histórico e agente etiológico

Dentro das afecções do sistema locomotor, além das causas bacterianas, o reovírus aviário (ARV) têm sido associado no envolvimento de problemas articulares ao longo dos últimos anos (SOUZA et al., 2018; DE CARLI et al., 2020).

O reovírus, também conhecido como Orthoreovírus aviário (ARV) é um vírus endêmico considerado um dos agentes etiológicos da artrite viral em aves, ocasionando lesões inflamatórias crônicas na articulação tibiometatarsica. O ARV pertencente à família *Reoviridae*, gênero *Orthoreovirus*, é um RNA vírus de fita dupla, não envelopado, icosaédrico, com aproximadamente 80 nm de diâmetro (VAN DER HEIDE, 2000). O genoma é dividido em dez segmentos, agrupados em três classes, de acordo com os tamanhos: grandes (L1, L2 e L3), médios (M1, M2 e M3) e pequenos (S1, S2, S3 e S4). O genoma viral codifica 12 proteínas, sendo oito delas estruturais e quatro não-estruturais, identificadas por letras gregas, de acordo com a classe de segmentos genômicos e consequentemente, suas respectivas massas moleculares (TANG et al., 2016). As partículas virais permanecem infectantes por pelo menos dez dias em superfície de cascas de ovos com a presença de material fecal e em água potável sobrevive por pelo menos 10 semanas com pouca perda de infectividade (SAVAGE e JONES, 2003).

3.1.2 Infecção e transmissão

A transmissão por ARV pode ocorrer de forma horizontal por infecção fecal-oral (JONES, 1978), lesões de pele nos coxins plantares (JONES, 2000) ou transmissão vertical com tendência a persistir por longos períodos nas tonsilas cecais e articulação tibiometatarsica de aves jovens infectadas (JONES e GEORGIOU, 1984).

Estudos experimentais com transmissão vertical demonstraram que foram encontradas taxas de detecção na progénie de 8,5% no fígado, 5,7% na articulação e

4,2% em intestinos, sendo que as taxas de transmissão foram menores se comparado uma estirpe sensível a tripsina, demonstrando que há diferenças de transmissão conforme a estirpe (MENENDEZ; CALNEK e COWEN, 1975).

O período de incubação varia com a estirpe e a condição da ave no momento da infecção. Estudos experimentais mostram que após uma semana de inoculação, lesões já podem ser observadas nas articulações (CLARK et al., 1990; VASCONCELOS et al., 2001a). A replicação viral pode ocorrer tanto na mucosa do sistema respiratório quanto do digestório. A viremia ocorre entre 24 a 48 horas com disseminação do agente para os demais tecidos (VASCONCELOS et al., 2001b). Mesmo quando causada por uma estirpe com afinidade pelo tecido articular, estudos mostram que nos estágios iniciais da infecção, o vírus está distribuído em diversos tecidos e seu principal local de replicação em infecções experimentais foi o epitélio do intestino e bursa de fabricius 12 horas após a infecção (JONES; ISLAM e KELLY, 1989).

Tang et al. (2016) demonstraram a primeira coinfecção natural de duas variantes de ARV em aves poedeiras jovens de 14 semanas de idade, fornecendo evidências de coinfecção por diferentes estirpes pertencentes as linhagens III e V.

3.1.3 Sinais clínicos

O curso dos sinais clínicos após infecção por reovírus é dependente da idade do hospedeiro, *status* imune, patótipo viral e via de exposição (oral, podal ou respiratória). Aves jovens são mais susceptíveis ao ARV, podem apresentar dificuldade de locomoção edema e alterações na coloração da articulação tibiotarsometatarsica. Além das diferenças de tropismos entre as estirpes existe uma gama de virulência alta até praticamente inofensiva do ARV (PITCOVSKI e GOYAL, 2020; ROSENBERGER et al., 1989).

Em aves adultas como lotes de matrizes, as infecções por ARV costumam apresentar sinais clínicos imediatamente antes do início ou durante a produção de ovos que pode ser caracterizada por claudicação, aumento da mortalidade, diminuição da produção e ovos, infertilidade e transmissão vertical para a progénie (PITCOVSKI e GOYAL, 2020). Rupturas do tendão gastrocnêmio podem ser observados (TROXLER et al., 2013) que podem estar associadas ou não à pericardite, miocardite hidropericárdio, desuniformidade no crescimento e mortalidade (JONES, 2013).

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

3.1.4 Métodos de diagnósticos

Como os reovírus aviários tem distribuição ubíqua e na maioria das vezes, não patogênico, o isolamento do vírus apenas do intestino não tem sentido na interpretação de tenossinovite viral. O isolamento e detecção molecular do vírus nos tecidos da articulação tibiotarsometatarsica pode ser utilizado como evidência, preferencialmente associado aos sinais clínicos e alterações macroscópicas. No entanto, o vírus pode não ser isolado das articulações em estágios mais avançados da infecção (PITCOVSKI e GOYAL, 2020).

Para o diagnóstico, a associação de mais de um exame é a melhor opção quando se suspeita de artrite viral (DE HERDT et al., 2008). Os sinais clínicos da lesão articular por ARVs não são patognomônicos, podendo ser similares aos causados por outros agentes ou por uma associação dos mesmos (JONES, 2000). O diagnóstico presuntivo de ARV pode ser realizado com base nas lesões, sinais clínicos e histórico do lote, porém o diagnóstico definitivo só pode ser feito após a confirmação com exames laboratoriais. Para diagnóstico o material pode ser coletado da articulação tibiotarsometatarsica como tendões, articulação e líquido articular (ZHANG et al., 2019).

As alterações histopatológicas encontradas em infecções por ARV na articulação tibiotarsometatarsica são hiperplasia das células sinoviais, com infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear associado a restos celulares e fibrina no espaço articular. Na membrana sinovial e na inserção do músculo no tendão, há também um predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear (SOUZA et al., 2018).

O diagnóstico molecular demonstra ser uma excelente opção, permitindo caracterizar e classificar as estirpes envolvidas em surtos de campo e diferenciá-las das estirpes vacinais (LIU, 2004). O segmento do gene M1 é o mais conservado entre os demais segmentos do ARVs, sendo a região de escolha para os testes de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para determinar a diversidade genética das estirpes, a região de escolha para amplificação

por RT-PCR é a de maior variabilidade do genoma, o segmento do gene S1 (FARKAS et al., 2016).

O exame sorológico pode ser realizado utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunodifusão em gel de ágar, vírus neutralização, imunofluorescência indireta e *Western Blot* (JONES, 2000). Em animais não vacinados, a sorologia pode contribuir com informações relevantes, pois a presença de animais soropositivos no caso de aves recém-nascidas significa que tiveram transmissão de imunidade materna e em aves com mais de uma semana de idade indica que tiveram contato com o vírus e desenvolveram anticorpos. Isoladamente, a sorologia não deve ser utilizada como método de diagnóstico. Deve sempre ser associada aos demais métodos para um diagnóstico preciso e completo.

3.2 ADENOVÍRUS

3.2.1 Histórico e agente etiológico

Adenovirose é uma doença remergente na avicultura comercial com sinais clínicos e mortalidade variados. Nos últimos anos tem sido associada à quadros de hepatite por corpúsculo de inclusão (IBH), Síndrome da hepatite-hidropericárdio (HPS) e erosão adenoviral de moela (AGE) (SCHACHNER et al., 2018). O vírus tem uma distribuição mundial e parece ser umbíquo na população avícola, como demonstrado por monitoramento sorológico e estudos virológicos em espécimes de aves doentes e saudáveis (ADAIR e FITZGERALD, 2008).

Os adenovírus são membros da família *Adenoviridae*, divididos em seis gêneros: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus* e *Testadenovirus*, acometendo diferentes espécies de mamíferos, répteis e aves. Nas aves, o gênero de maior importância é o Aviadenovirus, sendo este dividido em cinco espécies de adenovírus aviário [em inglês, *Fowl aviadenovirus* (FAdV)] A, B, C, D e E e 12 sorovares A-1, B-5, C-1-4, C-10, D-2, D-3, D-9, D-11, E-6, E-7, E-8a, e E-8b (ICTV 2022). Trata-se de um vírus com cadeia dupla de DNA, não envelopado, não segmentado com estrutura icosaédrica, diâmetro entre 70-90 nm (ADAIR e FITZGERALD, 2008).

Historicamente, a IBH foi relatada pela primeira vez em galinhas por Helmboldt e Frazier (1963), que descreveram como uma "catástrofe hepática aguda" devido à

extensão das lesões hepáticas. Nos anos subsequentes, a IBH foi relatada mundialmente como o resultado de infecções por adenovírus aviário FAdVs e agentes imunossupressores como o vírus da doença de Gumboro (IBDV) e o vírus da Anemia Infecciosa (CAV), em que FAdVs foram considerados agentes oportunistas (HOFFMANN et al., 1975; ROSENBERGER et al., 1975; FADLY e WINTERFIELD, 1973). Em contrapartida, estudos realizados na Austrália, Nova Zelândia, Canadá, Japão e Espanha documentaram surtos de IBH na ausência de fatores predisponentes, fortalecendo o papel dos FAdVs como possíveis patógenos primários (REECE; GRIX e BARR, 1986; CHRISTENSEN e SAIFUDDIN, 1989; GOMIS et al., 2006; NAKAMURA et al., 2011; SCHACHNER et al., 2018; BERTRAN et al., 2021).

3.2.2 Hepatite por corpúsculo de inclusão (IBH)

A IBH é caracterizada por quadro agudo em frangos jovens de até 5 semanas de idade, marcada pelo aumento súbito da mortalidade que ocasionalmente pode variar de 10 até 30% (SCHACHNER et al., 2016). Um estudo retrospectivo de 2011 a 2021 de casos de IBH na Espanha, demonstrou que a maioria dos casos levantados ocorreram em frangos de corte (92,21%), causados pelos sorotipos FAdV-8b e FAdVe-11, enquanto os casos em reprodutoras os sorotipos prevalentes foram FAdV-2, FAdV-11, e FAdV-8b (BERTRAN et al., 2021).

Após inoculação por via oral foi demonstrado que o vírus coloniza duodeno, íleo, ceco e tonsilas cecais em até 12 horas pós-infecção e 2 a 3 dias pós-infecção o vírus já pode ser encontrado nos órgãos alvos como fígado e pâncreas (SAIFUDDIN e WILKS, 1991). A recuperação das aves acometidas se dá por volta dos 7 a 9 dias após início dos sinais clínicos e se manifesta com a redução da severidade dos sinais clínicos, regeneração celular e diminuição da excreção viral nos órgãos alvo (STEER et al., 2015).

As lesões macroscópicas da IBH caracterizam-se por fígado friável, vermelho-pálido e aumentado de tamanho (NAKAMURA, et al., 2011). Ainda podem ser observados pequenos pontos brancos, petéquias e equimoses (WILSON e WILLS et al., 2010).

Os achados histopatológicos consistem em necrose multifocal dos hepatócitos com corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos, onde estas inclusões são observadas próximas a focos necróticos. No pâncreas pode ser observado necrose

das células acinares com inclusões basofílicas intranucleares (NAKAMURA, et al., 2011).

3.2.3 Síndrome da hepatite-hidropericárdio (HPS)

A HPS foi relatada pela primeira vez em 1980 no Pasquistão (ANJUM; SABRI e IQBAL, 1989) e subsequente em outros países asiáticos onde continua endêmico e em alguns países da América Latina (MAZAHERI et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 2014; VERA-HERNÁNDEZ et al., 2016). O sorotipo viral envolvido com esta apresentação clínica é o FAdV-4 (espécie C).

Os principais relatos são em frango de corte, com idade de 3 a 6 semanas (CHEEMA 1989; MITTAL et al., 2014). As lesões anatomo-patológicas são semelhantes as descritas na IBH, porém mais pronunciadas com acúmulo de líquido translúcido no pericárdio (hidropericárdio) (VERA-HERNÁNDEZ et al., 2016). Entretanto, em alguns surtos de HPS foi reportado a ausência de hidropericárdio. As lesões hepáticas na HPS assim como na IBH são caracterizadas por aumento do fígado com alteração na coloração, pontos necróticos e petéquias, em muitos casos a condição é denominada IBH-HPS (RODRÍGUEZ et al., 2014).

No exame histopatológico pode ser observado extensa necrose hepática, hemorragia e exsudato fibrinoso. Os núcleos hepatocelulares são frequentemente obliterados por corpúsculos de inclusão intranuclear basofílicos, ocasionalmente por corpúsculos de inclusão eosinofílicos e cromatina periférica (METE, 2021). Em aves infectadas experimentalmente, os corpúsculos de inclusão intranucleares basofílicos nos hepatócitos puderam ser observados do quinto ao sétimo dia pós-infecção. Entretanto, estas lesões não foram mais encontradas do décimo quarto ao vigésimo oitavo dia (RODRÍGUEZ et al., 2014).

3.2.4 Erosão de moela Adenoviral (AGE)

A AGE é causada pelo FAdV-1 (espécie A) (NICZYPORUK, 2016) que foi caracterizada pela primeira vez por Ono et al., (2001), em moelas condenadas em frigorífico. Esta estirpe tem sido relacionada com retardos no crescimento, alta mortalidade e condenações em abatedouros (SCHACHNER, et al., 2018).

As alterações macroscópicas na AGE consistem em múltiplas áreas amarronzadas ou enegrecidas na moela e áreas de erosão ou espessamento na membrana coelina e/ou ulceração da mucosa. No exame histopatológico podem ser observados corpúsculos de inclusão basofílicos que podem ser vistos próximos ou nos focos necróticos. Na lâmina própria, pode ser observado exsudado fibrinoso contendo células inflamatórias compostas por células mononucleares e heterófilos (ONO et al., 2003; GRAFL et al., 2012).

3.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser realizado através da junção dos sinais clínicos, lesões macroscópicas, histopatológicas e exames complementares como isolamento viral e exames moleculares. O isolamento viral pode ser realizado com células de embriões livre de patógenos (*Specific pathogen free - SPF*). Nesta técnica são inoculadas amostras do tecido acometido, como por exemplo fígado ou moela nas células de embrião SPF e, posteriormente, é observado o efeito citopático. O DNA viral pode ser extraído do sobrenadante do cultivo de células embrionadas (SOUMYALEKSHMI et al., 2014).

Para detecção do FAdV, é extraído o DNA amplificando o *loop-1* (L1), região do gene hexon, seguido do sequenciamento do produto da PCR. Para identificação dos 12 genótipos de FAdVs pode ser realizada a comparação de região L1 do produto de 590 bp do gene hexon (STEER et al., 2009).

Para a detecção de anticorpos, pode ser utilizados kits comerciais como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), na qual geralmente tem-se um antígeno de grupo comum aos 12 sorotipos fornecendo um amplo espectro para detecção (BioChek Ltd, London, UK).

4 ARTIGO 1

Reovírus aviário (ARV) em frangos de corte condenados por artrite no Sul do Brasil: caracterização anatomo-patológica e molecular

Elizabeth B. Batista¹, Jéssica A. Withoeft¹, Anna Laura de Oliveira Cunha¹, André Fonseca², Patricia Hoepers³ e Renata A. Casagrande^{1*}

¹Laboratório de Patologia Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, Santa Catarina, Brazil.

²Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul 94940-030, Brazil

³Universidade Federal de Uberlândia (UFU) Uberlândia - MG, Brazil.

*Corresponding author: Renata Assis Casagrande, Laboratório de Patologia Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luís de Camões, 2090, Conta Dinheiro, 88520-000, SC, Brazil.
renata.casagrande@udesc.br.

Resumo

As condenações nos abatedouros são uma causa recorrente de prejuízos para indústria. O objetivo deste estudo foi avaliar o envolvimento do ARV nas condenações por artite em um abatedouro sob Inspeção Federal de frangos de corte pesado. Foram coletados aleatoriamente 150 membros pélvicos condenados pela causa “artite” pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), provenientes de 30 lotes junto à linha de inspeção no momento da condena. Para a detecção de ARV, a partir de *pool* de cinco tendões gastrocnêmio de cada lote, foi realizado reação em cadeia da polimerase em tempo real sucedida de transcrição reversa (RTqPCR) utilizando os primers ReoS-F1, ReoS-R1 e ReoS-F2, ReoS-R2 e o sequenciamento pelo método Sanger com amplificação do gene σC. Para análise macroscópica e histopatológica foram avaliados os tendões gastrocnêmio, flexor e extensor digital, cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica. As lesões foram classificadas em quatro níveis que variaram de G0 (sem alterações) até G3 (maior grau de lesão). Na avaliação dos escores de lesão macroscópicas observou-se uma maior porcentagem de lesão no tendão gastrocnêmio se comparado ao tendão extensor e flexor. As alterações histológicas

situaram-se no peritendão e musculatura adjacente aos tendões, no tendão gastrocnêmio, flexor e extensor digital onde foram observados infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos por ora com agregados linfoides, hemorragia e exsudato fibrinoso. ARV foi detectado em 50% dos lotes por RTqPCR. No sequenciamento identificou a estirpe na linhagem VI. A melhor concordância entre os métodos de diagnóstico no teste de *Kappa Fleiss* foi macroscopia versus histopatologia. Conclui-se que metade dos lotes foram positivos para ARV sem correlação com aumento da condenação por artrite.

Palavras-chave: avicultura, tenossinovite, “joelho verde”, *Avian orthoreovirus*.

4.1 INTRODUÇÃO

Reovírus são vírus RNA de dupla-fita (double-stranded-RNA; dsRNA), não envelopados, icosaédricos, têm aproximadamente 80 nm de diâmetro de duplo capsídeo e infectam uma grande variedade de hospedeiros (SCHNITZER, RAMOS e GOUVEA, 1982; LOUIS VAN DER HEIDE, 2000). Pertence à espécie *Avian orthoreovirus* gênero *Orthoreovirus* (ICTV, 2022), seu genoma consiste em 10 segmentos de dsRNA sendo três segmentos grandes (L1, L2, L3), três segmentos médios (M1, M2, M3), e quatro segmentos pequenos (S1, S2, S3, S4) (PITCOVSKI; GOYAL, 2020). O genoma ARV codifica dez proteínas estruturais (λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, μ BC, μ BN, σ A, σ B, e σ C) e quatro proteínas não estruturais (μ NS, σ NS, p17, e p10) (BODELÓN et al., 2001; TANG e LU, 2016). O fragmento do gene S1 codifica a proteína do capsídeo menor σ C e é um dos segmentos mais variáveis em todo o genoma (SU et al., 2006), e está envolvido na ligação celular e na produção de anticorpos neutralizantes (JONES, 2013). Para os estudos filogenéticos utiliza-se genes com alta taxa de substituições de nucleotídeos principalmente σ C. As estirpes de ARV são classificadas em diferentes genótipos/clusters de acordo com a diversidade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos atualmente divididas em seis linhagens filogenéticas distintas (I, II, III, IV, V e VI) (LU et al., 2015; AYALEW et al., 2017).

Aves acometidas por ARV podem apresentar artrite/tenossinovite, doenças respiratórias/entéricas e imunocomprometimento. No Brasil, há estudos que citam o envolvimento do vírus com a síndrome da refugagem (*runtting stunting syndrome-RSS*) e a síndrome de má absorção (MAS), porém estes não possuem evidências

histopatológicas que comprovem o envolvimento do ARV (DE CARLI et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2021).

A artrite/tenossinovite causada pelo ARV varia em patogenicidade, desde infecção subclínica a casos com lesões graves (ROSENBERGER et al., 1989; SOUZA et al., 2018; LUNGE et al., 2022). Na transmissão horizontal a replicação primária ocorre no epitélio intestinal e Bursa de Fabrício, dentro de doze horas, ocorrendo distribuição para os outros tecidos em 24 a 48 horas (JONES et al., 1994).

Macroscopicamente, na articulação tibiometatarsica é observado aumento de volume, edema, hemorragias e exsudado seroso entre os tendões e a articulação, podendo em alguns casos estar associado a rompimento de tendões (KERR; OLSON 1969; SOUZA et al., 2018).

A artrite nas aves pode ser causada por outros agentes infecciosos, o diagnóstico presuntivo de reovirose é baseado nos sinais clínicos e lesões macroscópicas, e outras causas infecciosas precisam ser descartadas como *Mycoplasma synoviae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Pullorum* (NAZIA et al., 2015; DE LA TORRE et al., 2021; RECK et al., 2019; STALKER et al., 2010; HAMEED, ULAIWI e HAMAD, 2022).

A artrite é uma das principais causas de perdas e condenação de carcaça nos abatedouros nos últimos anos no Brasil (SOUZA et al., 2018). Um estudo realizado entre os anos de 2009 até 2019, o qual avaliou os índices de ocorrência de condenação em frangos *griller* e pesados em abatedouros habilitados para exportação no Brasil, demonstrou uma frequência de condenação de 4% para artrite total e parcial, sendo a quinta causa de condenação (Hortêncio et al., 2022). No ano de 2022, segundo os registros do Serviço de Inspeção Federal (PGA-SIGSIF) foram 450.217 frangos condenados por artrite (BRASIL, 2022). O objetivo deste estudo é caracterizar as lesões anatomo-patológicas em carcaças de frangos de corte pesados condenados por artrite em um frigorífico na região Sul do Brasil e relacioná-las com infecção por ARV.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Colheita das amostras

Foram coletadas aleatoriamente na linha de abate 150 membros pélvicos condenados por artrite pelo Serviço de Inspeção Federal, provenientes de 30 lotes de frango de corte pesado, linhagem ROSS 91 TM4, destes 9 lotes compostos por fêmeas e 21 lotes compostos por machos. Todos criados e abatidos na região litoral Sul de Santa Catarina. A idade média dos lotes avaliados foi de 42,9 dias, variando de 40 a 47 dias, no período de julho a agosto de 2021.

Fragmento do tendão gastrocnêmio do membro condenado foi coletado e separado por lotes de origem, em microtubos livres de RNase e DNase e acondicionados a -80°C para análise molecular. Para análise histopatológica foram coletados de cada membro fragmento de cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica, tendão gastrocnêmio, tendão flexor digital e tendão extensor digital os quais foram fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas. Posteriormente, os fragmentos foram incluídos em parafina, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE).

4.2.2 Avaliação macroscópica e histológica

Para análise macroscópica foi utilizada a classificação conforme descrita na Tabela 1 e para a descrição das lesões histológicas os escores de lesões foram classificados conforme a Tabela 2.

Tabela 1- Classificação dos escores de análise macroscópica dos membros pélvicos de frango de corte abatidos de 40 a 47 dias de idade condenados por artrite.

| Grau | Pele da sobrecoxa | Musculatura da sobrecoxa e subcutâneo | Tendões gastrocnêmio, flexor digital e extensor digital | Articulações tibiotarsometatarsica ¹ e tarsometatarso-falangeana ¹ |
|------|----------------------------------|---|---|--|
| G0 | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações | Sem alterações |
| G1 | Edema e/ou hemorragia, discretas | Hemorragias e/ou edema focal ou multifocal leves | Espessamento e exsudato seroso discreto | Discreto aumento de volume e exsudato seroso |
| G2 | Edema e/ou hemorragia, moderadas | Hemorragias e/ou edema multifocal moderados | Espessamento e petéquias moderado, sem ruptura | Aumento de volume moderado, hemorragia discreta a moderada e/ou exsudato fibrinoso |
| G3 | Edema e/ou hemorragia acentuados | Hemorragias e/ou edema multifocal a focalmente extenso acentuados | Espessamento e hemorragia acentuada, com rompimento total | Aumento de volume acentuado, hemorragia acentuada e/ou exsudato fibrinoso |

¹cartilagem articular, cápsula articular e líquido sinovial

Tabela 2 - Classificação dos escores de lesões histológicas do tendão gastrocnêmio; tendão flexor digital; tendão extensor digital e cartilagem da articulação tibiotarsometatarsica de membros pélvicos de frango de corte abatidos de 40 a 47 dias de idade, condenados por artrite.

| Grau | Descrição |
|------|---|
| G0 | Sem alterações |
| G1 | Discreto infiltrado de heterófilos, e/ou macrófagos, e/ou linfócitos, e/ou plasmócitos, e/ou agregados linfoïdes, e/ou necrose, e/ou exsudação fibrinosa e/ou hemorragia |
| G2 | Moderado infiltrado de heterófilos, e/ou macrófagos, e/ou linfócitos, e/ou plasmócitos, e/ou agregados linfoïdes, e/ou necrose, e/ou exsudação fibrinosa e/ou hemorragia |
| G3 | Acentuado infiltrado de heterófilos, e/ou macrófagos, e/ou linfócitos, e/ou plasmócitos, e/ou agregados linfoïdes, e/ou necrose, e/ou exsudação fibrinosa e/ou hemorragia |

4.2.3 RTqPCR, sequenciamento e filogenia

Foram constituídos pools a partir de cinco fragmentos de tendão gastrocnêmio, de um total de cinco aves por lote, para a extração de RNA utilizando kits comerciais NewGene Prep e NewGene PreAmp, de acordo com as recomendações do fabricante (Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Brasil). Para a detecção do ARV, foi aplicada a reação em cadeia da polimerase em tempo real sucedida de Transcrição Reversa

(RTqPCR), com amplificação específica de região conservada do genoma viral com o kit NewGene REOAmp (Symbios Biotecnologia) (LU et al., 2015). Como controle positivo, foi utilizada a estirpe vacinal S1133 e para o controle negativo foi aplicada água ultrapura. Sumariamente, 2 µL do RNA extraído foram adicionados a 27,75 µL de mastermix NewGene REOAmp, juntamente com 0,25 µL de enzimas RTTaq. As condições de amplificação foram de um ciclo de desnaturação inicial de 3 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15s a 95°C e 60s a 60°C, no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA). A avaliação do resultado foi conduzida diretamente no equipamento pela análise da presença de curvas de amplificação e determinação dos respectivos valores do ciclo limiar [*cycle threshold* (CT<40)] foi considerado positivo para detecção.

A genotipagem foi realizada por RTqPCR com sequenciamento do gene σC. DNA complementar foi produzido com MMLV RT mastermix e posteriormente amplificado por nested PCR. A primeira PCR foi realizada com os primers ReoS-F1 (5'-TCRCAGCGAAGAGARGTCG-3') e ReoS-R1 (5'-GTCGATGCCSGTACGCACG-3'), em volume total de 30 µL com 0,25 uM de cada primer direto e reverso. As condições de ciclagem foram as seguintes: 37°C por 30 min, 95°C por 3 min e 30 ciclos de 95°C por 20 s, 50°C por 40 s e 72°C por 60 s, produzindo fragmento de 956 pb. A segunda rodada de PCR foi realizada com 0,25 uM de ReoS-F2 (5'-TGATACTSTCMTTGACTTCGAACG-3') e ReoS-R2 (5'-CGACATCATRTAATCAGTKCG-3'). As condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de 20 s para desnaturação a 95°C e 40 s de anelamento de primer a 50°C, 60 s de extensão a 72°C produzindo fragmento de 652 pb. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Ambas as cadeias dos produtos de PCR foram sequenciadas pelo método de Sanger e posteriormente montadas usando Geneious v10.2.3 (Biomasters, www.geneious.com). As sequências obtidas foram alinhadas com Mafft (KATOH e STANDLEY, 2013) com referência das linhagens I, II, III, IV, V e VI, conforme descrito anteriormente (LU et al., 2015). A árvore filogenética foi construída com base na sequência de aminoácidos da proteína σC pelo método de junção de vizinhos com o modelo de distância genética de Jukes-Cantor. A robustez da hipótese foi testada com 2.000 análises bootstrap não paramétricas. Para análise filogenética dos nucleotídeos, e suas decorrentes composições de aminoácidos, utilizou-se a classificação descrita anteriormente (LU et al., 2015; SOUZA et al., 2018).

Todas as amostras foram testadas para *Mycoplasma synoviae* (MS), a extração do DNA, foram constituídos *pools* a partir de cinco fragmentos de tendão gastrocnêmio, de um total de cinco aves por lote seguindo as instruções do fabricante (IndiMag® Pathogen Kit). Para amplificação foi utilizado QuantiNova Probe PCR Kit, com base no produto de 207pb, MS-F 5'GAGAAGCAAAATAGTGATATCA3' MS-R 5'CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA3' (LAUERMAN et al., 1993), seguindo as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado antígeno comercial SAR MS Inata. A visualização dos resultados das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

4.2.4 Análise estatística

Para identificar fatores que possam estar relacionados com as condenações por artrite, foram avaliadas as informações das fichas de acompanhamento do lote e os dados obtidos no frigorífico tais como mortalidade, conversão alimentar, peso médio, idade ao abate e porcentagem de condenações por artrite, as quais foram submetidas à análise de normalidade de Shapiro Wilk. Para os dados fora da curva de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico Qui-quadrado ($p<0,05$).

Para a avaliação da correlação das lesões macroscópicas, histopatológicas do tendão gastrocnêmio e RTqPCR, foi empregado o teste de concordância *Kappa de Fleiss* (FLEISS, LEVIN e PAIK, 2013), com intervalo de confiança de 95%. O valor do coeficiente de concordância de *Kappa* varia de 0 até 1, sendo que quanto mais próximo de 1 for seu valor maior é o indicativo de que existe concordância entre as avaliações.

Valores entre 0 e 0,2 indicam concordância fraca; entre 0,21 e 0,4 indicam concordância razoável; entre 0,41 e 0,6 indicam concordância moderada; entre 0,61 e 0,8 indicam forte concordância e entre 0,81 e 1 indicam concordância quase perfeita. Além disso, se os valores encontrados forem zero ou negativos, a concordância encontrada foi menor que a esperada pelo acaso (ALTMAN, 1991).

4.3 RESULTADOS

Os lotes de frango, bem como as matrizes de origem não receberam vacinação para reovírus. Dos 30 lotes avaliados, 50% (15/30) foram positivos na RTqPCR para

ARV sendo que a condenação média por artrite pelo Sistema de Inspeção Federal dos lotes foi de 1,08%.

Dos 150 membros pélvicos avaliados, houve maior porcentagem de condenação por artrite parcial/unilateral em 77,3% (116/150) se comparado à condenação total/bilateral com 22,7% (34/150). Quanto a coloração da pele em 62,7% (94/150) foram classificadas como avermelhadas, 14% (21/150) como amareladas e 1,3% (2/150) como esverdeada, sendo que o restante 22% (33/150) apresentavam-se normais.

Quanto à classificação dentro dos escores de lesão macroscópica (Tabela 3), na pele, 48,7% (73/150) foram classificadas como Grau 1, edema e/ou hemorragia discretas; 20% como Grau 2 (30/150) edema e/ou hemorragia moderada e 6% (9/150) como Grau 3, edema e/ou hemorragia acentuada. Já na musculatura da coxa 40% (60/150) das lesões foram classificadas como Grau 2, hemorragias e/ou edema multifocal moderado; 36% (54/150) Grau 1, hemorragias e/ou edema focal ou multifocal leve e 4% (6/150) como Grau 3, hemorragias e/ou edema multifocal a focalmente extenso acentuado.

Na avaliação da articulação tibiotarsometatarsica onde contemplou a avaliação da cartilagem articular, cápsula articular e líquido sinovial, 66% (99/150), não apresentaram lesões (grau 0); 16% (24/150) apresentaram discreto aumento de volume e exsudato seroso (grau 1); 16,67% (25/150) aumento moderado, hemorragia discreta a moderada e/ou exsudato fibrinoso (grau 2) e somente 1,3% (2/150) aumento de volume acentuado, hemorragia acentuada e/ou exsudato fibrinoso (grau 3).

Na avaliação da articulação tarsometatarso-falangeada onde contemplou a avaliação da cartilagem articular, cápsula articular e líquido sinovial, foi observado lesões somente em 2,6% (4/150), com discreto aumento de volume e exsudato seroso (grau 1).

Ainda, na avaliação dos escores de lesão macroscópicas dos tendões, observou-se maior porcentagem de lesão no tendão gastrocnêmio se comparado ao tendão extensor e flexor digital, sendo que 39,3% (59/150) dos tendões gastrocnêmio avaliados apresentaram Grau 1, com discreto espessamento e exsudato seroso; 12% (18/150) com Grau 2 apresentando hemorragias petequiais, espessamento moderado porém sem ruptura e apenas 2% (3/150) estavam acentuadamente espessados, com hemorragia acentuada e rompimento total (Grau 3). A Figura 1 demonstra os

diferentes escores macroscópicos de lesões na pele, musculatura e tendão gastrocnêmio.

Na avaliação do escore de lesões histológicas (Tabela 3) dos tendões e da cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica demonstrou que o tendão gastrocnêmio apresentou maior porcentagem de lesões se comparado aos demais tecidos avaliados sendo que em 46,67% (70/150) foram classificadas como Grau 1 e 6,67% (10/150) Grau 2.

Tabela 3 - Escores de lesão macroscópica e histológica de membros pélvicos condenadas pelo SIF por artrite em frangos de corte abatidos com idades entre 40 a 47 dias.

| Graus | Escores de lesões macroscópicas | | | | Escores de lesões histológicas | | | |
|------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|--|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|---|
| | Tendão Gastrocnêmio | Tendão extensor digital | Tendão flexor digital | Articulação tibiotarsometatarsica ¹ | Tendão Gastrocnêmio | Tendão extensor digital | Tendão flexor digital | Cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica |
| G 0 | 46,70% (70/150) | 99,30% (149/150) | 97,30% (146/150) | 66,00% (99/150) | 46,67% (70/150) | 82 % (123/150) | 86 % (129/150) | 85,33 % (128/150) |
| G 1 | 39,30% (59/150) | 0,70% (1/150) | 2,70% (4/150) | 16,00% (24/150) | 46,67% (70/150) | 15,34 % (23/150) | 14 % (20/150) | 12,66 % (19/150) |
| G 2 | 12% (18/150) | 0 | 0 | 16,67% (25/150) | 6,67% (10/150) | 2,67 % (4/150) | 0 | 2 % (3/150) |
| G 3 | 2% (3/150) | 0 | 0 | 1,33% (2/150) | 0 | 0 | 0 | 0 |

¹ cartilagem articular, cápsula articular e líquido sinovial



Figura 1 - Escores de lesões macroscópicas em frangos de corte com idades de abate entre 40 a 47 dias, condenados pelo SIF por artrite. 1-G1: Pele Grau 1 com hemorragia discreta; 1-G2: Pele Grau 2 com hemorragia moderada; 1-G3: Pele Grau 3 com hemorragia acentuada; 2-G1: Tendão gastrocnêmio Grau 1 com espessamento discreto, exsudato seroso discreto (asterisco); 2-G2: Tendão gastrocnêmio Grau 2 com espessamento moderado, hemorragias petequiais sem ruptura (asterisco); 2-G3: Tendão gastrocnêmio Grau 3 com espessamento acentuado, hemorragia acentuada e rompimento total (seta).

Nas alterações histológicas observou-se no peritendão e musculatura adjacente do tendão gastrocnêmio infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos discreto em 35,33% (53/150); infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos moderado em 1,33% (2/150); infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos com agregados linfoides discreto em 10,6% (16/150) (Figuras 2A-B-C), infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, com agregados linfoides moderado em 4,6% (7/150); hemorragia

focalmente extensa com exudação fibrinosa acentuada em 1,33% (2/150) e hemorragia focalmente extensa acentuada associada a macrófagos contendo pigmento granular acastanhado (hemossiderina) no citoplasma em 0,66% (1/150) (Figura 2-D).

Na cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica havia infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos discreto em 9,33% (14/150); infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos com agregados linfoides discreto em 3,3% (5/150); infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, com agregados linfoides moderado em 1,3% (2/150) hemorragia focalmente extensa com exudação fibrinosa acentuada em 0,66% (1/150) e necrose com exsudação fibrinosa e infiltrado predominante de heterófilo em 1,33% (2/150) (Figuras 2 E-F).

No peritendão do tendão flexor digital e extensor digital foram encontrados os mesmos tipos de infiltrado que no tendão gastrocnêmio (Figuras 3 A-B-C-D), porém em porcentagem menor. Ainda no tendão extensor digital foi possível observar 0,66% (1/150) de necrose focal moderada (Figuras 3 D).

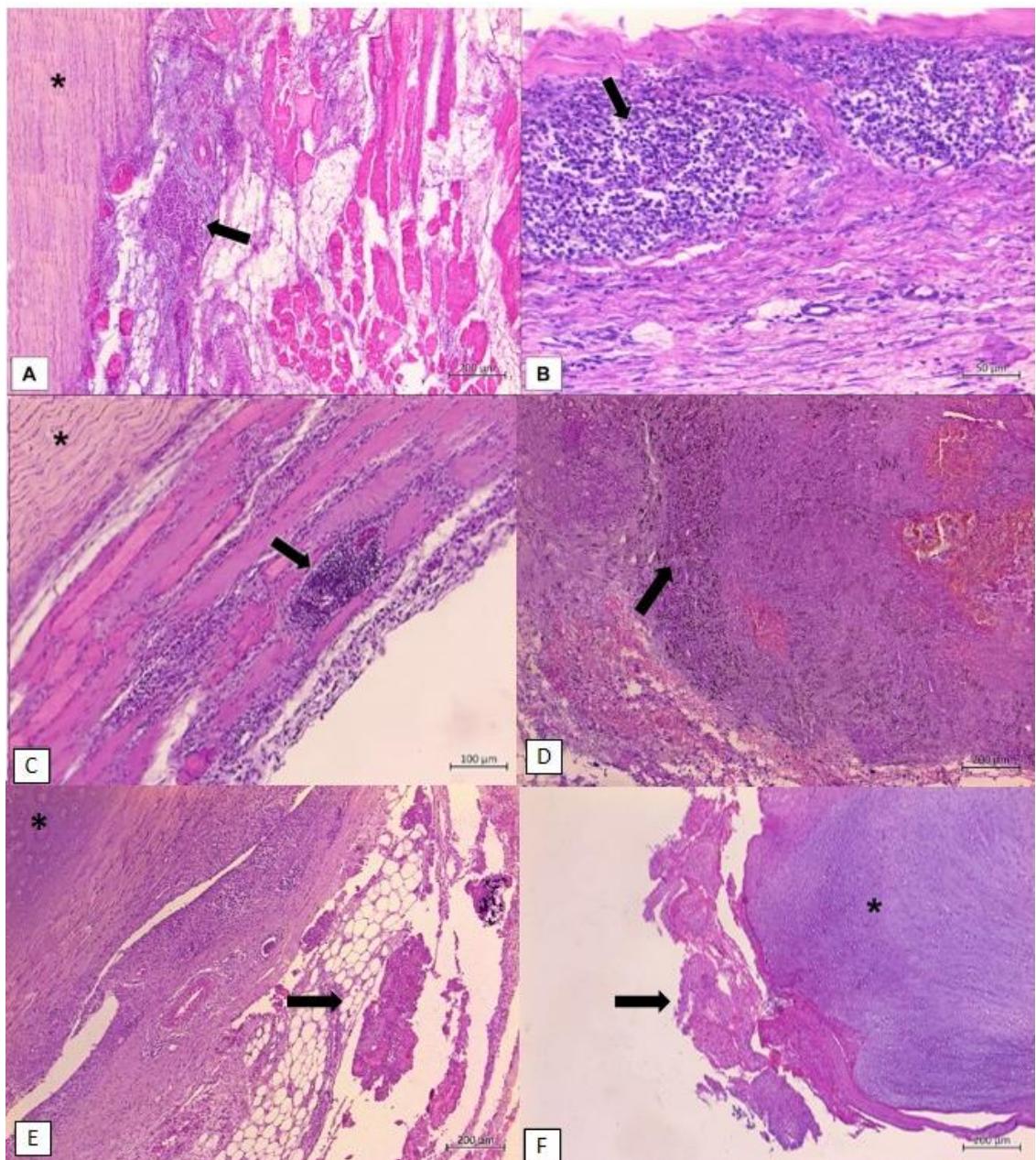


Figura 2 — Histopatologia do tendão gastrocnêmio (A-B-C) (asterisco). (A) Peritendão com agregados linfoides (seta) Grau 1 HE. Obj. 4. (B) Agregados linfoides (seta) Grau 1 (seta) HE. Obj. 20. (C) Musculatura adjacente ao tendão com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e agregados linfoides (seta) Grau 1 HE. Obj. 10. (D) Peritendão. Infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos associada a macrófagos contendo pigmento granular acastanhado (hemossiderina) no citoplasma (seta) com hemorragia focalmente extensa acentuada Grau 2 Obj. 4. Histopatologia da cartilagem articular da articulação tibiotarsometatarsica (E-F) (asterisco). (E) Infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e agregados linfoides, além de exsudação fibrinosa (seta) Grau 2. HE. Obj. 4. (F) Exsudação fibrinosa, hemorragia, infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (seta) Grau 2 Obj. 4.

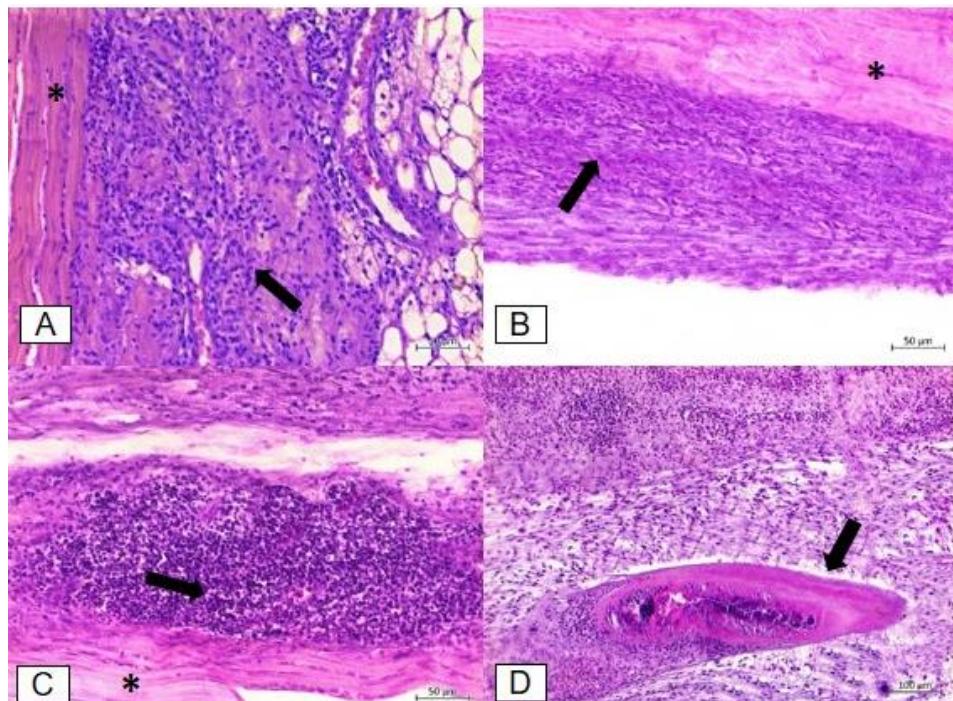


Figura 3 – Tendão flexor digital (asterisco). (A-B) Peritendão com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos (seta) Grau 1 HE. Obj. 20. (C) Tendão extensor digital (asterisco). Peritendão com agregados linfoides (seta) Grau 1. HE. Obj. 20. (D). Peritendão extensor digital com infiltrado de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de necrose focal (seta) Grau 2 (seta). HE. Obj. 10x.

Não houve diferença estatística entre a condenação média por artrite e o resultado do RTqPCR ($p=0,5607$) (Tabela 4), sendo que a média de condenação para artrite para os lotes positivos foi de 1,18% e lotes negativos 0,97%. A porcentagem média de condenação por artrite nas fêmeas foi 2,28 vezes maior se comparado com os machos (1,83% fêmeas e 0,8% machos) ($p=0,002$). A idade média de abate das fêmeas foi de 45,16 dias e dos machos 41,72 dias.

Tabela 4 - Comparação dos indicadores zootécnicos de frangos de corte abatidos entre 40 a 47 dias, condenados por artrite pelo SIF entre lotes positivos e negativos na RTqPCR para Reovírus Aviário (ARV).

| Lotes positivos na RTqPCR para ARV | | | | Lotes negativos na RTqPCR para ARV | | | |
|------------------------------------|--------|--------|-------|------------------------------------|--------|-------|------------|
| Variável | Máximo | Mínimo | Média | Máximo | Mínimo | Média | Valor de p |
| Condenação por artrite (%) | 3,32 | 0,32 | 1,18 | 1,99 | 0,39 | 0,97 | 0.470 |
| Mortalidade 7 dias (%) | 1,35 | 0,39 | 0,93 | 3,99 | 0,01 | 1,15 | 0.868 |
| Mortalidade Total (%) | 15,11 | 2,95 | 7,49 | 21,43 | 3,48 | 7,09 | 0.604 |
| GPD (gramas) | 77,96 | 60,7 | 69,04 | 73,39 | 61,82 | 68,9 | 0.924 |
| CA | 1,82 | 1,5 | 1,65 | 1,84 | 1,57 | 1,67 | 0.709 |
| Idade de abate (dias) | 47,53 | 40,25 | 42,95 | 46,37 | 40,07 | 42,31 | 0.220 |
| Peso médio (kg) | 3,18 | 2,75 | 2,95 | 3,10 | 2,76 | 2,93 | 0.164 |

GPD= ganho de peso diário, CA= conversão alimentar

Uma das amostras positivas na RTqPCR foi submetida ao sequenciamento e a análise de sequências de nucleotídeos do gene sigma C e apresentou compatibilidade com cluster VI (Figura 4, número de acesso OQ994984). Nenhuma amostra foi positiva para *Mycoplasma synoviae* na PCR.

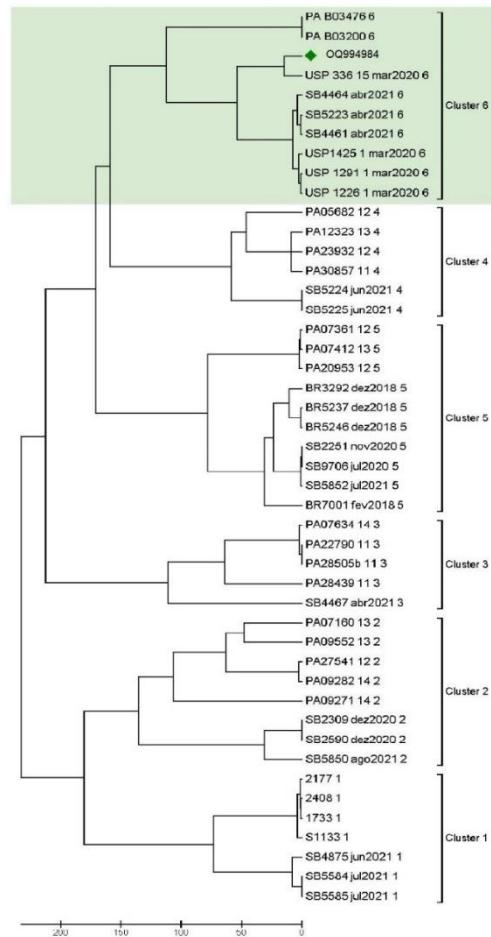


Figura 4- Árvore filogenética de estirpes Reovírus Aviário com base na variabilidade da sequência Sigma C. As estirpes de vírus agrupadas em 6 clusters de genotipagem. O isolado do presente trabalho está no cluster VI (área coloração verde) identificado como OQ994984. A árvore foi construída pelo método de junção de vizinhos com o modelo de distância genética Jukes-Cantor.

Os valores de concordância global entre os métodos de diagnóstico pelo teste de *Kappa Fleiss* pode ser observado na Tabela 5. A comparação que apresentou a melhor concordância foi macroscopia *versus* histopatologia, classificada como forte.

Tabela 5 - Análise de concordância de Kappa entre macroscopia, histopatologia e RTqPCR em tendão gastrocnêmio de 30 lotes de frangos de corte condenados por artrite.

| Variáveis avaliadas | Concordância global (Kappa) | Grau de concordância |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Macroscopia x histopatologia | 0,714 | Forte |
| Macroscopia x histopatologia x RTqPCR | 0,325 | Razoável |
| Histopatologia x RTqPCR | 0,225 | Razoável |
| Macroscopia x RTqPCR | 0,233 | Razoável |

4.4 DISCUSSÃO

Nesse estudo houve a detecção do ARV pela RTqPCR no tendão gastrocnêmio em metade dos lotes de frango provenientes de matrizes não vacinadas. Porcentagens semelhantes de detecção foram encontradas em um estudo realizado no Iran, de amostras coletadas entre 2015 a 2017 provenientes de 40 lotes de frango de corte oriundos de diferentes regiões geográficas do país, com uma detecção de 57,5% para ARV no RT-PCR (MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUTI, 2020). A ocorrência de ARV reforça a disseminação do agente nos plantéis de frango de corte, assim como já demonstrado em outros estudos (DE CARLI et al., 2020; SOUZA et al., 2018; DE LA TORRE et al., 2021; RECK et al., 2019).

O resultado negativo na RTqPCR nos outros 50% dos lotes do presente trabalho pode estar associada à 1) ausência da infecção pelo vírus; 2) infecção antiga, replicação viral já cessou e não é mais possível a detecção viral pela RTqPCR (PITCOVSKI e GOYAL, 2020); e/ou 3) vírus presente em outros tecidos e/ou tendões que não o tendão gastrocnêmio (CZEKAJ et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2001a).

Não houve diferença estatística entre as variáveis zootécnicas analisadas nos lotes positivos e negativos na RTqPCR para ARV. Isso demonstra que nas condições do presente trabalho, a detecção do ARV no tendão gastrocnêmio, não demonstrou exercer influência nas porcentagens de condenação por artrite e indicadores zootécnicos avaliados o que difere de outros trabalhos onde houve detecção do ARV associado a aumento nas condenações e/ou perdas zootécnicas (SOUZA et al., 2018; PALOMIO-TAPIA et al., 2018; MOSAD et al., 2023).

A simples detecção do ARV não é indicativo de condenações elevadas e as investigações epidemiológicas devem ser associadas à avaliação de outros fatores, pois o curso dos sinais clínicos após infecção por ARV é dependente da idade do hospedeiro, status imune, patótipo viral e rota de exposição horizontal ou vertical. (PITCOVSKI e GOYAL, 2020). Ainda existem diferenças de tropismos e virulência entre as estirpes do ARV (ROSENBERGER et al., 1989; PITCOVSKI e GOYAL, 2020).

Não é de conhecimento até o presente momento estudos tenham comparado numericamente a presença ou ausência de ARV *versus* índices de desempenho zootécnico e condenações por artrite em frangos de corte. No Iran houve relato de diminuição do ganho de peso, principalmente, de três a cinco semanas porém sem as diferenças numéricas (MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020).

No presente estudo a condenação média dos lotes avaliados foi de 1,08%, com condenação máxima de 3,32%, valores esses consideravelmente abaixo dos apontados em outro estudo no sul do Brasil, onde houve condenação média de 5% (SOUZA et al., 2018). Em outros países, há relatos de problemas a campo com tenossinovite de até 60% no Iran (PERELMAN et al., 2019), nos Estados Unidos ocorrência de 28% com perdas em mais de 48 milhoes de dólares (FRENCH, 2022) e no Canadá de 4% a 13% (PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

No presente estudo não foi realizado a correlação entre a idade das matrizes e a ocorrência de condenação por artrite, porém existe evidências de uma relação maior entre tenossinovite de frangos oriundos de matrizes mais jovens (28 a 35 semanas de idade), fato este que deve ser melhor investigado (MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020).

É comum nas indústrias de frango de que as colheitas para diagnóstico de ARV em tendão devem ser feitas até a terceira semana de idade pois a partir disso diminuiram as chances de identificação do vírus. Houve relato de que não foi possível observar lesões em aves abatidas com mais de 35 dias (SOUZA et al., 2018). Porém no presente estudo, foi possível realizar a detecção de ARV em aves com idades de até 45 dias.

No presente estudo houve relação 2,3 vezes maior entre a condenação por artrite nas fêmeas se comparado aos machos. Para atingimento de peso para abate, as fêmeas permaneceram alojadas no campo em média 3,44 dias a mais que os machos. No estudo realizado por Souza et al., (2018) não houve correlação com o

sexo, já em outro estudo realizado no Iran demonstrou maior relação de tenossinovite por ARV em machos (MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020). Esta relação entre tenossinovite viral e sexo ainda não é bem esclarecida e necessita de maiores investigações.

Houve uma concordância razoável entre os diagnósticos de histopatologia *versus* RTqPCR e macroscopia *versus* RTqPCR. Todos os lotes positivos na RTqPCR para ARV evidenciaram algum grau de lesão macroscópica e/ou histológica. Dos lotes negativos na RTqPCR para ARV, 80% evidenciaram algum grau de lesão macroscópica e/ou histológica. Este fato reforça a possibilidade da não detecção no teste molecular nos casos negativos com presença de lesão, principalmente quando em lesões crônica, com ruptura de tendão onde possivelmente não há mais a presença do vírus (SELLERS, 2022).

A associação de diferentes métodos de diagnóstico aumenta as probabilidades de um diagnóstico mais preciso, pois um resultado molecular negativo pode estar relacionado à um falso negativo, devido a falhas na detecção ou lesões crônicas onde não há mais a presença do agente (SELLERS, 2022; PITCOVSKI e GOYAL, 2020), sendo sempre necessário a associação dos sinais clínicos, lesões macroscópicas, histológicas, sorologia e achados moleculares para diagnóstico mais preciso da doença.

A maioria dos trabalhos desenvolvidos nas últimas décadas tem relacionado as condensões por artrite e/ou a ocorrência de artrite asséptica com ARV juntamente com o descobrimento de diferentes *clusters* não contemplados nas vacinas comerciais (AYALEW et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Em uma das amostras do presente estudo foi possível a caracterização do ARV no cluster VI, geneticamente distinta do cluster I, que são utilizadas nas vacinas comerciais disponíveis atualmente no mercado.

Os ARVs apresentam alta diversidade genética devido ao genoma dsRNA segmentado e mecanismos evolutivos resultando em rearranjo genético dos segmentos virais (CLARK et al., 1990; TANG et al., 2015; AYALEW et al., 2020). Como consequência, há ampla gama de variantes de campo com diferentes perfis antigênicos e patogênicos (WOOD et al., 1980).

É importante salientar que neste trabalho, a detecção do agente no tendão gastrocnêmio não foi um indicativo de aumento nas condensões, portanto, sugere-se que trata-se de uma síndrome multifatorial dependente de fatores associados que precisam ser melhor investigados como idade das matrizes (MIRBAGHERI,

HOSSEINIE e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020, linhagem e velocidade de crescimento (SHIM et al., 2012; JONES e GEORGIOU, 1984), fatores nutricionais (MUSZYŃSKI et al., 2018), influência da incubação no desenvolvimento de tecidos tendíneos (GROVES e MUIR, 2014; OVEIDO-RONDON et al., 2010) e tipo de criação (MOUSSA et al., 2008).

Nos estudos previamente realizados no Brasil, já haviam sido identificados os clusters II e V (SOUZA et al., 2018), os quais foram relacionados com casos clínicos de tenossinovite em lotes de frango com alta condenação por artrite de 22 a 28 dias de idade. Outro estudo, foram identificados os clusters I, II, III, e V coletados de frangos de corte com tenossinovite a campo e no abaterouro (DE CARLI et al., 2020) e clusters I, II, e VI coletados de articulação de frango de corte com artrite/tenossinovite com idades de 1, 2, 5 e 6 semanas (DE LA TORRE et al., 2021).

A amostra deste presente trabalho, pertencente ao cluster VI, se comparada com outros isolados deste mesmo grupo no Brasil, a maior semelhança foi encontrada em um isolado de 2009, (USP_BR_336-15, MT161581) (DE LA TORRE et al., 2021), em intestinos de frangos de corte com 95,8% de semelhança entre as estirpes. Em 2019 foi identificado no Brasil o cluster VI (USP_1291_1_mar2020, MT161590) (DE LA TORRE et al., 2021), a partir de articulação de frangos envolvidos em casos de artrite/tenossinovite com identidade genética a partir do fragmento do gene S1 com 83,8% de semelhança se comparado com a estirpe do presente estudo.

Nas avaliações macroscópicas, todas as lesões foram semelhantes, porém com intensidade variável. Dentre as porções avaliadas, o tendão gastrocnêmio e a articulação tibiotarsometatarsica obtiveram maiores escores de lesões se comparados ao tendão extensor digital e flexor digital. As principais lesões macroscópicas observadas no presente estudo foram aumento de volume, exsudato fibrinoso e hemorragia em diferentes graus. Outros estudos descrevem edema e hemorragia em tendões, porém não há comparação de graus entre os diferentes tecidos (CHEN et al., 2019; MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020; SOUZA et al., 2018).

Apesar da doença ser popularmente chamada de “joelho verde” em inglês “green hock” (PALOMINO-TAPIA et al., 2018), no presente estudo, somente 1,3% dos casos apresentaram coloração esverdeada na avaliação macroscópica e em nenhum destes casos houve detecção do ARV. A coloração esverdeada se deve a degradação da hemoglobina, fagocitada pelos macrófagos que ocorre de 3 a 6 dias após o

extravasamento sanguíneo, formando a biliverdina, que confere à lesão a cor azul-esverdeada (KUMAR et al., 2014). Baseado no comportamento fisiológico mencionado, pode-se inferir que em 62,7% dos casos deste estudo, onde observou-se uma coloração avermelhada, que o extravasamento sanguíneo ocorreu até no máximo até 3 dias antes do abate, demonstrando serem lesões mais recentes à data do abate das aves.

Já a ruptura do tendão gastrocnêmio foi verificada somente em 2% (3/150) sendo que os frangos que apresentaram ruptura de tendão gastrocnêmio pertenciam à lotes distintos. Destes três lotes, houve detecção do ARV na RTqPCR em somente em um deles. Na literatura, existem relatos de ruptura de tendão gastrocnêmio tanto associados à tenossinovite viral com resposta inflamatória (KERR e OLSON, 1969; L VAN DER HEIDE; GEISSLER E BRYANT, 1974; PITCOVSKI e GOYAL 2020) quanto à ruptura espontânea (DINEV, 2008). Um tendão saudável é mais resistente se comparado ao músculo e a inserção óssea (PLATT, 2005), portanto a ruptura de tendão nos casos de tenossinovite viral deve-se primordialmente pela multiplicação viral no tendão (LABRADA et al., 2002) com alteração na permeabilidade de membrana (CARRASCO, 1995) e intensa fibroplasia com substituição do tecido tendíneo por fibrose (VASCONCELOS et al., 2001a), diminuindo a resistência favorecendo ao rompimento.

As alterações macroscópicas da pele e musculatura em sua maioria se concentraram nos graus 1 e 2, com edemas e hemorragias variando de discretas a moderadas. Na literatura foram encontradas descrito lesões macroscópicas semelhantes (PITCOVSKI e GOYAL, 2020), porém o presente estudo parece ser o primeiro a fazer uma classificação dos graus de lesão de tenossinovite viral.

Na avaliação da articulação tibiotarsometatársica que contemplou a avaliação da cartilagem articular, cápsula articular e líquido sinovial, foram observadas alterações de diferentes graus e em 34,8% dos casos, observou-se desde exsudato seroso com aumento discreto a acentuado acompanhado de hemorragia moderada a acentuada. Em outros estudos também foram observados edema e hemorragia (SOUZA et al., 2018; CHEN et al., 2019).

Dentre os tendões avaliados, tanto na macroscopia quanto na microscopia o tendão gastrocnêmio foi o que apresentou maior porcentagem de lesões se comparado ao tendão flexor digital e tendão extensor digital. A presença de lesões nos mesmos tendões já foram descritas anteriormente (SOUZA et al., 2018). Lesões

no tendão flexor digital já foram descritas em estudo, uma semana após inoculação do ARV (VASCONCELOS et al., 2001a), fato que reforça diferenças de tropismos e virulência entre as estirpes (ROSENBERGER et al., 1989; PITCOVSKI e GOYAL, 2020).

As alterações microscópicas no tendão gastrocnêmio situaram-se no peritendão e musculatura adjacente sendo observados infiltrado predominante de heterófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos ora com agregados linfoides em diferentes graus e em alguns casos acompanhado também de hemorragia e exsudato fibrinoso. Estes achados são característicos nas infecções por ARV (CRISPO et al., 2019; SOUZA et al., 2018). Lesões semelhantes já foram descritas em tendão gastrocnêmio onde observou-se infiltrado discreto a moderado células mononucleares mistas incluindo plasmócitos, fibrina e heterófilos que foram encontrados entre o espaço peritendão. Ainda foram observados agregados linfoides na membrana sinovial (PALOMINO-TAPIA et al., 2018).

No peritendão do tendão flexor e extensor digitais foram observados infiltrados semelhante ao tendão gastrocnêmio. Outros estudos também já demonstraram achados semelhantes no tendão flexor digital (VASCONCELOS et al., 2001a; MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2022). No presente estudo, dentro da investigação das causas infecciosas por artrite, foi avaliado o envolvimento do *Mycoplasma synoviae* (MS) o qual foi negativo, assim como em outros trabalhos (MOSAD et al., 2023; SOUZA et al., 2018). Além do MS e ARV, em estudos de investigação de artrite deve-se avaliar o envolvimento de outros agentes bacterianos como *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Salmonela* (MARCON et al., 2019; DAUM et al., 1990; KIBENGGE et al., 1982; RECK et al., 2019), sendo uma das limitações do presente estudo.

Ainda como limitação deste presente trabalho, a detecção molecular do ARV foi realizado por lotes, utilizando-se um *pool* de 5 aves, devido aos custos das análises. A utilização de *pool* para análise de PCR pode diluir a quantidade de partículas vírais e dificultar o diagnóstico molecular. Outro ponto a ser mencionado é que das 15 amostras ARV positivas foi realizado sequenciamento com êxito em somente uma amostra.

A escolha de realizar somente detecção através do tecido do tendão gastrocnêmio pode ter interferido na taxa de detecção, pois o ARV poderia estar presentes em outros tendões, líquido sinovial e/ou cartilagem articular (PALOMINO-

TAPIA et al., 2018; MOSAD et al., 2023; MIRBAGHERI, HOSSEINI e GHALYANCHILANGEROUDI, 2020).

Sugere-se que nos estudos de avaliação histológicas de ARV inclua-se coleta da cápsula articular da articulação tibiotarsometatarso juntamente com a membrana sinovial.

4.5 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, pode-se concluir que houve detecção de Reovírus em metade dos lotes de frango não vacinados e oriundos e matrizes não vacinadas para ARV, com lesões macroscópicas e histológicas características de reovirose, classificadas em graus mais leves e sem correlação com a porcentagem de condenação no abatedouro por artrite e/ou alterações nos indicadores zootécnicos. Houve a identificação de estirpe viral VI a qual é diferente da estirpe presente nas vacinas comerciais no Brasil.

4.6 REFERÊNCIAS

AYALEW, L. E. et al. The dynamics of molecular evolution of emerging avian reoviruses through accumulation of point mutations and genetic re-assortment. **Virus Evolution**, v. 6, n. 1, p. veaa025, 2020.

AYALEW, L. E. et al. Phenotypic, genotypic and antigenic characterization of emerging avian reoviruses isolated from clinical cases of arthritis in broilers in Saskatchewan, Canada. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3565, 2017.

BODELÓN, G. et al. The avian reovirus genome segment S1 is a functionally tricistronic gene that expresses one structural and two nonstructural proteins in infected cells. **Virology**, v. 290, n. 2, p. 181-191, 2001.

BRASIL. Serviço de Inspeção Federal (SIF): Condenação de animais por espécie. Disponível em:

https://sistemas.agricultura.gov.br/pga_sigsif/pages/view/sigsif/condenacaoanimal/index.xhtml. Acesso em: 15 fev. 2023

CARRASCO, L. Modification of membrane permeability by animal viruses. **Advances in virus research**, v. 45, p. 61-112, 1995.

CHEN, H. et al. Pathogenicity and genomic characterization of a novel avian orthoreovirus variant isolated from a vaccinated broiler flock in China. **Avian Pathology**, v. 48, n. 4, p. 334-342, 2019.

CLARK, F. D. et al. Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. **Avian diseases**, p. 304-314, 1990.

CRISPO, M. et al. Partial molecular characterization and pathogenicity study of an avian reovirus causing tenosynovitis in commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 63, n. 3, p. 452-460, 2019.

CZEKAJ, H. et al. Occurrence of reovirus (ARV) infections in poultry flocks in Poland in 2010–2017. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 421, 2018.

DAUM, R. S. et al. A model of *Staphylococcus aureus* bacteremia, septic arthritis, and osteomyelitis in chickens. **Journal of orthopaedic research**, v. 8, n. 6, p. 804-813, 1990.

DE CARLI, S. et al. Genotypic characterization and molecular evolution of avian reovirus in poultry flocks from Brazil. **Avian Pathology**, v. 49, n. 6, p. 611-620, 2020.

DE LA TORRE, D. et al. Emerging new avian reovirus variants from cases of enteric disorders and arthritis/tenosynovitis in Brazilian poultry flocks. **British Poultry Science**, v. 62, n. 3, p. 361-372, 2021.

DINEV, I. Clinical and morphological studies on spontaneous rupture of the gastrocnemius tendon in broiler breeders. **British poultry science**, v. 49, n. 1, p. 7-11, 2008.

FLEISS, J. L.; LEVIN, B.; PAIK, M. **Statistical methods for rates and proportions.** john wiley & sons, 2013.

GROVES, P. J.; MUIR, W. I. A meta-analysis of experiments linking incubation conditions with subsequent leg weakness in broiler chickens. **Plos one**, v. 9, n. 7, p. e102682, 2014.

HAMEED, S. S.; ULAIWI, A. H.; HAMAD, S. M. Diagnosis of *E. coli* isolated from arthritis in chickens by vitek and molecular methods. **Iraqi Journal of Agricultural Sciences**, v. 53, n. 1, p. 141-146, 2022.

HORTÊNCIO, M. C. et al. Time series evaluation of condemnation at poultry slaughterhouses enable to export in Southeastern Brazil (2009–2019): a tool for optimizing resources in the poultry production chain. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2022.

FRENCH, D. Incidence and economic impact of reovirus in the poultry Industries in the United States. **Avian Diseases**, v. 66, n. 4, p. 432-434, 2022.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. Avian orthoreovirus. Disponivel em: <https://ictv.global/taxonomy>. Acesso em: 15 dez. 2022.

JONES, R. C. et al. Early pathogenesis in chicks of infection with a trypsin-sensitive avian reovirus. **Avian Pathology**, v. 23, n. 4, p. 683-692, 1994.

JONES, R. C.; GEORGIOU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. **Avian pathology**, v. 13, n. 3, p. 441-457, 1984.

JONES, R. C. Reovirus infections. **Diseases of poultry**, p. 351-373, 2013.

KERR, K. M.; OLSON, N. O. Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis-producing virus. **Avian Diseases**, p. 729-745, 1969.

KIBENGE, F. et al. Bacterial and viral agents associated with tenosynovitis in broiler breeders in Western Australia. **Avian Pathology**, v. 11, n. 3, p. 351-359, 1982.

KUMAR, Vinay et al. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book**. Elsevier health sciences, 2014. 9 ed. 1386p.

LABRADA, L. et al. Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7932-7941, 2002.

LAUERMAN, L. H. et al. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. **Avian Diseases**, p. 829-834, 1993.

LU, H. et al. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 14727, 2015.

LUNGE, V. R. et al. Avian Reoviruses in Poultry Farms from Brazil. **Avian Diseases**, v. 66, n. 4, p. 459-464, 2022.

MARCON, A. V. et al. Bacteriological and histopathological evaluation of articulations of chickens diagnosed with arthritis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 21, 2019.

MIRBAGHERI, S. A.; HOSSEINI, H.; GHALYANCHILANGEROUTI, A. Molecular characterization of avian reovirus causing tenosynovitis outbreaks in broiler flocks, Iran. **Avian Pathology**, v. 49, n. 1, p. 15-20, 2020.

MOSAD, S. M. et al. Molecular and pathological investigation of avian reovirus (ARV) in Egypt with the assessment of the genetic variability of field strains compared to vaccine strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1156251, 2023.

MOUSSA, M. et al. Effects of physical activities on biochemical and biomechanical properties of tendons in two commercial types of chickens. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 2, p. 76-84, 2008.

MUSZYŃSKI, S. et al. Effects of replacing soybean meal with chickpea seeds in the diet on mechanical and thermal properties of tendon tissue in broiler chicken. **Poultry science**, v. 97, n. 2, p. 695-700, 2018.

NAZIA, M. K. K. et al. Prevalence of septic arthritis caused by *Staphylococcus aureus* in poultry birds at Tandojam. **Pakistan. Journal Animal Health Production**, v. 3, n. 3, p. 73-77, 2015.

OVEIDO-RONDON, E. O. et al. Incubation conditions affect tendon development in broilers. In: **AVMA-AAAP meeting**. 2010.

PALOMINO-TAPIA, Victor et al. Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012–2017 based on partial sigma (σ) C gene. **Virology**, v. 522, p. 138-146, 2018.

PERELMAN, B. et al. Use of controlled exposure as a novel method for reovirus arthritis/tenosynovitis prevention. A preliminary report. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 74, p. 163-172, 2019.

PITCOVSKI, J.; GOYAL, S. M. Avian reovirus infections. **Diseases of poultry**, p. 382-400, 2020.

PLATT, M. A. Tendon repair and healing. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 22, n. 4, p. 553-560, 2005.

RECK, C. et al. Molecular detection of *Mycoplasma synoviae* and avian reovirus infection in arthritis and tenosynovitis lesions of broiler and breeder chickens in Santa Catarina State, Brazil. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 90, n. 1, p. 1-5, 2019.

ROSENBERGER, J. K. et al. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. **Avian diseases**, p. 535-544, 1989.

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

SCHNITZER, T. J.; RAMOS, T.; GOUVEA, Vera. Avian reovirus polypeptides: analysis of intracellular virus-specified products, virions, top component, and cores. **Journal of virology**, v. 43, n. 3, p. 1006-1014, 1982.

SELLERS, H. S. Avian reoviruses from clinical cases of tenosynovitis: An overview of diagnostic approaches and 10-year review of isolations and genetic characterization. **Avian Diseases**, v. 66, n. 4, p. 420-426, 2022.

SHIM, M. Y. et al. The effects of broiler chicken growth rate on valgus, varus, and tibial dyschondroplasia. **Poultry Science**, v. 91, n. 1, p. 62-65, 2012.

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

SPANDIDOS, D.; GRAHAM, A. F. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. **Journal of virology**, v. 19, n. 3, p. 968-976, 1976.

STALKER, M. J. et al. Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 22, n. 4, p. 643-645, 2010.

SU, Y. P. et al. The sequence and phylogenetic analysis of avian reovirus genome segments M1, M2, and M3 encoding the minor core protein μ A, the major outer capsid protein μ B, and the nonstructural protein μ NS. **Journal of virological methods**, v. 133, n. 2, p. 146-157, 2006.

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

TANG, Y. et al. Genomic characterization of a turkey reovirus field strain by Next-Generation Sequencing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 32, p. 313-321, 2015.

VAN DER HEIDE, L.; GEISSLER, J.; BRYANT, E. S. Infectious tenosynovitis: serologic and histopathologic response after experimental infection with a Connecticut isolate. **Avian diseases**, p. 289-296, 1974.

VAN DER HEIDE, L. The history of avian reovirus. **Avian diseases**, v. 44, n. 3, p. 638-641, 2000.

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

VASCONCELOS, S. B. S. et al. 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, p. 84-87, 2001b.

WOOD, G. W. et al. Serological comparisons of avian reoviruses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 90, n. 1, p. 29-38, 1980

5 ARTIGO 2

Fowl Aviadenovirus FAdV-11 as the causative agent of a vertical outbreak of inclusion body hepatitis in commercial breeder in Brazil

Elizabeth B. Batista^a, Hiran C. Kunert Filho^b, Jéssica A. Withoeft^a, Anna Laura de Oliveira Cunha^a, André Fonseca^c, Renata A. Casagrande^{a*}

^a*Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, Santa Catarina, Brazil;* ^b*MercoLab Laboratórios Ltda, Cascavel - Paraná, 85816-280, Brazil;* ^c*Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul 94940-030, Brazil.*

*Corresponding author: Renata Assis Casagrande, Laboratório de Patologia Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luís de Camões, 2090, Conta Dinheiro, 88520-000, SC, Brazil.
renata.casagrande@udesc.br

ABSTRACT

Inclusion body hepatitis (IBH), caused by Fowl Aviadenovirus (FAdV), is an important disease in chickens worldwide. FAdV-11 associated with IBH was identified in 9-day-old commercial broiler breeders in Brazil. The chicks showed a sudden onset of daily mortality accompanied by nonspecific clinical signs in one house on the farm. The cumulative mortality rate until 15 days of age was 11.13%. Macroscopically, liver was accentuated enlarged and pale red with evident lobular pattern. Histologically, in the liver there was mild to marked multifocal coalescent vacuolar degeneration and necrosis, and hepatocyte nuclei were diffusely enlarged and filled with large basophilic inclusion bodies, and in the heart, diffuse, moderate, infiltrate of lymphocytes and plasmocytes, with focal thrombosis in the epicardium. FAdV detected in chicken liver samples, using specific primers for the hexon gene (52 K-fw and 52 K-rv) for polymerase chain reaction (PCR) was subjected to sequencing of the hypervariable region of this gene (Hex L1) for phylogenetic analysis, revealing FAdV-D species serotype 11. To our knowledge, this is the first report of FAdV-D serotype 11 as the causative agent of a vertical outbreak of inclusion body hepatitis in broiler breeders in Brazil.

Keywords: Breeder rearing. Adenoviridae. Avian health. Liver. IBH. Basophilic inclusion bodies.

5.1 INTRODUCTION

Adenoviridae virus family contains six genera, including *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus*, *Siadenovirus*, and *Testadenovirus*, all of which have a non-enveloped, double-stranded DNA genome. The genus *Aviadenovirus* includes Fowl Aviadenovirus (FAdV), which is divided into five species, A, B, C, D, and E, and 12 serovars, A-1, B-5, C-1-4, C-10, D-2, D-3, D-9, D-11, E-6, E-7, E-8a, and E-8b (ICTV 2022). Three common disease presentations are associated with FAdVs, inclusion body hepatitis (IBH), hepatitis-hydropericardium syndrome, and adenoviral gizzard erosion (Abghour et al., 2019).

Fowl aviadenovirus D and E (serotypes 2, 3, 6, 7, 8a, 8b, 9, and 11) are associated with IBH, which is attributed to the presence of characteristic intranuclear basophilic and/or eosinophilic inclusion bodies in hepatocytes (Abghour et al., 2019; Hosseini et al., 2020; Morshed et al., 2017).

Since IBH was first identified in USA in 1963 (Helmboldt and Frazier, 1963), the disease became a significant threat to the poultry industry worldwide, causing economic losses in many countries around the world (Alzuheir et al., 2021; Hosseini et al., 2020; Schachner et al., 2018; Tsioris et al., 2022). Horizontal transmission of FAdV occurs mainly via the fecal-oral route (Abghour et al., 2021). Vertical transmission can also occur, and commercially hatched eggs can be infected by hens (Akhtar, 1995; Cook, 1974; Grafl et al., 2012; Grgic et al., 2006).

IBH is characterized by a sudden increase in mortality rate (up to 30%) after 3–4 days and usually stops on day 5 (Christensen and Saifuddin, 1989). Macroscopically, the liver is enlarged, pale yellow, and friable, with multiple subcapsular petechial hemorrhages (Hosseini et al., 2020; Şahindokuyucu et al., 2020). Histologically, hepatic necrosis, and hemorrhage with basophilic intra-nuclear inclusion bodies are characteristic of IBH (Abghour et al., 2019; Kumar et al., 2013).

FAdVs have been characterized as a primary or associated causative agent as well as a cofactor with mycotoxins and parasitic, viral, and bacterial infections (Choi et al., 2012; De Herdt et al., 2013; Gomis et al., 2006; Mariappan et al., 2018; Mei et al., 2020; Sentíes-Cué et al., 2010; Toro et al., 2001; Tsioris et al., 2022).

In Brazil, an outbreak of hepatitis hydropericardium syndrome (HHS) co-infected with chicken anemia virus (CAV) in commercial three-week-old male broiler breeders was characterized by the FAdV E isolate. Pale bone marrow, enlarged and yellowish

liver, splenomegaly, and atrophied thymus were observed. Areas of vacuolar degeneration and lytic necrosis of hepatocytes and numerous hepatocytes with basophilic intranuclear inclusions were observed (Marín et al., 2023).

The present study demonstrated the occurrence and characterization of histological and molecular aspects of IBH outbreak for FAdV in Brazil.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Case History

In October 2021, an increase in daily mortality was recorded in a commercial broiler breeder rearing located in Southern Brazil in the Sombrio municipality, Santa Catarina state. The farm was composed of one nucleus and five poultry houses comprising 55,620 broiler breeders that originated from the same hatchery and were placed on the same day.

The broiler breeders (ROSS 95), were vaccinated against Marek disease (CRYOMIX HVT+Rispens, Boehringer Ingelheim, Germany) by 18-day-old embryonated chicken eggs in the hatchery as well as against Newcastle disease, infectious bronchitis (NEW LS MASS® I, Zoetis, Brazil), and coccidiosis (Biococcivet®, Biovet, Brazil) by ocular vaccination after the fourth day of placement. Their parents were vaccinated against chicken anemia virus (CAV) and avian encephalomyelitis. Broiler breeders and their parents were not vaccinated against FAdV.

The water and feed offered to birds as well as the environmental conditions were regulated in all houses in accordance with the recommendations of the parents company (Aviagen 2018). At 3 days of age, a sudden onset of daily mortality accompanied by nonspecific clinical signs was recorded on the farm.

5.2.2 Sample collection

Seventeen sick chicks from the flock with 55,620 in total, were selected for sample collection. At that time, the chicks were 9-days old and had not received any treatment previously. After external examination, the chicks were euthanized by cervical dislocation, and necropsy was performed. The livers were collected aseptically and frozen at -20 °C for subsequent polymerase chain reaction (PCR).

For histopathological examination, tissue samples of the liver, proventriculus, gizzard, esophagus, spleen, intestines, brain, kidneys, bursa of Fabricius, thymus, skin, heart, lungs, and trachea were collected, fixed in 10% neutral buffered formalin, processed, and embedded in paraffin. Sections were cut at 4 micrometers and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination.

Blood samples were randomly collected from the jugular vein without anticoagulant in the broiler breeders flock from 15 animals at 9, 49, and 70 days of age to investigate the bird's antibody response to FAdV. Serum was obtained and stored at -20 °C for further FAdV serological examination.

5.2.3 Serology

FAdV antibodies were detected using the Fowl Adenovirus Group I-Antibody ELISA kit (BioChek B.V., Reeuwijk, Netherlands). This kit included a nonspecific serotype-common group antigen with 12 serotypes and provided a broad spectrum for detection. According to the technical manual of BioChek, a chicken was considered FAdV-positive if the S/P ratio was $>/= 0.5$.

5.2.4 DNA extraction

Total DNA was purified using a standard silica/guanidine isothiocyanate-based (GuSCN-based) procedure using a commercial kit (Newgene, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil). Briefly, all samples were resuspended in 2.5 mL lysis buffer (GuSCN 5 M, Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.5 M, and Triton X-100) and incubated at 60 °C for 10 min. Following this, 500 µL of the solution was transferred to a new tube and 20 µL of silica suspension was added and mixed. The tubes were centrifuged at 8609 X g for 30 s. The pellet was washed once with 500 µL of the solution, once with 150 µL of washing buffer (GuSCN 5 M and Tris-HCl 0.1 M), twice with 150 µL of 75% ethanol, and once with 150 µL of absolute ethanol. The silica suspension was dried at 60 °C for 15 min. DNA was eluted with 50 µL of buffer TE, incubated at 60° C for 5 min, separated from the silica particles, and centrifuged at 8609 x g for 3 min.

5.2.5 PCR amplification of the hexon gene

The primer pair used for PCR were 5'-ATGGGAGSACCTAYTTCGACAT-3' and 5'-AAATTGTCCCKRAANCCGATGTA-3' (Steer et al., 2009). Amplification of target sequences was performed in a 30- μ L reaction mixture mastermix (Newgene, Simbios Biotecnologia, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil) using a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystem). The reaction mixtures were subjected to 94 °C for 2 min and 40 cycles of 94 °C for 20 s, 55 °C for 40 s, and 72 °C for 60 s. The amplification products were subjected to silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis, amplifying the 590-bp L1 region of the hexon gene of FAdV isolate. Sequence were deposited in Genbank under the accession number OP550182.

5.2.6 Sequencing and analysis

The amplified PCR products were sequenced using sense and antisense PCR primers on a Sequencer ABI 130 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Nucleotide sequences from both strands were edited, assembled, and analyzed using the ClustalW method available in the BioEdit software package (version 7.0.3.0. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit>). Sequences were compared using the neighbor-joining method with 1000 bootstrapping replicates for phylogenetic analysis and the presence of insertions and deletions (MEGA software version 5.0; available at <http://www.megasoftware.net>). Evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony (MP) method. The MP tree was obtained using the Subtree-Pruning-Regrafting algorithm, in which the initial trees were obtained by random addition of sequences (10 replicates). The tree was drawn to scale, with branch lengths calculated using the average pathway method and in units of the number of changes over the whole sequence (Nei and Kumar, 2000). The analysis included 23 nucleotide sequences. All positions containing gaps or missing data were excluded. There were 475 positions in the final dataset. Evolutionary divergence between sequences was estimated based on the number of base substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted using MEGA5 (Tamura et al., 2011).

5.3 RESULTS

Chicks exhibited apathy and maintained a crouching position (Figure 5a). On necropsy, some chickens had greenish-yellow feces in the feathers of cloaca. The liver was accentuated enlarged and pale red with evident lobular pattern (Figure 5b). Daily mortality exponentially increased, with dead birds accounting for 0.18% on Day one to 2.09% on Day 12. Necropsy of dead birds suggested IBH; as a result, stricter biosecurity measures were immediately implemented on the farm. The cumulative mortality rate until day 15 was 11.13% (Figure 6). Flocks from the same hatchery placed on the same day in different farms located in different states of Brazil showed similar clinical signs and mortality rates of up to 17%.



Figure 5 - Outbreak of FAdV-11 as a cause of inclusion body hepatitis in broiler breeders chickens. A) Nine-day-old broiler birds with FAdV-11 infection showing clinical signs of lethargy and depression. B) Macroscopic appearance of the liver in a 9-day-old broiler breeders with FAdV-11 infection. Markedly enlarged liver with an accentuated lobular (asterisk).

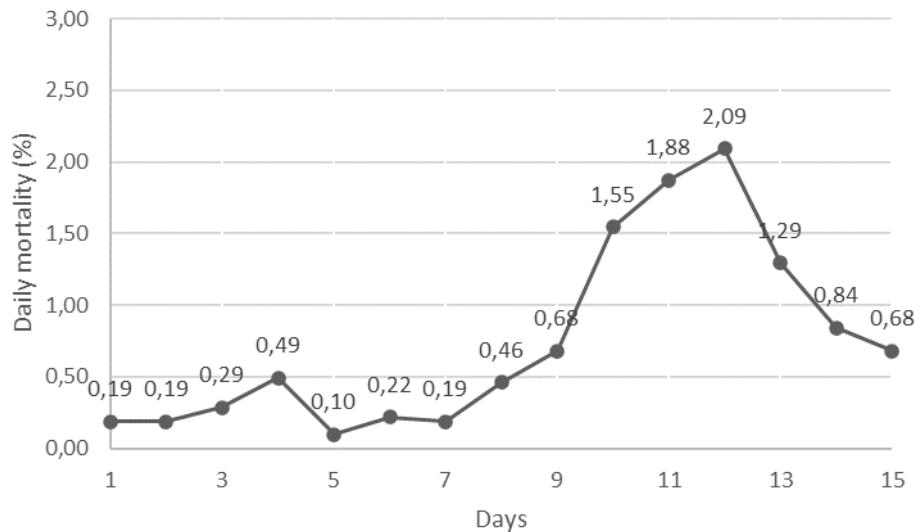


Figure 6 - Curve of the daily mortality rate of the farm over the first 15 days of rearing period. Daily measurements represent the number of dead birds divided by the population at risk.

Histologically, in the liver there was mild to marked multifocal to coalescent vacuolar degeneration and necrosis, and hepatocyte nuclei were diffusely enlarged and filled with large basophilic inclusion bodies (Figure 7A-B-C). In the heart, a diffuse, moderate, infiltrate composed of lymphocytes and plasmacytes, with focal thrombosis was observed in the epicardium (Figure 7D). There were no lesions in the proventriculus, gizzard, skin, spleen, thymus, esophagus, brain, kidneys, trachea, lung, bursa of Fabricius, and skin.

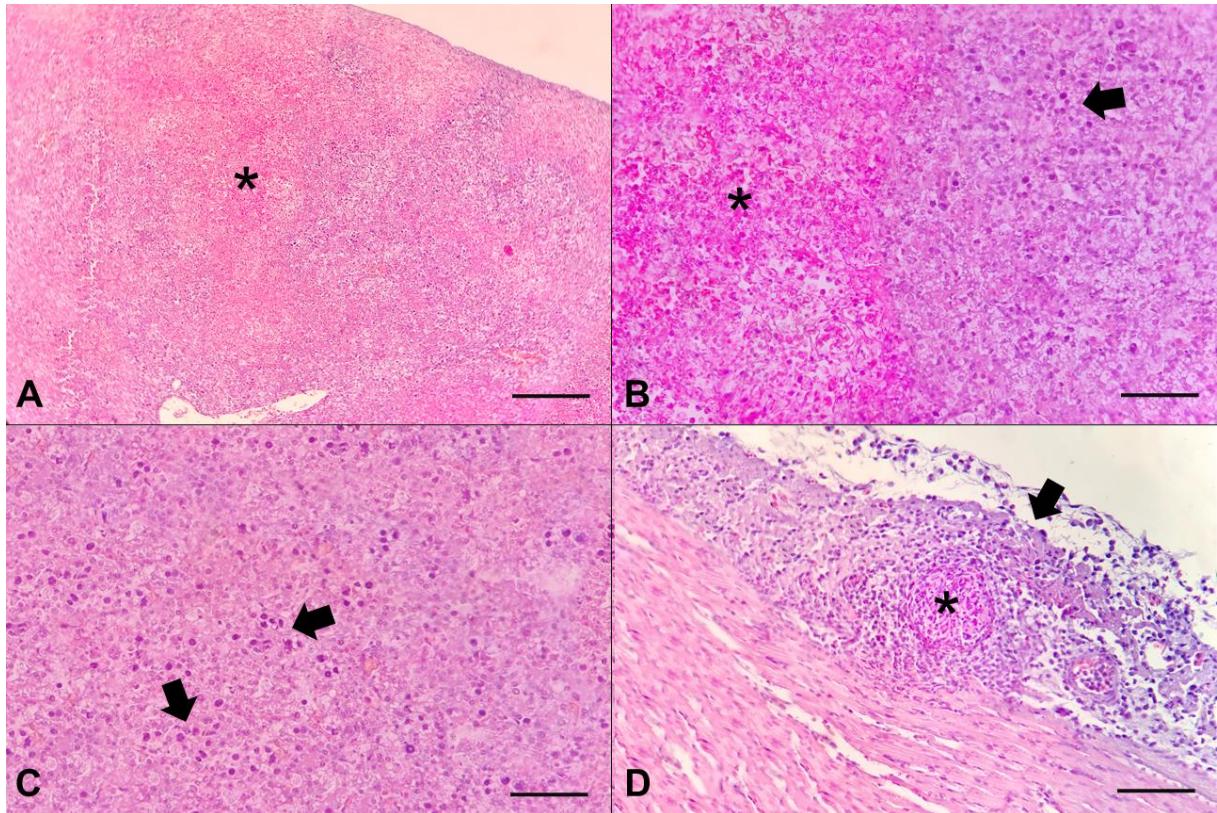


Figure 7 - Outbreak of FAdV-11 as a cause of inclusion body hepatitis in broiler breeders. A) Liver: marked multifocal to coalescent necrosis of hepatocytes (asterisk). HE. Obj. 4. B) Liver: focally extensive, marked necrosis of hepatocytes (asterisk), surrounded by hepatocytes containing basophilic intranuclear inclusion bodies (arrow). HE. Obj. 40. C) Liver: hepatocytes containing basophilic intranuclear inclusion bodies (arrows), diffuse, pronounced. HE. Obj. 40. D) Heart: inflammatory infiltrate composed of lymphocytes and plasmocytes in the epicardium, diffuse, moderate (arrow), accompanied by focal thrombosis, moderate (asterisk). HE. Obj. 40.

Seroconversion to FAdV in the flock that was study the outbreak, was observed at 9, 49, and 70 days of age (Figure 8). The geometric mean titers against FAdV were 2.949 at 9 days old, 16.102 at 49 days old, and 11.176 at 70 days old, and the coefficient of variation (CV)% values were 105%, 11%, and 27%, respectively.

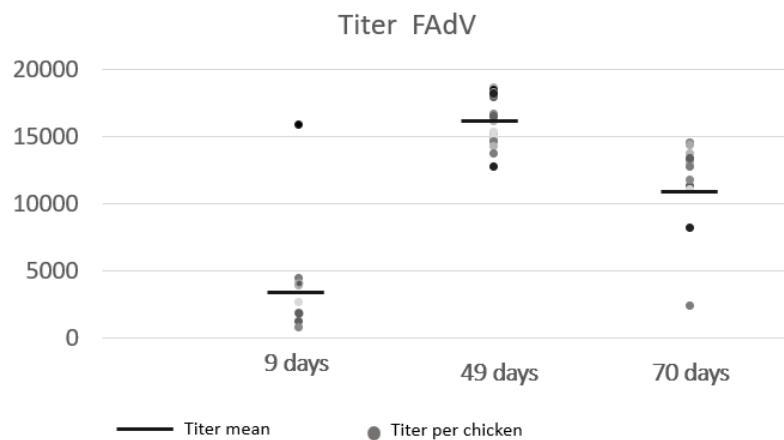


Figure 8 - FAdV antibodies titer from outbreak chickens at 9, 49, and 70 days of age.

In the molecular investigation, FAdV species D serovar 11 was detected (Figure 9) with a cycle threshold of 13.71. Based on comparison of the 590 bp L1 region of the hexon gene the divergence between the reference samples of genotype D11 ranged from 0.6% to 1.4% whereas the divergence between genotypes D2, D3, and D9, all FAdV D species, ranged from 2.0% to 22.4%.

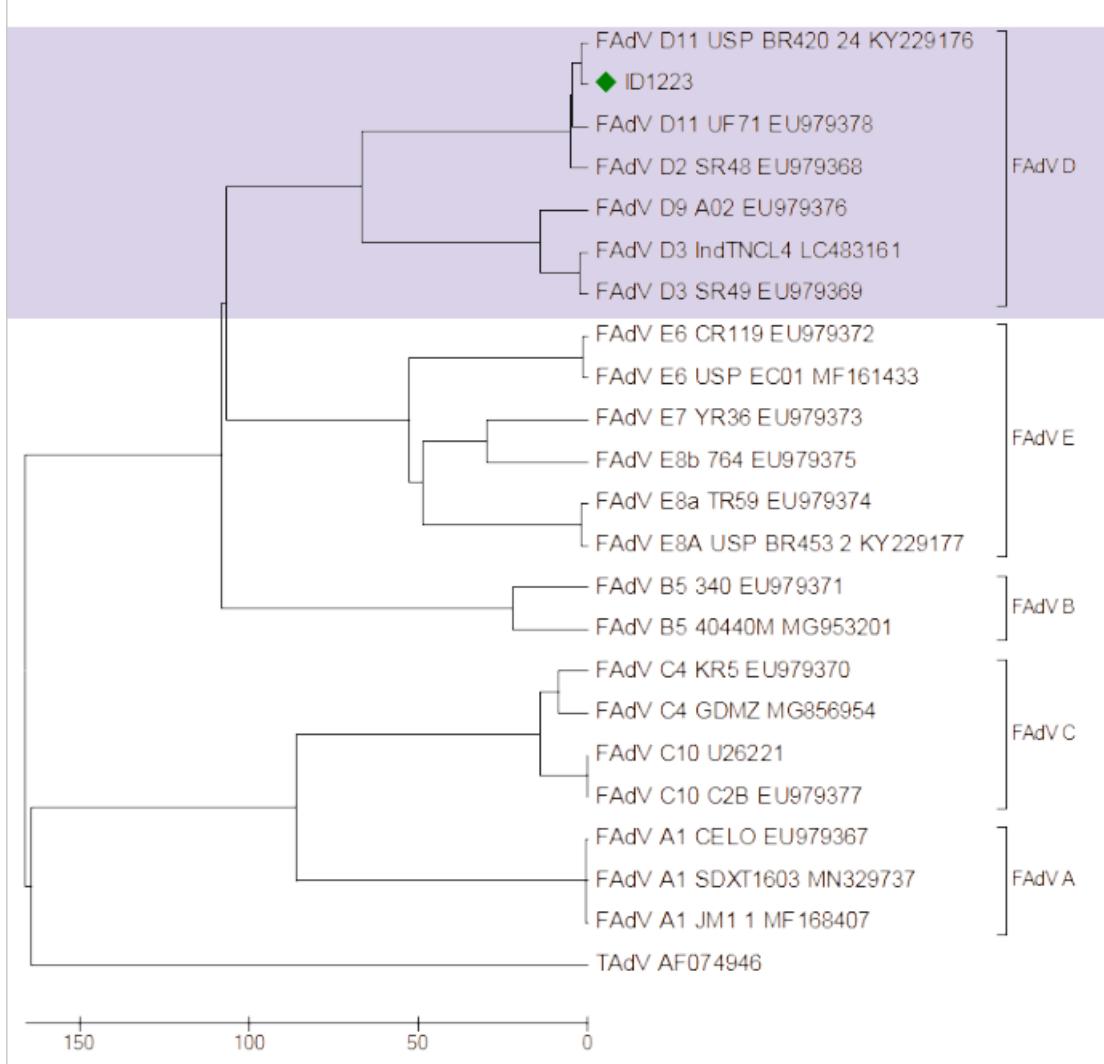


Figure 9 - Phylogenetic analysis of FAdVs, based on the comparison of the 590 bp L1 region of hexon gene. The isolated from this study was classified as FAdV-D serogroup 11, identity ID 1223 (purplish area in the figure). The evolutionary analysis was conducted in MEGA5.

5.4 DISCUSSION

The present study demonstrated an outbreak of FAdV serovar D11 with vertical transmission in broiler breeders and increased mortality in the flock from the third day of age, which lasted until the 15th day. This early mortality associated with the report of the in the progenies that born in the same day from the same parents, placed in different farms in different states from Brazil, showing similar clinical signs and high mortality suggested vertical transmission of the virus to their progenies. Vertical transmission of FAdV has been reported over the last few years as an important route

of dissemination (Grafl et al., 2012; Grgic et al., 2006; Saifuddin and Wilks, 1991; Toro et al., 2001).

This transmission occurs when laying breeders with a latent infection are affected by stressful stimuli or those at the peak of laying end up transmitting the virus to the progeny (Grgic et al., 2006). In these cases, the disease of the progeny was observed in the first week of life, as observed in the present study.

In flocks with horizontal transmission of the virus, mortality and consequently, clinical signs tend to appear in older individuals, which is always associated with lack of biosecurity procedures on farm (Revajova et al., 2017; Tsioris et al., 2022).

The chickens from this outbreak or their breeder parents were not vaccinated for the adenovirus. Thus, the appearance and increase in the geometric mean of the titres for FAdV indicate an active infection with FAdV seroversion. The coefficient of variation for FAdV was 11% at 49 days, together with high titers, demonstrating uniformity in flock immunity after the outbreak.

The titers detected in the present outbreak were higher than those reported in other IBH outbreaks. A report on 19-day old broiler chickens (ROSS 308) reported an average increase from 75 at 21 days to 9,772 at 42 days (Revajova et al., 2017). In another outbreak in broiler chickens at 20 days, serology at 42 days after FAdV infection showed titers ranging from 6,523 to 7,230 (Tsioris et al., 2022).

IBH outbreaks are increasingly reported worldwide, causing economic losses to the poultry industry. FAdV-11 has been identified in several countries associated with IBH (Gomis et al., 2006; Lim et al., 2011; Ojkic et al., 2008). In the last decade, FAdV has been detected during routine investigations in 38 countries across five continents. In IBH cases, FAdV-D and FAdV-E species were identified in 24% and 76% of the total cases, respectively (Kiss et al., 2021). IBH outbreaks in chickens and/or breeders have been reported in Turkey (Şahindokuyucu et al., 2020), Greece (Franzo et al., 2020), Morocco (Abghour et al., 2019), Palestine (Alzuheir et al., 2021), Korea (Choi et al., 2012), Canada (Gomis et al., 2006), Spain (Oliver-Ferrando et al., 2017), Iran (Hosseini et al., 2020; Morshed et al., 2017) and China (Niu et al., 2018).

In the present outbreak, the cumulative mortality rate was 11.13% at 15 days of age. In older broiler chickens in Greece, the onset of clinical signs was between 16 and 21 days of age, and mortality ranged from 3% to 20.2% (Franzo et al., 2020). In another study involving the experimental inoculation of specific-pathogen-free day-old

birds with FAdV-D and FAdV-E, mortality and clinical signs were higher in broilers than in layers (Matos et al., 2016).

In this study, macroscopic alterations were observed only in the liver. Previous studies have reported that IBH can cause enlarged kidneys with urates (Matos et al., 2016; Tsioris et al., 2022) and pale, enlarged pancreas with necrotic spots, hemorrhagic and enlarged kidneys, and hemorrhage in skeletal muscles (Cizmecigil et al., 2020; Matos et al., 2016; Radwan et al., 2019; Tsioris et al., 2022; Wilson et al., 2010).

Macroscopic lesions of IBH associated with the histopathological detection of intranuclear basophilic inclusions in hepatocytes are characteristic and can direct diagnosis (Matos et al., 2016; Gallina, Winterfield, and Fadly 1973). Birds with experimental or natural FAdV-11 infection present hepatic necrosis and intranuclear basophilic inclusion bodies as their main lesions (Abghour et al., 2019; Abghour et al., 2021; Choi et al., 2012; Oliver-Ferrando et al., 2017; Shaib et al., 2017). In the present study, characteristic lesions were observed in the liver in addition to lymphoplasmacytic epicarditis. However, no reports of epicarditis in IBH outbreaks have been published.

The occurrence of FAdV (group 1) in Brazil in the state of São Paulo was reported in 2014 (Mettifogo et al., 2014) in chicken isolates through the detection of group I avian adenoviruses via PCR. In the same year, another study demonstrated the occurrence of disease caused by FAdV in chickens, laying hens, and breeders in Minas Gerais (Pereira et al., 2014). In this study, the livers of young and old laying hens, broiler chickens, and breeders were sampled. The presence of FAdV DNA was demonstrated in 100% (25/25) of old layers (78 weeks old) and 36% (9/25) of young layers (18 days old) using PCR. In broiler chickens, the detection rate varies between 24 and 86%. In Brazil, in 2018, the occurrence of FAdV-11, FAdV-8a, and FAdV-8b serotypes in broilers was reported in samples from poultry flocks with clinically enteric problems and a decrease in zootechnical gains (De la Torre et al., 2018).

A recent study in Brazil described an outbreak of hepatitis-hydropericardium syndrome (HHS) coinfection with CAV in three-week-old industrial broiler breeders and found that the partial sequence of FAdV isolate hexon gene enabled grouping with E species (Marín et al., 2023).

In the present study, phylogenetic analysis based on comparison of the 590 bp L1 region of hexon gene of the FAdV isolate proved to be compatible with FAdV-11.

This present study is the first to diagnose FAdV-11 as the causative agent of an IBH vertical outbreak in broiler breeders in Brazil. Evolutionary analysis showed a divergence of 0.6% in the study samples compared to FAdV-11 (accession no. KY229176) identified through pancreatic samples in broilers with clinically malabsorption and undigested food in Brazil (De la Torre et al., 2018). When the sample in the present study was compared to other serotypes of specie D, there was a 2% divergence for FAdV D2 (accession no. EU979368) isolated in Australia and a 21.5% divergence for FAdV D3 (accession no. LC483161) isolated in India in the commercial layer.

When compared to other species isolated in Brazil, the present isolate of FAdV-11 obtained a divergence of 26.70% compared to FAdV E6 (accession no. MF161433) and 27.7% of divergence of the isolate of FAdV E8a (accession no. KY229177) isolated in São Paulo in 2016, demonstrating the polyphyletic characteristic of FAdV D and E.

Identification of FAdV serotypes is essential in epidemiological studies of disease outbreaks because it is possible to develop preventative measures and adopt vaccination strategies (Cizmecigil et al., 2020).

5.5 CONCLUSIONS

The present study is the first to report a vertical outbreak of IBH caused by FAdV-D serotype 11 in a commercial broiler breeder farm in Brazil, with high mortality in the first two weeks of life.

5.6 REFERENCES

Abghour, S., Mouahid, M., Darkaoui, S., Berrada, J., Zro, K., and Kichou, F. 2021. "Pathogenicity of field strain of fowl aviadenovirus serotype 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Morocco." *Plos one* 16 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261284>

Abghour, S., Zro, K., Mouahid, M., Tahiri, F., Tarta, M., Berrada, J., and Kichou, F. 2019. "Isolation and characterization of fowl aviadenovirus serotype 11 from chickens

with inclusion body hepatitis in Morocco." *PLoS one* 14 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227004>

Akhtar, S. 1995. "Lateral spread of the aetiologic agent (s) of hydropericardium syndrome in broiler chickens." *The Veterinary Record* 136 (5): 118-120. doi: 10.1136/vr.136.5.118

Alzuheir, I.M., Jalboush, N.H., Fayyad, A.F., and Daibes, R.A. 2021. "Phylogenetic analysis and pathological characterization of fowl adenovirus isolated during inclusion body hepatitis outbreak in Tubas, Palestine." *Veterinary Research Forum*. 12 (4) 511). doi: 10.30466/vrf.2020.116932.2778

Aviagen. 2018. Management Randbook: *Ross 95 Handbook*. Huntsville. US: Aviagen

Choi, K.S., Kye, S.J., Kim, J.Y., Jeon, W.J., Lee, E.K., Park, K.Y., and Sung, H.W. 2012. "Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infection in commercial chickens in Korea." *Poultry Science* 91 (10): 2502-2506. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02296>

Christensen, N.H., and Saifuddin, M.D. 1989. "A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers." *Avian Diseases*: 622-630. <https://doi.org/10.2307/1591135>

Cizmecigil, U.Y., Umar, S., Yilmaz, A., Bayraktar, E., Turan, N., Tali, B., Aydin, O., Tali, H.E., Yaramanoglu, M., and Yilmaz, S.G. 2020. "Characterisation of fowl adenovirus (FAdV-8b) strain concerning the geographic analysis and pathological lesions associated with inclusion body hepatitis in broiler flocks in Turkey." *Journal of Veterinary Research* 64 (2): 231-237. doi: 10.2478/jvetres-2020-0026

Cook, K.A. 1974. "Spread of an Avian Adenovirus (CELO Virus) to Uninoculated Fowls Jane." *Research in veterinary science* 16 (2): 156-161. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)33744-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)33744-5)

De Herdt, P., Timmerman, T., Defoort, P., Lycke, K., and Jaspers, R. 2013. "Fowl adenovirus infections in Belgian broilers: a ten-year survey." *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82 (3). <https://doi.org/10.21825/vdt.v82i3.16704>

De la Torre, D.I., Nuñez, L.F., Astolfi-Ferreira, C.S., and Ferreira, A.J.P. 2018. "Enteric virus diversity examined by molecular methods in Brazilian poultry flocks." *Veterinary Sciences* 5 (2): 38. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020038>

Franzo, G., Prentza, Z., Paparounis, T., Tsioris, V., Centonze, G., Legnardi, M., Catelli, E., Tucciarone, C.M., Koutoulis, K., and Cecchinato, M. 2020. "Molecular epidemiology of fowl adenoviruses in Greece." *Poultry science* 99 (11): 5983-5990. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.019>

Gallina, A.M., Winterfield, R.W., and Fadly, A.M. 1973. "Adenovirus infection and disease. II. Histopathology of natural and experimental disease." *Avian Diseases*: 343-353. <https://doi.org/10.2307/1589218>

Gomis, S., Goodhope, R., Ojkic, D., and Willson, P. 2006. "Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada." *Avian diseases* 50 (4): 550-555. <https://doi.org/10.1637/7577-040106R.1>

Grafl, B., Aigner, F., Liebhart, D., Marek, A., Prokofieva, I., Bachmeier, J., and Hess, M. 2012. "Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion." *Avian Pathology* 41 (6): 599-604. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.740614>

Grgic, H., Philippe, C., Ojkic, D., and Nagy, É. 2006. "Study of vertical transmission of fowl adenoviruses." *Canadian journal of veterinary research* 70 (3): 230. PMC1477927

Helmboldt, C.F., and Frazier, M.N. 1963. "Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance." *Avian diseases* 7 (4): 446-450. <https://doi.org/10.2307/1587881>

Hosseini, H., Langeroudi, A.G., FallahMehrabadi, M.H., Kafi, Z.Z., Dizaji, R.E., Ghafouri, S.A., Hamadan, A.M., Aghaiyan, L., and Hajizamani, N. 2020. "The fowl

adenovirus (Fadv-11) outbreak in Iranian broiler chicken farms: The first full genome characterization and phylogenetic analysis." *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 70: 101365. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101365>

ICTV. 2022. International Committee on Taxonomy of Viruses: Adenoviridae. US.

Kiss, I., Homonnay, Z.G., Mató, T., Bányai, K., and Palya, V. 2021. "Research Note: An overview on distribution of fowl adenoviruses." *Poultry science* 100 (5): 101052. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101052>

Kumar, V., Kumar, R., Chandra, R., Bhatt, P., and Dhama, K. 2013. "Outbreaks of inclusion body hepatitis (IBH) in chickens; pathological studies and isolation of fowl adenovirus." *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 1 (3): 21-24.

Lim, T., Lee, H., Lee, D., Lee, Y., Park, J., Youn, H., Kim, M., Youn, H., Lee, J., and Park, S. 2011. "Identification and virulence characterization of fowl adenoviruses in Korea." *Avian diseases* 55 (4): 554-560. <https://doi.org/10.1637/9730-032011-Reg.1>

Mariappan, A.K., Munusamy, P., Latheef, S.K., Singh, S.D., and Dhama, K. 2018. "Hepato nephropathology associated with inclusion body hepatitis complicated with citrinin mycotoxicosis in a broiler farm." *Veterinary World* 11 (2): 112. doi:10.14202/vetworld.2018.112-117

Marín, S.Y., Ecco, R., Neto, O.C.F., Silva, D.H.L., Marcelino, S.A.C., Lopes, M.C., Costa, C.S., Resende, M., Teixeira, M.S., and Martins, N.R.S. 2023. "Fowl Aviadenovirus E associated with hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler breeders." *Ciência Rural* 53 (3): e20210462. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210462>

Matos, M., Grafl, B., Liebhart, D., and Hess, M. 2016. "The outcome of experimentally induced inclusion body hepatitis (IBH) by fowl aviadenoviruses (FAdVs) is crucially influenced by the genetic background of the host." *Veterinary research* 47 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0350-0>

Mei, C., Xian, H., Blackall, P.J., Hu, W., Zhang, X., and Wang, H. 2020. "Concurrent infection of *Avibacterium paragallinarum* and fowl adenovirus in layer chickens." *Poultry science* 99 (12): 6525-6532. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.033>

Mettifogo, E., Nuñez, L.F.N., Parra, S.H.S., Astolfi-Ferreira, C.S., and Ferreira, A.J.P. 2014. "Fowl adenovirus Group I as a causal agent of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HPS) outbreak in brazilian broiler flocks." *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34: 733-737. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000800004>

Morshed, R., Hosseini, H., Langeroudi, A.G., Fard, M.H.B., and Charkhkar, S. 2017. "Fowl adenoviruses D and E cause inclusion body hepatitis outbreaks in broiler and broiler breeder pullet flocks." *Avian diseases* 61 (2): 205-210. <https://doi.org/10.1637/11551-120516-Reg.1>

Nei, M., and Kumar, S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, USA. 333p.

Niu, Y, Q Sun, G Zhang, W Sun, X Liu, Y Xiao, Y Shang, and S Liu. 2018. "Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infections in commercial chickens in China." *Transboundary and emerging diseases* 65 (1): e121-e126. <https://doi.org/10.1111/tbed.12691>

Ojkic, D., Martin, E., Swinton, J., Vaillancourt, J., Boulian, M., and Gomis, S. 2008. "Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses." *Avian Pathology* 37 (1): 95-100. <https://doi.org/10.1080/03079450701805324>

Oliver-Ferrando, S., Dolz, R., Calderón, C., Valle, R., Rivas, R., Pérez, M., Biarnés, M., Blanco, A., Bertran, K., and Ramis, A. 2017. "Epidemiological and pathological investigation of fowl aviadenovirus serotypes 8b and 11 isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Spain (2011–2013)." *Avian pathology* 46 (2): 157-165. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1232477>

Pereira, C.G., Marin, S.Y., Santos, B.M., Resende, J.S., Resende, M., Gomes, A.M., and Martins, N.R.S. 2014. "Occurrence of Aviadenovirus in chickens from the poultry industry of Minas Gerais." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 66: 801-808. <https://doi.org/10.1590/1678-41625899>

Radwan, M.M., El-Deeb, A.H., Mousa, M.R., El-Sanousi, A.A., and Shalaby, M.A. 2019. "First report of fowl adenovirus 8a from commercial broiler chickens in Egypt: molecular characterization and pathogenicity." *Poultry science* 98 (1): 97-104. <https://doi.org/10.3382/ps/pey314>

Revajova, V., Herich, R., Seman, V., Levkut Jr, M., Levkutova, M., Karaffova, V., and Levkut, M. 2017. "An unusual outbreak of inclusion body hepatitis on a broiler chicken farm: a case report." *Veterinární medicína* 62 (11): 631-635. <https://doi.org/10.17221/95/2017-VETMED>

Saifuddin, M.D., and Wilks, C.R. 1991. "Vertical transmission of avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis." *New Zealand Veterinary Journal* 39 (2): 50-52. <https://doi.org/10.1080/00480169.1991.35659>

Schachner, A., Matos, M., Grafl, B., and Hess, M. 2018. "Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation." *Avian Pathology* 47 (2): 111-126. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1385724>

Sentíes-Cué, C.G., Wills, R.W., Stayer, P.A., Burleson, M.A., and Magee, D.L. 2010. "Epidemiology and effect on production parameters of an outbreak of inclusion body hepatitis in broilers." *Avian diseases* 54 (1): 74-78. <https://doi.org/10.1637/8958-061109-Reg.1>

Shaib, H., Nour, R., Mahmoud, G., Nassif, G., and Chedid, S. 2017. "Outbreak of inclusion body hepatitis causing Adenovirus in Lebanese Broiler flocks." *EC Microbiology* 13 (3): 92-101.

Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D., and Noormohammadi, A.H. 2009. "Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve

analysis of the hexon gene region." *Journal of clinical microbiology* 47 (2): 311-321. <https://doi.org/10.1128/jcm.01567-08>

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." *Molecular biology and evolution* 28 (10): 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>

Toro, H, Gonzalez, O. Escobar, C., Cerda, L., Morales, M.A. and Gonzalez, C. 2001. "Vertical induction of the inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome with fowl adenovirus and chicken anemia virus." *Avian diseases*: 215-222. <https://doi.org/10.2307/1593031>

Tsiouris, V., Mantzios, T., Kiskinis, K., Guérin, J., Croville, G., Brellou, G.D., Apostolopoulou, E.P., Petridou, E.J., and Georgopoulou, I. 2022. "First Detection and Identification of FAdV-8b as the Causative Agent of an Outbreak of Inclusion Body Hepatitis in a Commercial Broiler Farm in Greece." *Veterinary Sciences* 9 (4): 160. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040160>

Wilson, F.D, Wills, R.W., Senties-Cue, C.G., Maslin, W.R., Stayer, P.A., and Magee, D.L. 2010. "High incidence of glomerulonephritis associated with inclusion body hepatitis in broiler chickens: routine histopathology and histomorphometric studies." *Avian diseases* 54 (3): 975-980. <https://doi.org/10.1637/9050-090709-Reg.1>

Şahindokuyucu, İ., Çöven, F., Kılıç, H., Yılmaz, Ö., Kars, M., Yazıcıoğlu, Ö., Ertunc, E., and Yazıcı, Z. 2020. "First report of fowl aviadenovirus serotypes FAdV-8b and FAdV-11 associated with inclusion body hepatitis in commercial broiler and broiler-breeder flocks in Turkey." *Archives of virology* 165 (1): 43-51. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04467-8>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adenovirose e a reovirose estão presentes na cadeia de produção de matrizes e frango de corte, respectivamente. A investigação epidemiológica, sinais clínicos, achados macroscópicos, histológicos, sorológicos e diagnóstico molecular atualmente são ferramentas acessíveis e que devem ser utilizadas de forma conjunta para um diagnóstico mais preciso.

O Reovírus aviário pode estar presente no tendão gastrocnêmio sem aumento nas condensações por artrite, causando lesões macroscópicas e histológicas em diferentes graus. Sugere-se tratar de uma síndrome multifatorial que necessita ser melhor estudada.

Além disso, a transmissão vertical de Adenovírus aviário é uma forma importante na disseminação da doença. Sugere-se além de medidas preventivas de biosseguridade nas granjas de reprodutoras, o desenvolvimento de vacinas para auxiliar na diminuição da transmissão transovariana do vírus.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2022.**

Disponível em: <https://abpa-br.org/quem-somos/abpa-relatorio-anual/> Acesso em: 15 maio 2023.

ADAIR, B.; M., FITZGERALD, S. D. **Adenovirus infections.** In.: Saif, Y.M. Diseases of Poultry. 12. ed. Ames: Iowa State, 2008. p.251-296.

ANJUM, A. D.; SABRI, M. A.; IQBAL, Z. Hydropericarditis syndrome in broiler chickens in Pakistan. **The Veterinary Record**, v. 124, n. 10, p. 247-248, 1989.

AL AFALEQ, A. I.; JONES, R. C. Localisation of avian reovirus in the hock joints of chicks after entry through broken skin. **Research in veterinary science**, v. 48, n. 3, p. 381-382, 1990.

BERTRAN, K. et al. A 10-Year Retrospective Study of Inclusion Body Hepatitis in Meat-Type Chickens in Spain (2011–2021). **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2170, 2021.

CHEEMA, A. H. An adenovirus infection of poultry in Pakistan. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 8, p. 789-798, 1989.

CHEN, Y. S. et al. Avian reovirus replication in mononuclear phagocytes in chicken footpad and spleen after footpad inoculation. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 2, p. 87-94, 2015.

CHRISTENSEN, N. H.; SAIFUDDIN, M. A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. **Avian Diseases**, p. 622-630, 1989.

CLARK, F. D. et al. Characterization of avian reovirus strain-specific polymorphisms. **Avian diseases**, p. 304-314, 1990.

DE CARLI, S. et al. Genotypic characterization and molecular evolution of avian reovirus in poultry flocks from Brazil. **Avian Pathology**, v. 49, n. 6, p. 611-620, 2020.

DE HERDT, P. et al. Field experiences with ERS type reovirus infections in diseased broilers reared under Western European field circumstances. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**. v.78, p.171-175, 2008.

DE LA TORRE, D. et al. Emerging new avian reovirus variants from cases of enteric disorders and arthritis/tenosynovitis in Brazilian poultry flocks. **British Poultry Science**, v. 62, n. 3, p. 361-372, 2021.

FADLY, A. M.; WINTERFIELD, R. W. Isolation and some characteristics of an agent associated with inclusion body hepatitis, hemorrhages, and aplastic anemia in chickens. **Avian Diseases**, p. 182-193, 1973.

FARKAS, S. L. et al. Lineage diversification, homo-and heterologous reassortment and recombination shape the evolution of chicken orthoreoviruses. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

GOMIS, S. et al. Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. **Avian diseases**, v. 50, n. 4, p. 550-555, 2006.

GRAFL, B. et al. Vertical transmission and clinical signs in broiler breeders and broilers experiencing adenoviral gizzard erosion. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 599-604, 2012.

GUO, R. et al. Induction of arthritis in chickens by infection with novel virulent *Salmonella Pullorum* strains. **Veterinary microbiology**, v. 228, p. 165-172, 2019.

HELMBOLDT, C. F.; FRAZIER, M. N. Avian hepatic inclusion bodies of unknown significance. **Avian diseases**, v. 7, n. 4, p. 446-450, 1963.

HOFFMANN, R. et al. Lesions in chickens with spontaneous or experimental infectious hepato-myelopoietic disease (inclusion body hepatitis) in Germany. **Avian Diseases**, p. 224-236, 1975.

JONES, R. C.; GEORGIOU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. **Avian pathology**, v. 13, n. 3, p. 441-457, 1984.

JONES, R. C.; ISLAM, M. R.; KELLY, D. F. Early pathogenesis of experimental reovirus infection in chickens. **Avian Pathology**, v. 18, n. 2, p. 239-253, 1989.

JONES, R.C. Avian reovirus infection. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**. v.19, n.2, p.614-625, 2000.

JONES, R.C.; ONUNKWO, O. Studies on experimental tenosynovitis in light hybrid chickens. **Avian Pathology**. v.7, n.1, p.171-181, 1978.

JONES, R. C. Reovirus infections. **Diseases of poultry**, p. 351-373, 2013.

KAJÁN, Győző L. et al. An emerging new fowl adenovirus genotype. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01732, 2019.

KINBENGE, F. S. B. et al. Bacterial and viral agents associated with tenosynovitis in broiler breeders in Western Australia. **Avian Pathology**. v.11, n.3, p.351-359, 1982.

LIU, H.J. Rapid characterization of avian reoviruses using phylogenetic analysis, reverse transcription polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. **Avian Pathology**. v.33, n.2, p.171-180, 2004.

LU, H. et al. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011–2014. **Scientific RepoRts**. v.5, p.14727, 2015.

MATOS, M.I et al. Selected clinical chemistry analytes correlate with the pathogenesis of inclusion body hepatitis experimentally induced by fowl aviadenoviruses. **Avian Pathology**, v. 45, n. 5, p. 520-529, 2016.

MAZAHERI, A. et al. Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. **Avian Pathology**, v. 27, n. 3, p. 269-276, 1998.

MARÍN, S. Y. et al. Fowl Aviadenovirus E associated with hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler breeders. **Ciência Rural**, v. 53, 2023.

METE, A. et al. Emergence of fowl aviadenovirus C-4 in a backyard chicken flock in California. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 4, p. 806-809, 2021.

MENENDEZ, N. A.; CALNEK, B. W.; COWEN, B. S. Experimental egg-transmission of avian reovirus. **Avian Diseases**, p. 104-111, 1975.

METTIFOGO, E. et al. Fowl adenovirus Group I as a causal agent of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HPS) outbreak in brazilian broiler flocks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 8, p. 733-737, 2014.

MITTAL, D.; JINDAL, N.; KHOKHAR, R. S. Epidemiological studies on inclusion body hepatitis-hydropericardium syndrome in broiler chicken in Haryana state. **Haryana Vet**, v. 53, n. 1, p. 34-38, 2014.

NAKAMURA, K. et al. Inclusion body hepatitis caused by fowl adenovirus in broiler chickens in Japan, 2009–2010. **Avian Diseases**, v. 55, n. 4, p. 719-723, 2011.

NICZYPORUK, J. S. Phylogenetic and geographic analysis of fowl adenovirus field strains isolated from poultry in Poland. **Archives of virology**, v. 161, n. 1, p. 33-42, 2016.

OLIVEIRA, A. A. et al. Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, p. 79-89, 2016.

ONO, M. et al. Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. **Veterinary pathology**, v. 40, n. 3, p. 294-303, 2003.

ONO, M. et al. Epizootic outbreaks of gizzard erosion associated with adenovirus infection in chickens. **Avian diseases**, p. 268-275, 2001.

PALOMINO-TAPIA, V. et al., Molecular characterization of emerging avian reovirus variants isolated from viral arthritis cases in Western Canada 2012–2017 based on partial sigma (σ)C gene. **Virology**. v.522, p.138–146, 2018.

PITCOVSKI, J.; GOYAL, S. M. **Avian reovirus infections**. Diseases of poultry, p. 382-400, 2020.

RADWAN, M. M. et al. First report of fowl adenovirus 8a from commercial broiler chickens in Egypt: molecular characterization and pathogenicity. **Poultry science**, v. 98, n. 1, p. 97-104, 2019.

RECK, C. et al. Molecular detection of *Mycoplasma synoviae* and avian reovirus infection in arthritis and tenosynovitis lesions of broiler and breeder chickens in Santa Catarina State, Brazil. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 90, n. 1, p. 1-5, 2019.

REECE, R. L.; GRIX, D. C.; BARR, D. A. An unusual case of inclusion body hepatitis in a cockerel. **Avian Diseases**, p. 224-227, 1986.

RODRÍGUEZ, J. et al. Molecular characterization of Peruvian fowl adenovirus (FAdV) isolates. **Advances in Microbiology**, v. 2014, 2014.

ROSENBERGER, J. K. et al. The role of the infectious bursal agent and several avian adenoviruses in the hemorrhagic-aplastic-anemia syndrome and gangrenous dermatitis. **Avian Diseases**, p. 717-729, 1975.

ROSENBERGER, J. K. et al. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. I. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. **Avian diseases**, p. 535-544, 1989.

SAIFUDDIN, M.; WILKS, C. R. Pathogenesis of an acute viral hepatitis: inclusion body hepatitis in the chicken. **Archives of virology**, v. 116, n. 1-4, p. 33-43, 1991.

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

SCHACHNER, A. et al. Fowl adenovirus-induced diseases and strategies for their control—a review on the current global situation. **Avian Pathology**, v. 47, n. 2, p. 111-126, 2018.

SCHACHNER, A. et al. Detailed molecular analyses of the hexon loop-1 and fibers of fowl aviadenoviruses reveal new insights into the antigenic relationship and confirm that specific genotypes are involved in field outbreaks of inclusion body hepatitis. **Veterinary microbiology**, v. 186, p. 13-20, 2016.

SELLERS, H. S. Current limitations in control of viral arthritis and tenosynovitis caused by avian reoviruses in commercial poultry. **Veterinary microbiology**, v. 206, p. 152-156, 2017.

SOUMYALEKSHMI, S.; AJITH, M. K.; CHANDRAPRAKASH, M. Isolation of fowl adenovirus in chicken embryo liver cell culture and its detection by hexon gene based PCR. **Indian Journal of Scientific Research and Technology**, v. 2, n. 3, p. 33-36, 2014.

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

STEER, P. A. et al. Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 311-321, 2009.

STEER, P. A. et al. Chronological analysis of gross and histological lesions induced by field strains of fowl adenovirus serotypes 1, 8b and 11 in one-day-old chickens. **Avian pathology**, v. 44, n. 2, p. 106-113, 2015.

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

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

VAN DER HEIDE, L. The history of avian reovirus. **Avian diseases**, v. 44, n. 3, p. 638-641, 2000.

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

VASCONCELOS, S. B. S et al. 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.

VERA-HERNÁNDEZ, P. F. et al. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenovirus serotype 4. **Avian Pathology**, v. 45, n. 1, p. 73-81, 2016.

VIRUS taxonomy. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: www.ictvonline.org. Acessado em: 27/11/2021

WILSON, F. D. et al. High incidence of glomerulonephritis associated with inclusion body hepatitis in broiler chickens: routine histopathology and histomorphometric studies. **Avian diseases**, v. 54, n. 3, p. 975-980, 2010.

ZHANG, X. et al. Genetic and pathogenic characteristics of newly emerging avian reovirus from infected chickens with clinical arthritis in China. **Poultry Science**, v. 98, n. 11, p. 5321-5329, 2019.