

Renata Luci Rios

**DETECÇÃO MOLECULAR DE REOVÍRUS E ROTAVÍRUS NA
AVICULTURA INDUSTRIAL DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Co-orientador: Prof. Dr. José Sergio Resende

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2010

R586d Rios, Renata Luci, 1980-
Detecção molecular de Reovírus e Rotavírus na avicultura industrial de Minas Gerais /
Renata Luci Rios. – 2010.
37 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Co-orientador: José Sérgio Resende

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Frango de corte – Doenças – Teses. 2. Rotavírus – Teses. 3. Reovírus – Teses.
I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Resende, José Sérgio. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.508 9

FOLHA DE ASSINATURAS

À **Deus** pela maravilha da vida,
Aos meus pais, irmã e à Isa pelo apoio, compreensão e amor incondicional sempre
Ao Julio pela compreensão

Dedico esse trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a maravilhosa oportunidade da vida, por me fazer confiar sempre na vitória e na Sua vontade, por nunca me deixar fraquejar e por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

A Universidade Federal de Minas Gerais e à Escola de Veterinária, pela oportunidade de realização deste trabalho

Ao Professor Nelson pela orientação, por ter confiado em mim, pelos ensinamentos, convivência e paciência sempre.

Ao Professor José Sergio pelo incentivo, credibilidade, críticas e ensinamentos que enriqueceram esse trabalho.

À Professora Bernadete da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio e cooperação.

Aos Professores Marcos Bryan, Rômulo e Maurício Resende pelo apoio durante o período experimental.

Às secretárias da Pós Graduação Débora e Luzete, que sempre foram muito atenciosas e dedicadas.

Ao André, do laboratório de Retrovirus, por se mostrar sempre prestativo e companheiro.

Aos companheiros e amigos do setor de doenças das aves, Sandra, Flávio, Alexis e Rodrigo pelo auxílio na confecção do trabalho, aos colegas Marcus, Daniel, Dani, Alessandra, Chiquinho, Marcela, Mariana e Carol, a todos, muito obrigado pelos momentos juntos.

Aos meus amados pais, Mauro e Inês, que são meu alicerce, meu porto seguro e meu exemplo maior de vida, amor, união, compreensão e carinho. Vocês são e sempre serão como heróis pra mim. À minha irmã, insubstituível amiga que apesar da distância, sempre esteve presente em meus pensamentos, e soube me dar uma palavra de conforto e carinho a todo o momento, sempre tive seu ombro de amiga e irmã. À minha mais que amada sobrinha Isabela por me dar alegria sempre. À minha Meguinha linda pelo amor incondicional durante todos esses anos de ausência.

Ao querido casal Dna Graça e Sr. Expedito, que foram fundamentais nessa etapa da minha vida, agradeço enormemente a Deus por ter me dado a oportunidade de ter vocês comigo sempre me tratando como uma filha. Ao Sr. Expedito agradeço pelas inúmeras conversas e ensinamentos, à Dna Graça meu muito obrigado pelas comidinhas deliciosas, pela energia maravilhosa, pelos conselhos e conversas. Vocês passaram a ser parte da minha família.

Ao Julio, pelo carinho, compreensão, incentivo e amor despendidos a mim.

À amiga Alessandra pelos ótimos momentos, por tantas risadas, confissões, conversas e cumplicidade ao longo desse período.

À amiga Livya pela companhia, conversas, diversões e cumplicidade. Descobri em você uma amiga de verdade.

A Patrícia do laboratório de Malária do ICB pelo auxílio e apoio na confecção de parte desse trabalho.

A Maria Rosa do laboratório de Agentes Recombinantes do ICB pela imensa ajuda na confecção do trabalho, por se mostrar sempre prestativa nos momentos de necessidade.

A Adriana Gomes do laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares do ICB pelas dicas, auxílio e compreensão no momento em que achei que não ia dar certo, aquele dia posso dizer que você foi fundamental para o sucesso desse trabalho.

As granjas onde as amostras foram coletadas, pela disponibilidade e confiança.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida

SUMÁRIO

	RESUMO.....	10
	ABSTRACT.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	11
2.1	Família <i>Reoviridae</i>	11
2.2	Reovírus.....	12
2.2.1	Características do vírus.....	12
2.2.2	Epidemiologia.....	13
2.2.3	Reoviroses	13
2.2.4	Artrite viral e síndrome da má absorção.....	13
2.2.5	Transmissão.....	14
2.2.6	Lesões.....	14
2.2.7	Interação com outros agentes.....	15
2.2.8	Controle.....	15
2.2.9	Diagnóstico.....	15
2.3	Rotavírus.....	16
2.3.1	Características do vírus.....	16
2.3.2	Rotavírus aviário.....	17
2.3.3	Epidemiologia.....	17
2.3.4	A doença.....	18
2.3.5	Transmissão.....	18
2.3.6	Lesões.....	19
2.3.7	Diagnóstico.....	19
3.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Aves.....	19
3.2	Amostragem.....	19
3.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	20
3.4	Extração do RNA para PAGE.....	20
3.5	Técnica do PAGE.....	21
3.6	Coloração do ácido nucléico pela prata.....	21
3.7	Preparo das amostras fecais para RT-PCR	21
3.8	Extração do RNA para as reações de RT-PCR.....	21
3.9	Determinação espectrofotométrica da concentração de RNA.....	22
3.10	Condições da reação em cadeia pela polimerase (<i>nested-pcr</i>) para amplificação de parte do genoma do Reovírus aviário.....	22
3.11	Síntese de cDNA (Transcrição reversa – RT).....	22
3.12	PCR específica (1ª reação – iniciadores externos).....	23
3.13	<i>Nested</i> – PCR (2ª reação – iniciadores internos).....	23
3.14	Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR.....	23
3.15	Inoculação de amostra positiva em ovos <i>SPF</i>	23
3.16	Montagem e edição das seqüências nucleotídicas.....	24
3.17	Busca das seqüências similares em bancos de dados.....	24
3.18	Alinhamento das seqüências.....	24
3.19	Análises filogenéticas.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5	CONCLUSÃO.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização das proteínas estruturais de <i>Orthoreovirus</i> , notadamente as unidades de σ 1 (sigma-1) codificadas pelo respectivo gene, alvo de avaliação por PCR.....	14
Figura 2	Representação esquemática de Rotavírus, indicando a localização das proteínas estruturais.....	13
Figura 3	Foto à microscopia eletrônica de transmissão, mostrando rotavírus com partículas intactas com a borda exterior lisa e partículas com a borda cerrada (seta).....	19
Figura 4	Diagrama dos procedimentos de amostragem e processamento das amostras fecais.....	22
Figura 5	Foto mostrando a presença de refugagem em granja onde foram realizadas as coletas.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores, sequências de bases, gene e localização genômica.....	24
Tabela 2	Amostragem de frangos de corte e poedeiras comerciais das principais regiões da avicultura industrial do Estado de Minas Gerais (n=20 em todas as coletas).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ABEF	Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango
CAV	Anemia Infecciosa das Galinhas
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
df-RNA	Ácido ribonucléico de fita dupla
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático em fase sólida)
ME	Microscopia Eletrônica
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Millimolar
ng	Nanogramas
NS	Proteína não estrutural
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
ρM	Pico Molar
PM	Peso Molecular
RA	Reovírus Aviário
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa/reação em cadeia da polimerase
RT	Transcrição reversa
RV	Rotavírus
SDS	Dodecyl Sodium Sulfate
SMA	Síndrome da má absorção
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TERV	Tampão de Estabilização de Rotavírus
VP	Proteínas Estruturais
μl	Microlitros

RESUMO

As reovirose e rotavirose são infecções causadas por vírus da família *Reoviridae*. São os vírus mais frequentemente detectados ou isolados em excretas de frangos de corte com uma a quatro semanas de idade, e estão quase sempre associados à enterite, diarreia e sinais gerais como diminuição da conversão alimentar e ganho de peso, desuniformidade do lote, refugagem e mortalidade elevada. Nesse estudo foram analisadas 54 amostras de excretas colhidas a campo no período de março de 2008 a janeiro de 2010 nas principais regiões da avicultura industrial de Minas Gerais. As amostras foram investigadas quanto a presença do genoma de Reovírus e Rotavírus, através das técnicas de PAGE e de *Nested-PCR*. Os resultados indicaram a presença do genoma de ambos os vírus nas amostras analisadas, indicando a presença dos vírus na avicultura industrial de Minas Gerais.

Palavras Chave: Reovírus, Rotavírus, *Nested-PCR*, PAGE, Avicultura industrial

ABSTRACT

The reovirose and rotavirose are viroses of the Family *Reoviridae*. These faeces viruses most frequently detected or isolated from feces of broilers with one to four weeks of age. And are most always associated with enteritis. Diarrhea, and general symptoms such as decreased feed conversion and weight gain, desuniformity the lot, and culling high mortality. In this study were analyzed 54 samples of feces collected from the field in the period from March 2008 to January 2010 in the main regions of the poultry industry of Minas Gerais. The samples were investigated for the presence of genome of Reovirus and Rotavirus, through the techniques of PAGE and nested-PCR. The results indicated the presence of genome of both viruses in the samples analyzed, indicating the presence of virus in the poultry industry of Minas Gerais.

Keywords: Reovirus, Rotavirus, *Nested-PCR*, PAGE, Poultry industry

1. INTRODUÇÃO

A produção avícola brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial, sendo o Brasil o principal país exportador de carne de frango. Esse cenário é confirmado pelos números relativos às exportações de carne de frango que totalizaram, no primeiro semestre de 2009, embarques de 1,80 milhão de toneladas, e uma receita cambial de US\$ 2,67 bilhões (ABEF, 2009).

No Brasil, as principais empresas do setor trabalham em sistemas de integração, que facilitam a logística de produção e diminuem os gastos com transporte. Dessa forma, as granjas integradas tendem a se concentrar em uma região ocasionando um aumento da população de aves no local. Com essa intensificação, associada a condições ambientais e práticas de manejo estressantes, ocorre o aumento dos desafios sanitários.

O conhecimento sobre doenças do trato gastrointestinal das aves comerciais teve um grande incremento nas últimas décadas. Porém, estudos no Brasil focados nesse tema são ainda escassos, sobretudo quando são considerados processos de etiologia viral. Dentre as doenças de importância para a avicultura de produção, as doenças entéricas merecem destaque, pois causam diminuição no valor do lote devido à queda da taxa de crescimento, utilização ineficiente do alimento, conversão alimentar alta, desuniformidade, incremento à susceptibilidade e ocorrência de outras doenças, aumento dos custos com medicação e cama úmida, estando diretamente associados à queda no desempenho das aves e geração de produto com baixo valor econômico. Em geral, efeitos de doença no trato digestivo continuam por muito tempo depois da recuperação clínica, podendo a mortalidade ser considerável (Barnes, 1977).

Os vírus são os mais comumente implicados na maioria das infecções que tem grande impacto na sanidade da ave e na performance do lote. Estes incluem rotavírus, coronavírus, enterovírus, adenovírus, astrovírus e reovírus (Guy, 1998). Adicionalmente, infecções entéricas causadas por vírus são responsáveis pelo desenvolvimento de grande número de doenças extra-

gastrointestinais. Os vírus podem induzir alteração da mucosa intestinal, tornando essa porta de entrada para outros patógenos potenciais como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Como consequência desta alteração na mucosa intestinal, podem ser desenvolvidas deficiências nutricionais, especialmente aquelas relacionadas com vitaminas lipossolúveis e minerais (Barnes 1977). O conhecimento dos vírus que causam doença intestinal em aves comerciais, assim como o conhecimento de sua imunologia, patogenia e epidemiologia são necessários para o desenvolvimento de adequados procedimentos de controle. Neste contexto, objetiva-se estudar a ocorrência de reovirose e rotavirose nas principais regiões de avicultura de Minas Gerais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família *Reoviridae*

As reovirose e rotavirose são infecções por vírus da família *Reoviridae*, em que "*Reo*" tem origem na denominação *Respiratory Enteric Orphan*, órfão respiratório entérico, proposto por Sabin em 1959, por serem isolados do trato respiratório e digestivo e não associados a nenhuma doença conhecida na época (Martins & Resende, 2009). São os vírus mais frequentemente detectados ou isolados em excretas de frangos de corte com uma a quatro semanas de idade. Esses vírus estão quase sempre associados à enterite, diarreia e sinais gerais como depressão, anorexia, diminuição da conversão alimentar e ganho de peso, desuniformidade do lote, refugagem e índice de mortalidade elevada (McFerran *et al.*, 1983; Andral *et al.*, 1985; Gouch *et al.*, 1988 e Decaesstecker *et al.*, 1988).

A família *Reoviridae* é constituída por nove gêneros que podem ser divididos em dois grupos. Um grupo compreende os vírus em que as partículas intactas possuem projeções relativamente grandes, situadas nos 12 vértices da estrutura icosaédrica. Os gêneros *Orthoreovirus*, *Cypovirus*, *Aquareovirus*, *Fijivirus* e *Oryzavirus* apresentam tal característica. O segundo grupo inclui aqueles gêneros com um capsídeo mais liso ou quase esférico e sem grandes projeções nos eixos pentaméricos. Esse grupo é caracterizado pelos gêneros *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e

Phytoreovirus. As partículas virais da família *Reoviridae* apresentam 10, 11 ou 12 segmentos genômicos constituídos de RNAs de fita dupla lineares (van Regenmortel *et al.*, 2000).

2.2 Reovírus

2.2.1 Característica do vírus

Os reovírus aviário (RA) e mamífero compõem os dois principais grupos que englobam as diversas espécies do gênero *Reovirus*. A distinção entre os dois grupos é baseada em seu hospedeiro de origem, características antigênicas, presença de hemaglutininas e habilidade em causar fusão celular (Kawamura & Tsubahara, 1966). Os RA apresentam aspectos morfológicos e físico-químicos semelhantes aos reovírus mamíferos (Petek *et al.*, 1967). São vírus resistentes ao calor de 60°C por 8 a 10 horas, e à conservação a 4°C positivos ou a 20°C negativos por mais de três anos. Resistem ao pH 3,0, a 56°C, por 30 minutos, ao éter, lisol a 2% e a formalina a 3%, são sensíveis ao etanol 70%GL e iodo orgânico 0,5% (Martins & Resende, 2009). A estocagem prolongada deve ser efetuada a 70°C negativos ou a 196°C negativos (nitrogênio líquido) (Alfieri, 1992).

Os RA, são caracterizados pelo vírion com aproximadamente 75nm de diâmetro e possuem capsídeo duplo não envelopado e simetria icosaédrica. O genoma é constituído por RNA dupla fita segmentado (Alfieri, 1992). A classificação do reovírus é baseada em sorologia e na patogenicidade com relação à galinha. Recentemente foram descritos em aves 11 patótipos do vírus. São exemplos de estirpes descritas o 2408; S1133, 1733, FC, Reo 25, WVU R19 e Lasswade P100. Destes, o S1133 está mais relacionado aos problemas de pernas, o 2408 aos problemas entéricos e o 1733 em ambos problemas (Rosenberger 2003)

Os segmentos genômicos podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) e de acordo com o peso molecular (PM) podem ser divididos em três diferentes classes; grandes (L, *large*), médios (M, *medium*) e pequenos (S, *small*) (Liu, 1997). Os grandes segmentos de RNA fita dupla são denominados L1, L2 e L3 e tem PM de aproximadamente 2,4 a 2,7 x 10⁶ daltons. A classe intermediária também apresenta

três segmentos: M1, M2 e M3 com PM variando entre 1,3 a 1,7 x 10⁶ daltons. Os pequenos segmentos são quatro: S1, S2, S3 e S4 com PM de aproximadamente 0,68 a 1,2 x 10⁶ daltons (Spandidos & Grahan, 1976 e Gouveia & Schnitzer, 1982).

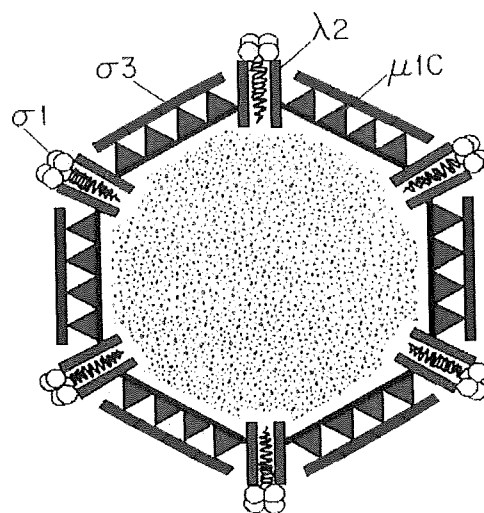


Figura 1: Localização das proteínas estruturais de *Orthoreovirus*, notadamente as unidades de σ 1 (sigma-1) codificadas pelo respectivo gene, alvo de avaliação por PCR.

Os RA têm sido cultivados com sucesso em cultivos celulares primários e em ovos embrionário de galinhas. Nestes, a via de inoculação que mais favorece a replicação do vírus é o saco da gema (Olson *et al.*, 1964), onde resulta em morte do embrião geralmente em três a cinco dias (Glass *et al.*, 1973).

A inoculação na membrana corio-alantóide de ovos embrionados de galinha, também é utilizada com sucesso para isolamento e propagação de RA com a morte embrionária entre três a cinco dias após a inoculação e desenvolvimento de grandes placas necróticas na membrana cório alantóide (Dutta & Pomeroy, 1967).

Os RA estão envolvidos em uma grande variedade de doenças incluindo artrite viral/tenossinovite infecciosa, miocardites, hepatites, síndromes respiratórias, imunodepressão, doenças entéricas e a síndrome da má absorção, das quais é possível o isolamento de RA (Rosenberger, 2003). Entre todas essas patologias, a tenossinovite e a síndrome da má absorção são as afecções mais

consistentes para presença de RA, muito importantes, que causam significativas perdas econômicas na indústria avícola (Tang & Fletcher., 1987).

Na infecção natural de aves por reovírus, ocorre replicação principalmente nas mucosas dos trato digestório e respiratório. Esta replicação inicial é seguida de viremia, que ocorre de 24 a 48 horas após a infecção, resultando na disseminação do vírus por praticamente todos os órgãos (Menendez *et al.*, 1975; Ellis *et al.*, 1983). Apesar de o principal sítio de replicação dos RA parecer ser o trato digestório, o vírus é capaz de persistir por longos períodos em outros tecidos como tendões, oviduto e órgãos linfóides (Alfieri, 1992).

2.2.2 Epidemiologia

Olson *et al.* (1957) descreveram a ocorrência de sinovite da qual eles foram capazes de isolar um agente resistente à terapia das aves com clortetraciclina e a furazolidona e sorologicamente não relacionado a *Mycoplasma gallisepticum* ou *Mycoplasma sinoviae*. Esse agente mais tarde foi nomeado de “agente da artrite viral” por Olson e Kerr (1967) e identificado por Walker *et al.* (1972) como um reovírus por microscopia eletrônica.

Uma importante característica epidemiológica dos RA é sua ampla distribuição entre os plantéis avícolas (Kibenge & Wilcox, 1983), isolados em várias partes do mundo a partir de fezes de aves (frangos de corte, poedeiras, perus, patos, codornas, etc.) com distúrbios entéricos (Alfieri, 1992) e também de aves clinicamente sadias (Robertson & Wilcox, 1984). Devido à disseminação e transmissão vertical, os embriões e seus tecidos podem ser fonte de reovírus que se tornam contaminantes de vacinas especialmente vivas (Van der Reide, 1996).

A doença pode ser prontamente reproduzida em aves SPF de um dia de idade e livre de anticorpos maternos. No entanto, aves mais velhas são infectadas, mas a doença é geralmente menos severa e o período de incubação é mais longo. Resultados similares foram relatados por Rosenberger (1983) com RA isolado de aves com artrite e síndrome da má absorção. Jones e Georgiou (1984) sugeriram que a idade associada à susceptibilidade pode ser devida à inabilidade

de aves jovens em desenvolver uma efetiva resposta imune.

Os plantéis avícolas comprometidos por reovirose podem apresentar alta mortalidade ou mortalidade em níveis normais, embora com morbidade elevada. O aumento da morbidade do plantel revela-se por diminuição da conversão alimentar e ganho de peso, retardo no crescimento, desuniformidade do lote, plumagem anormal, problemas respiratórios e diarreia com intensidade variável (Rosenberger *et al.*, 1989).

No Brasil, reovírus e picobirnavírus, que não variaram no perfil de migração eletroforética, juntamente com rotavírus de nove diferentes eletroferotipos, foram detectados por eletroforese em fezes de frangos de corte com diarreia de até um mês de idade. Reovírus foram detectados em 37,8% e rotavírus em 13,5% das fezes de frangos com diarreia. Em frangos saudáveis, foram detectados rotavírus (1,5%), mas não reovírus. Em frangos com 7 semanas de idade com fezes diarreicas e pastosas foram detectados picobirnavírus (Alfieri *et al.*, 1989; Tamehiro *et al.*, 2003).

2.2.3 Reovirose

2.2.4 Artrite viral e síndrome da má-absorção

Com base nos sinais clínicos, índices de mortalidade, diminuição de ganho de peso, lesões teciduais, invasibilidade e persistência vírica em aves SPF inoculadas experimentalmente com um dia de idade, os vários isolados de RA podem ser classificados como sendo de baixa, intermediária e alta patogenicidade (Rosenberger *et al.*, 1989). De um modo geral, as estirpes classificadas como de baixa patogenicidade não causam mortalidade, redução de ganho de peso ou doença clínica. Os isolamentos de patogenicidade intermediária podem ser responsáveis por taxas de mortalidade que podem alcançar até 10%, diminuição do ganho de peso que pode ser demonstrada por até várias semanas pós inoculação e lesões teciduais microscópicas particularmente nos intestinos (Rosenberger *et al.*, 1989). Porém, os RA considerados de alta patogenicidade podem ser responsáveis, sem associação com outros agentes, por grave enfermidade caracterizada por altas taxas de mortalidade, podendo atingir 80% das aves inoculadas. Observa-se também, nesta

situação, plumagem anormal, diminuição do ganho de peso e conversão alimentar e desuniformidade do lote (Rosenberger *et al.*, 1989).

Uma vez infectadas, as aves jovens têm multiplicação viral nos intestinos, fígado e pâncreas, o que leva ao decréscimo da absorção intestinal, do metabolismo no fígado, da produção de bile e das enzimas digestivas pancreáticas, com má utilização dos nutrientes, conhecida como síndrome da má-absorção (SMA), que pode levar a doenças nutricionais secundárias que, quando somadas à dificuldade locomotora por infecção e inflamação nos tendões, podem levar à osteoporose e necrose da cabeça do fêmur (Bernardino, 2008).

Em inoculações experimentais com RA realizadas por Vasconcelos *et al.* (2001), demonstraram que na inoculação oral, o reovírus é replicado inicialmente no epitélio intestinal, atingindo a circulação através das placas de Peyer intestinais. Já na inoculação através do coxim plantar, as primeiras alterações inflamatórias ocorrem na articulação tibiotársica (artrite viral) e são vistas uma semana após a inoculação, sugerindo que, durante a viremia, o reovírus parece atingir a bainha tendinosa vascularizada através da circulação sanguínea. Já o aparecimento de infiltrado inflamatório, com a presença de heterófilos e células mononucleares nas bainhas tendinosas, durante a primeira semana após a inoculação, também foi descrito e é considerado por Rosenberger e Olson (1991) e Yawei e Kemp (1995), como lesão característica da fase aguda da doença, que, segundo os autores, se estende até quinze dias após a inoculação.

2.2.5 Transmissão

A transmissão via fezes é a forma mais importante de disseminação de RA e uma vez introduzido em uma granja de frangos de corte pode persistir por um longo período.

Os reovírus podem ser transmitidos tanto de forma horizontal quanto vertical (Kerr & Olson, 1969 e Menendez *et al.*, 1975). Devido à pouca persistência do vírus na traquéia, possivelmente a disseminação da infecção ocorra principalmente através da ingestão de água e alimentos contaminados com material fecal (McDonald *et*

al., 1978). A transmissão vertical ocorre em 1 a 2% da progênie de matrizes infectadas e a difusão lateral subsequente ocorre pelo menos por 10 dias a partir de fezes e secreções respiratórias, inclusive de aves de aspecto sadio (Martins & Resende, 2009). A excreção viral ocorre principalmente via trato intestinal e em menor intensidade via trato respiratório (Jones *et al.*, 1975).

A infecção via oral, a qual parece ser o modo de transmissão natural do vírus, resulta em sítios de replicação viral do epitélio do intestino e da bolsa cloacal, que ocorrem dentro de duas a doze horas após a exposição e, a partir dos focos iniciais de replicação. Há viremia e distribuição do vírus em vários tipos de tecidos, incluindo a articulação do tibiotarso, dentro de 24 a 48 horas (Jones *et al.*, 1989).

Tanto em nível de campo como em inoculações experimentais, verifica-se exacerbação da sintomatologia clínica apresentada pelas aves, quando a infecção intestinal por RA ocorre concomitantemente com outros patógenos (Andral *et al.*, 1985; Ritter *et al.*, 1986., Decaesstecker *et al.*, 1988 e Dea & Tijssen, 1988).

2.2.6 Lesões e sintomas

A patogenia dos RA é sugerida por Rosenberger (2003), que, com necrose focal do fígado e pâncreas, levariam à má utilização dos nutrientes, danos às vilosidades intestinais causando a formação de cistos e atrofia das vilosidades, com má absorção dos nutrientes, lesões ósseas levando à artrite e combinações entre elas, sendo que algumas aves infectadas não se recuperam.

Muitas vezes, aves contaminadas com reovírus e positivas tanto na PCR como na resposta sorológica, não exibem nenhum sinal clínico ou lesão macroscópica, embora os valores indicadores de desempenho produtivo possam estar reduzidos (Rosenberger, 2003).

A SMA por RA resulta em sinais e lesões mais frequentes em jovens, como claudicação por osteoporose, artrite-sinovite-tenossinovite, proventriculite com focos de hemorragia ou necrose, aumento do proventrículo, enterite

catarral, degeneração das vilosidades intestinais, paredes intestinais finas com flacidez e/ou distensão (especialmente no duodeno e jejuno inicial), degeneração e atrofia do pâncreas e atrofia da bolsa cloacal (Martins & Resende, 2009).

No pâncreas encontra-se atrofia e fibrose com decréscimo da produção de enzimas, nos intestinos ocorre a atrofia das vilosidades com formação de cavidades císticas e infiltração de linfócitos, que resulta em pobre absorção dos nutrientes; necrose hepática focal; vacuolização e degeneração de hepatócitos e infiltração linfóide, alterando o metabolismo, pró ventrículo aumentado, com espessamento das paredes, dilatação das glândulas e infiltração linfóide, decréscimo na produção de tiroxina na tireóide já no 4º dia pós-infecção e decréscimo na conversão de T4 para T3 no fígado, levando ao retardo no crescimento dos ossos, diminuição da tíbia, osteoporose e osteocondrose da cabeça do fêmur, pela menor deposição de minerais (Rosenberger, 2003).

Após quatro dias da infecção, o vírus pode ser isolado no aparelho respiratório; digestivo; reprodutivo; linfóide e tendões e, apesar de ser mais facilmente isolado dos intestinos, pode persistir por muito tempo em certos tecidos (tendões; tecido linfóide e oviduto) mesmo após terminada a replicação intestinal (Saif et al., 2003)

2.2.7 Interação com outros agentes

RA tem sido associado com doenças imunodepressoras ou supressoras, como doença infecciosa bursal (DIB) ou de Gumboro, causada pelo vírus da DIB (*infectious bursal disease virus*, IBDV) e a anemia infecciosa das galinhas, causada pelo vírus de anemia das galinhas (*chicken anemia virus*, CAV), infecções que podem estar presentes em animais clinicamente sadios ou com alterações clínicas durante as primeiras cinco semanas de idade (McNeilly et al., 1995). Nesses casos, o processo é muito mais grave tanto de imunossupressão como no quadro entérico. Já nos casos de problemas locomotores, os agentes potencializadores secundários mais envolvidos podem ser os estafilococos e o *Mycoplasma synoviae* (Rosenberger 2003).

Tanto em nível de campo como em inoculações experimentais, verifica-se uma exacerbação dos sinais clínicos apresentados pelas aves, quando a infecção intestinal por RA ocorre concomitantemente com outros enteropatógenos (Andral et al, 1985), como é o caso da infecção por *Eimeria acervulina* e *Eimeria mitis*, bem como aumenta os problemas de perna (Ruff e Rosenberger., 1985)

2.2.8 Controle

Devido à possibilidade de ocorrência de transmissão vertical do vírus é importante prevenir a infecção nas matrizes. Isso pode ser feito através de medidas rigorosas de biossegurança (Back, 2004). A aquisição de planteis livres e a criação em ambiente com biosseguridade são também estratégias ideais de controle (Martins & Resende 2009).

A imunização é possível ferramenta de controle contra as reoviroses. Aves de um dia de idade são mais susceptíveis aos sorotipos patogênicos e vão se tornando mais resistentes à infecção de acordo com a maturidade do sistema imune. Programas de vacinação podem privilegiar a proteção efetiva nos primeiros dias de vida das aves por meio da imunidade materna (Santos et al., 2009). Entretanto, as progênes de matrizes vacinadas podem manter localização articular em estado de portador do vírus patogênico usado em desafio homólogo ao vírus vacinal (Jones, 1976). Esta situação indicaria a imunidade parcial como causa da localização articular. A transmissão vertical pode ocorrer em matrizes portadoras (Menendez et al., 1975; Van der Heide & Kalbac, 1975) e matrizes desafiadas via oral, nasal ou traqueal.

2.2.9 Diagnóstico

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do RNA do reovírus de forma rápida e econômica. O seqüenciamento e análise dos produtos da PCR permite estabelecer relações filogenéticas entre diferentes isolados e estirpes, auxiliando assim, o entendimento da biologia molecular e epidemiologia do agente.

Reações de *nested*-PCR demonstraram ser mais específicas e até 100 vezes mais sensíveis que

PCRs convencionais (Cardona *et al.*, 2000; Imai *et al.*, 1998; Simionatto *et al.*, 2005).

Os anticorpos específicos podem ser detectados prontamente em ELISA, com o teste de precipitação em agar gel (gel-precipitação ou imunodifusão) ou por imunofluorescência direta.

2.3 Rotavírus

2.3.1 Características do vírus

As partículas de rotavírus (RV) isoladas em espécies mamíferas e aviárias são, quando examinadas à microscopia eletrônica (ME), morfológicamente indistinguíveis. O vírion, com aproximadamente 70nm de diâmetro, possui capsídeo duplo não envelopado e simetria icosaédrica (Alfieri, 1992). O genoma é composto de RNA fita dupla (df) (manter) com 11 segmentos. A denominação do gênero *Rotavírus* é derivada do latim “rota” (roda), devida à aparência em ME (Cukor., 1984). RV podem ser classificados, de acordo com antígenos de grupo, localizados na proteína viral VP6 do capsídeo em grupos A (grupo protótipo), B, C, D e E (grupos atípicos).

Os genes de RV codificam proteínas estruturais (VP) encontradas na partícula vírica e proteínas não estruturais (NS) encontradas em células infectadas, mas não em partículas maduras. É consenso que o produto protéico de seis regiões genômicas ou genes (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) são proteínas encontradas na partícula viral e que outros cinco segmentos codificam proteínas não estruturais (Estes & Cohen, 1989).

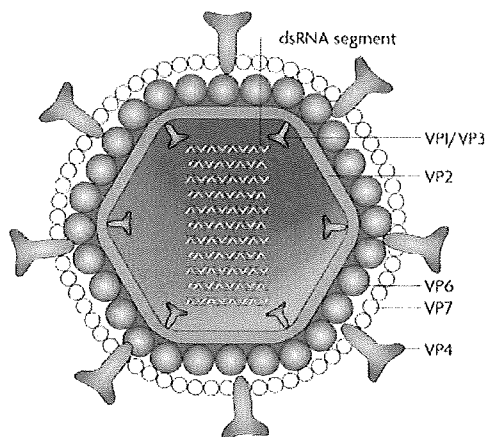
As proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP6 estão localizadas no capsídeo interno do vírion. VP4 e VP7 são antígenos que sensibilizam o organismo a produzir anticorpos neutralizantes, pois estão situados no capsídeo externo (Estes & Cohen, 1989). Sobre a ação as enzimas proteolíticas, VP4 é a precursora de VP5 e de VP8. A clivagem de VP4 aumenta a infectividade de RV aviário e mamífero, pois esta proteína está associada com a restrição de replicação de certas estirpes de RV em cultivo celular. O aumento da infectividade tem sido relacionado com o aparecimento de VP5 (Espejo *et al.*, 1981).

O peso molecular (PM) das proteínas estruturais varia de aproximadamente 125.000 daltons a 33.000 daltons e o das proteínas não estruturais de 53.000 daltons a 20.000 daltons (Kang *et al.*, 1988 e Estes & Cohen, 1989).

O genoma dos RV contém 11 segmentos os quais variam em PM de 2×10^5 a $2,2 \times 10^6$ daltons. O PM estimado dos 11 segmentos é de 11×10^6 a 14×10^6 daltons. Com base no PM, os 11 segmentos genômicos de RV podem ser distribuídos em quatro classes que são claramente demonstradas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) do RNA viral (Lourenço *et al.*, 1981).

Seis diferentes grupos (A a F) de RV tem sido descritos. Os grupos A, B e C já foram encontrados tanto em animais como em humanos. Porém os grupos D, E e F somente foram encontrados em animais (Bridger, 1987). Na maioria dos casos, o genoma do grupo A de RV é composto por quatro segmentos de RNA dupla fita de alto PM (segmentos 1 a 4); dois segmentos de PM intermediário (segmentos 5 e 6); três segmentos de pequeno PM (segmentos 7, 8 e 9) e dois de PM muito pequeno (segmentos 10 e 11), constituindo respectivamente as classes I, II, III e IV (Chanock *et al.*, 1983). Na maioria dos casos, os segmentos do genoma do grupo A de RV podem ser agrupados em quatro classes de acordo com o PM, (I) quatro segmentos de RNA df de alto PM (segmentos 1 a 4), (II) dois segmentos de PM intermediário (segmentos 5 e 6), (III) três segmentos de pequeno PM (segmentos 7, 8 e 9) e (IV) dois de PM muito pequeno (segmentos 10 e 11) (Chanock *et al.*, 1983).

O perfil padrão básico de migração de RNA df de RV descrito acima é o de maior ocorrência, a análise de RNA através de PAGE tem demonstrado que alguns RV possuem padrão de migração genômico diferente. A variabilidade eletroforética das diversas estirpes de RV é conhecida como eletroferogrupos (Estes *et al.*, 1984)



Nature Reviews | Microbiology

<http://www.microbiologybytes.com/virology/Reoviruses.html>

Figura 2. Desenho esquemático de Rotavírus, indicando a localização das proteínas estruturais

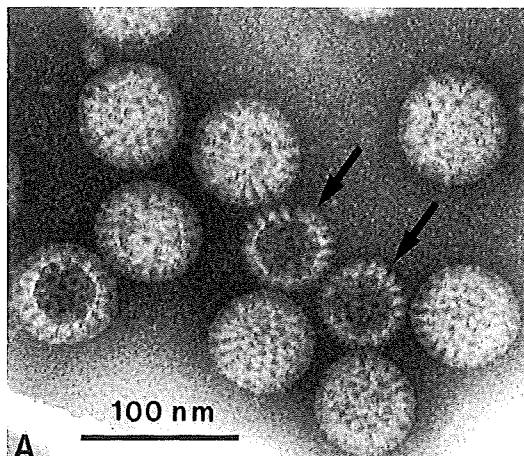


Figura 3: Foto à microscopia eletrônica de transmissão, mostrando rotavírus com partículas intactas com a borda exterior lisa e partículas menores incompletas com a borda serrilhada (seta). Fonte ROSENBERGER, 2003.

A infectividade dos RV mamífero e aviário é relativamente estável após o tratamento do vírion com éter, clorofórmio, sonicação, repetidos ciclos de congelamento/descongelamento e à incubação à 37°C por uma hora. Após cinco minutos de incubação a 50°C, 80% da infectividade da grande maioria dos RV é perdida e após 30 minutos a perda atinge 99% (Estes *et al.*, 1979). Os RV não são inativados pelos desinfetantes comuns, fato que dificulta o seu controle no meio ambiente. Etanol 95% é o mais efetivo desinfetante. Produtos à base de

hipoclorito também podem exercer ação virucida (Tan & Schnagl, 1981 e 1983).

Existe pouca informação a respeito da patogenia do rotavírus aviário, mas algo pode ser dito do que é conhecido sobre as rotavirose em mamíferos. Com ambos os rotavírus, aviário e mamífero, as células-alvo são maturadas a partir de células localizadas no epitélio viloso intestinal. Sob circunstâncias normais, essas células tem uma vida relativamente curta em mamíferos e aves, descamando nas pontas das vilosidades. Elas são replicadas por um processo de divisão celular nas criptas, seguido por migração das células inferiores do vilos para as pontas. Células da cripta são imaturas e pobremente diferenciadas. Como elas migram para o topo das vilosidades, elas diferenciam e começam a produzir dissacaridases, fosfatase alcalina e mecanismos para transportar sódio. Em leitões infectados por rotavírus, a infecção e destruição de células epiteliais maduras resulta em uma diminuição de divisão e da aceleração da migração das células das criptas, então esses vírus são revestidos com células imaturas e pobremente diferenciadas, deficientes em dissacarídeos, fosfatase alcalina, e ATPase. A estimulação de glicose, o transporte de sódio, potássio, cloro e água são também diminuídos, produzindo uma severa diarreia aquosa com perda de eletrólitos pelas fezes (Hamilton & Gall, 1982).

2.3.2 Rotavirus aviário

2.3.3 Epidemiologia

O rotavírus aviário (RVA) foi primeiramente detectado em conteúdo intestinal de perus jovens com enterite, diarreia, diarreia aquosa e alta mortalidade em Dakota no sul dos Estados Unidos (Bergeland *et al.*, 1977). É uma infecção intestinal que geralmente apresenta alta morbidade e baixa mortalidade (Bergeland *et al.*, 1977).

A infecção natural por RVA ocorre em galinhas (*Gallus gallus domesticus*), perus (*Meleagris gallopavo*), faisões (*Phasianus phasianus*), patos (*Anas sp.*), Galinha da Angola (*Numida numida*), pombos (*Columba sp*) e em periquitos (*Melospittacus undulatus*). Com o aumento da idade há o aumento da resistência, não ocorrendo resistência derivada de maturidade dos sistemas, especialmente do sistema imune. Nas aves

domésticas com o objetivo de produção, a ocorrência de rotavírose aviária tem sido descrita principalmente em lotes com menos de seis semanas de idade e, embora os pré-adultos entre 8 e 16 semanas sejam mais sensíveis, a infecção natural ocorre nos primeiros dias de vida (Martins & Resende, 2009).

Através da inoculação experimental em aves SPF, observaram que aves com 1, 14 e 28 dias de idade, são igualmente susceptíveis à infecção por RVA, sendo o vírus detectado por ME direta das fezes por um a sete dias após infecção. O pico de excreção vírica ocorre três a quatro dias pós infecção (McNulty *et al.*, 1979 e 1983).

A rotavírose ocorre mais frequentemente em aves com menos de seis semanas de idade, sendo que a maior incidência da enfermidade em frangos de corte e perus se dá do sexto ao 14º dias de idade (McNulty *et al.* 1979). Porém há relatos de diarreia associada a RVA em galinhas poedeiras com idade entre 32 e 96 semanas (Jones *et al.*, 1979). Esse achado possivelmente reflete a introdução do vírus em planteis sem anticorpos ou o aparecimento de amostras de RVA com maior virulência.

2.3.4 A doença

Os sinais clínicos associados à infecção por RVA em nível de campo, em frangos e em perus de corte, podem variar desde infecções subclínicas até surtos de diarreia grave. Nestas circunstâncias, frequentemente observa-se desidratação, perda de peso, refugagem e aumento de mortalidade do plantel (McNulty *et al.*, 1980).

Segundo McNulty *et al.* (1983), a variação na virulência das amostras dos vírus, que podem ser de maior ou menor patogenicidade para as aves, é um dos principais fatores responsáveis pelas diferentes intensidades da sintomatologia clínica na rotavírose aviária. Outro fator, é que nas condições de campo, as infecções simultâneas com diferentes sorogrupos de RVA são muito frequentes. Uma vez que diferentes estirpes de RVA podem infectar diferentes áreas do intestino delgado, é provável que os efeitos da dupla infecção sejam mais graves do que a infecção com um único vírus. Outros fatores determinantes de patogenicidade citados incluem baixo título de IgA anti-RVA no trato intestinal

(Leece *et al.*, 1976), alta dose infectante (Offit *et al.*, 1984), idade jovem (Moon e Skartvedt, 1975), associação com outros microorganismos entéricos como adenovírus, reovírus, *E coli*, etc. (McNulty *et al.*, 1983), falhas no manejo e estresse (Bohl, 1979).

As aves com idade superior a quatro semanas desenvolvem imunidade humoral mais rapidamente que aves mais jovens. É muito provável que este fato ocorra porque as aves jovens não estão com seu sistema imunológico maduro. Assim, aves com uma a quatro semanas de idade, não desenvolvem resposta imune protetora aos antígenos de RVA, facilitando a infecção em nível de campo (Yason *et al.*, 1987). Se o desenvolvimento de IgA específica segue o modelo padrão do desenvolvimento de anticorpos séricos, repetidos ciclos de infecção podem ocorrer antes que as aves desenvolvam resposta imunológica suficiente para protegê-las contra infecção por RVA (Yason *et al.*, 1987). Outra característica dos RVA que dificulta o estabelecimento de imunidade protetora à infecção natural e o desenvolvimento de vacinas é a diversidade antigênica (McNulty & Reynolds, 2008).

2.3.5 Transmissão

A transmissão de RVA ocorre via fecal-oral e é favorecida pela grande quantidade de partículas víricas (10^{10} a 10^{12} partículas/grama de fezes) presentes nas fezes de aves infectadas e com diarreia (Flewett & Woode, 1978). O período de incubação é curto, de um a sete dias (McNulty *et al.*, 1983), e a replicação vírica dá-se no citoplasma da célula infectada. Todas as organelas citoplasmáticas, inclusive o núcleo, são destruídas durante a multiplicação viral (Alfieri, 1989).

Os RVA são resistentes no ambiente de criação e a infecção direta ou indireta com fezes ocorre rapidamente em aves sensíveis alojadas em ambiente contaminado. A transmissão vertical não foi demonstrada. A infecção simultânea ou sequencial com os diversos eletroferogrupos ocorre normalmente em lotes de frangos de corte e perus. Nenhum vetor biológico foi demonstrado para RVA (Martins & Resende, 2009).

Através de uma análise longitudinal em plantéis de aves jovens, foi demonstrado que o RVA não é normalmente excretado nas fezes antes de 14 dias de idade (McNulty *et al.*, 1983). Possivelmente, a sincronização da excreção do vírus é modulada por uma imunidade passiva de origem materna, como a sugerida para adenovírus (McFerran, 1981).

2.3.6 Lesões

As lesões atribuídas a infecção por RVA em espécies aviárias segue o modelo de espécies mamíferas (Theil *et al.*, 1978). A infecção e a replicação do vírus ocorre nas células epiteliais maduras das vilosidades intestinais. Como consequência, verifica-se degeneração, necrose e descamação dessas células, com ou sem subsequente atrofia de vilosidades. A substituição de células afetadas nas vilosidades ocorre pela migração das células da cripta intestinal (Yason *et al.*, 1986).

2.3.7 Diagnóstico

As manifestações clínicas de rotavirose aviárias, ou mesmo de mamíferos, não são suficientes para permitir o seu diagnóstico clínico (Benfield *et al.*, 1984).

Várias técnicas foram desenvolvidas, para a detecção da partícula viral, antígenos e ácido nucléico víricos nas fezes, bem como para a demonstração de anticorpos no soro, leite, ou fezes de animais infectados. A opção por uma ou outra técnica depende diretamente das finalidades e objetivos dos usuários (Brandt *et al.*, 1981).

A PAGE é a técnica mais utilizada para a detecção de ácido nucléico viral pois permite, após a coloração dos géis com nitrato de prata, a direta visualização dos segmentos de RNA dos RV. PAGE apresenta índices de sensibilidade comparáveis com ME e ELISA (Theil *et al.*, 1986). A detecção de RV por PAGE requer a presença de quantidades maiores que 10ng de RNA vírico (Dolan *et al.*, 1985). Uma vantagem adicional observada na utilização de PAGE no diagnóstico da rotavirose é a sua capacidade de identificação de RVA atípicos que não possuem antígenos comuns ao grupo A. Além disso, a PAGE possibilita a

eletroferotipagem das estirpes prevalentes em uma região durante um determinado período de tempo (Reynolds & Saif, 1986). Como desvantagem dessa técnica, salienta-se a demora na conclusão dos resultados, sua laboriosa execução e a impossibilidade do processamento de um grande número de amostras (Herring *et al.*, 1982).

Outra técnica descrita para a detecção do ácido nucléico de RVA em extratos fecais é a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR), que apresenta como principal vantagem, sua altíssima sensibilidade (Alfieri, 1992).

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aves

Frangos de corte e poedeiras comerciais de granjas das principais regiões de avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Tabela 1).

3.2 Amostragem

Amostras de fezes de frangos de corte e poedeiras comerciais foram colhidas de granjas das principais regiões de avicultura industrial do estado de Minas Gerais (Tab. 1) de forma aleatória, ou seja, foram colhidas amostras em todos os galpões visitados, inclusive de aves aparentemente saudáveis. A amostragem representativa foi de 20 amostras por galpão (*amostragem de cluster*). No total foram analisadas 54 amostras, sendo cada constituída de um *pool* de excretas de 20 aves por galpão. Os frangos de corte foram avaliados com idades entre um (1) e 45 dias e as poedeiras entre 10 a 13 semanas de idade. Os plantéis das aves analisadas tinham aspecto normal. Excepcionalmente, lotes com desuniformidade (Fig. 5) ou quadros indicativos de transtorno intestinal, como diarreia, retardo no crescimento, dificuldade de locomoção, foram estudados.

Como critério de avaliação clínica discriminada, utilizou-se, para cada idade, a descrição dos sinais clínicos por plantel, incluindo, desuniformidade do lote, retardo do crescimento (ganho de peso abaixo do esperado para a linhagem e idade), claudicação ou outra dificuldade de locomoção, redução no consumo

de ração, alimento não digerido nas fezes, penas sujas na região da cloaca, cloaca emplastada, cama muito úmida, ou qualquer sinal sugestivo de diarreia. Na ausência de sinais clínicos, as aves foram classificadas como normais ou aparentemente saudáveis.

As excretas foram colhidas aleatoriamente e de forma homogênea distribuída em 20 diferentes pontos ao longo de todo o galpão, sendo apanhadas imediatamente após a evacuação. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo "Eppendorf" de 1,5ml e guardadas em isopor com gelo até chegada ao laboratório, onde foram então armazenadas a -20°C até seu processamento (Fig. 4).

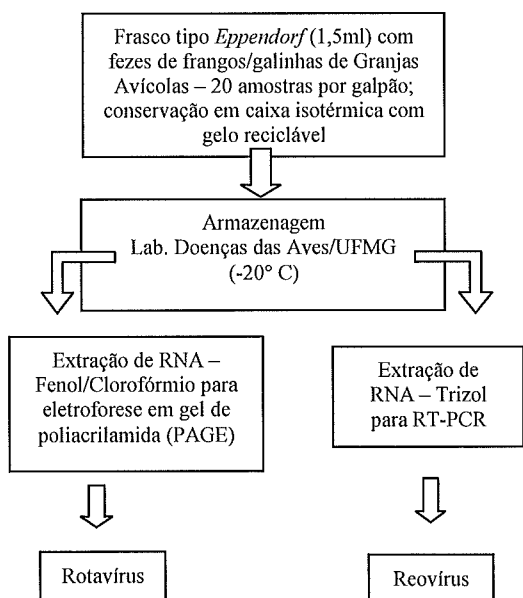


Figura 4. Diagrama dos procedimentos de amostragem e processamento das amostras fecais.



Figura 5: Frangos de corte de plantel com desuniformidade.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

As amostras armazenadas a -20°C foram descongeladas à temperatura ambiente. Após o completo descongelamento, essas foram homogêneas com haste plástica descartável e foram então diluídas a uma concentração de 15% (p/v) em tampão de estabilização de Rotavírus (TERV) (pH 7,4 -Tris-HCl 50mM; NaCl 10mM; CaCl₂ 13mM e β-mercaptoetanol 1,5mM). Esta mistura foi colocada em tubos de rosca e agitadas em agitador tipo vortex (GENIE BENDER, mod. K - 550G - EUA). Seguindo-se às etapas de homogeneização, as amostras foram clarificadas por centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos (centrífuga FANEM, modelo 240-N, Brasil) à temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5ml para a realização da extração do material genético.

Com a finalidade de obtenção do ácido nucléico viral, as amostras foram submetidas a várias etapas de processamento cujos objetivos foram, a eliminação de proteínas e a separação do RNA dupla fita (df) por precipitação.

3.4 Extração do RNA para PAGE

De cada amostra processada, recolheu-se uma alíquota de 500µl, que foi depositada em tubos Eppendorf de 1,5ml. Em cada tubo foram adicionados 100µl de tampão de lise (SDS 10% p/v, EDTA 110mM pH 7,8), em seguida o tubo foi homogeneizado em vortex e incubado a 55°C por 15 minutos. Logo após a incubação, com objetivo de extração de proteínas da solução, foram adicionados 500µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:48:2) e agitados rapidamente por três ciclos consecutivos com intervalos de 30 segundos, após isso, os tubos foram colocados a 37°C em banho-maria por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13.000rpm por 10min. A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para um outro tubo, repetindo-se essa etapa para garantir a retirada completa da fração protéica de forma efetiva. Fez-se uma última extração apenas com clorofórmio, para a retirada de restos de fenol (Sambrook et al, 1989). A fase superior foi recolhida e 100µl de acetato de sódio 3M foram adicionados, juntamente com 2,5 volumes de

etanol a 96%, sendo homogeneizado delicadamente, com inversão manual por 10 vezes e mantido em repouso por 12 horas a -20°C (Theil et al, 1981). O RNA foi precipitado por centrifugação (13.000 X g por 10 min. a 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado 3 vezes com etanol a 80% e centrifugado (6.500 X g por 5min. a 4°C). Após a secagem do sedimento com os microtubos abertos em cabine de fluxo laminar por uma hora, esse foi diluído em 50µl de tampão de amostra (TRIS-HCL 62,5 mM pH 6,8, uréia 5M, β -Mercaptoetanol 5%, SDS 3% e 0,01% de azul de bromofenol). Antes da corrida eletroforética a amostra foi incubada por quinze minutos a 56°C (PEREIRA et al., 1983).

3.5 Técnica de PAGE

A separação eletroforética do RNA foi feita em gel de poliacrilamida utilizando-se um sistema descontínuo de pH, como para proteínas (LAEMMLI, 1970). Utilizou-se um gel de resolução com 7% de acrilamida e o gel concentrador da amostra com 3,75% de acrilamida. A corrida da eletroforese foi feita com tampão Tris-glicina (Tris 25mM, glicina 0,2M, pH8,6), sendo utilizada uma voltagem constante de 100 V, com uma duração aproximada de quatro horas.

3.6 Coloração do ácido nucléico pela prata

Após a eletroforese, o gel foi corado pela prata para a visualização das bandas de RNA (HERRING *et al.*, 1982). O gel foi rapidamente lavado em água bidestilada e colocado em solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 0,5%) por uma hora. Em seguida foram realizadas duas lavagens de cinco minutos em etanol a 10%, e após as lavagens, o gel foi deixado por cerca de 30 minutos, em ausência da luz, em solução de prata 0,11M. A solução corante foi então removida e o gel, ainda no escuro, foi lavado por três vezes consecutivas em água destilada. Em seguida, o gel foi colocado em solução reveladora (NaOH 1M - 250ml, formaldeído - 1,9ml) durante o tempo suficiente para o aparecimento das bandas. Essa etapa foi monitorada através da amostra padrão de RV aplicada no gel. Quando a intensidade de coloração desejada foi conseguida, a revelação foi interrompida, transferindo-se o gel para a

mesma solução utilizada na fixação. O gel foi armazenado em solução conservadora (etanol a 20% v/v).

3.7 Preparo das amostras fecais para RT-PCR

As excretas armazenadas a -20°C, foram descongeladas à temperatura ambiente. Após o completo descongelamento, essas foram homogeneizadas com haste plástica descartável fazendo-se um pool das 20 amostras colhidas por galpão, totalizando em média 500µl de amostra; essas foram então diluídas em 1000µl de TNE, (10mM Tris-HCl [pH 8,0], 100mM NaCl, 1mM ácido etilenediaminetetracético-EDTA). Esta mistura foi colocada em tubos de rosca e agitadas em agitador tipo vortex (GENIE BENDER, mod.K - 550G - EUA). Seguindo-se as etapas de homogeneização, as amostras foram clarificadas por centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos (centrífuga FANEM, modelo 240-N, SP) à temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para tubos *Eppendorf* de 1,5ml para a realização da extração do material genético.

Com a finalidade de obtenção do ácido nucléico viral, as amostras foram submetidas a várias etapas de processamento cujos objetivos foram a eliminação de proteínas e a separação do RNA dupla fita (df).

3.8 Extração do RNA para a reação de RT-PCR

Para a extração do RNA, foi escolhido o método utilizado por Gomes et al. (2005), conforme descrito a seguir. Cerca de 250µl de cada amostra foram transferidos para um microtubo novo, aos quais foram adicionados 750µl de Trizol LS (Invitrogen EUA), seguido de completa homogeneização por agitação vigorosa, ficando em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente (TA), sendo após isso centrifugadas (13000 X g por 10 minutos a 4°C) para a separação de fases. Em seguida o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e adicionado a este 250µl de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, incubados por 10 minutos em TA, e posteriormente centrifugados (13000 X g por 15 minutos a 4°C) para separação de fases. Neste procedimento o RNA fica solubilizado na fase aquosa superficial (cor branca) e o DNA e proteínas na fase orgânica (cor vermelha). O

sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novo microtubo e a ele adicionado volume igual de isopropanol que foi homogeneizado vagarosamente (inversão manual por 10 vezes), ficando em repouso a -20°C por 12 horas. O RNA foi precipitado por centrifugação (13000 X g por 20 min a 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento (*pellet*) foi lavado por três vezes com etanol a 96% e centrifugado (13000 X g por 5 min a 4°C). Após a secagem a 56°C por 15 minutos, o sedimento foi dissolvido em TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0) e colocado a 56°C/10 minutos para ocorrer eluição. Após a eluição, dosou-se a proteína a qual foi usado imediatamente na transcrição reversa (RT).

3.9 Determinação espectrofotométrica da concentração de RNA

Após a eluição as amostras de RNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro Nano Bio ND-1000 no laboratório de genética animal da Escola de Medicina Veterinária da UFMG. Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácidos nucleicos utilizando 1µl da amostra de interesse. Ele estima a quantidade de RNA na amostra em ηg/µl e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO_{260nm}/DO_{280nm} . Após a determinação da concentração, procedeu-se a transcrição reversa (RT).

3.10 Condições da reação em cadeia pela polimerase (*nested-pcr*) para amplificação de parte do genoma do Reovírus aviário

O RNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma do reovírus aviário pela *nested* – PCR. Foram

utilizados oligonucleotídeos iniciadores externos (S1C e S1D) e internos (S1E e S1F) (Tabela 1) sugeridos por LIU *et al.* (1997).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram confeccionados pela INVITROGEN Life Technologies (São Paulo, Brasil), e armazenados a -20°C em sua forma reconstituída em TE.

3.11 Síntese de cDNA (transcrição reversa - rt)

Para a síntese de cDNA foi utilizada a enzima M-MLV (PROMEGA – CORPORATION, EUA) e os ciclos de temperatura utilizados nessa técnica foram de acordo com as instruções do manual do fabricante. Uma alíquota de cada amostra de RNA total (cerca de 300ηg) foi desnaturada a 94°C/2min. e colocada imediatamente em recipiente com gelo. Ao microtubo contendo o RNA foram adicionados 2µl do primer S1C a 10µmol e água ultra pura q.s.p. 15µl. Essa reação foi levada ao termociclador a 70°C por 5min e em seguida foi resfriada no gelo. Adicionaram-se a cada reação, 5µl de tampão 5X (250mM Tris – HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂ e 50mM DTT), 2µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1µl da enzima e 2µl água ultra pura. A solução foi cuidadosamente homogeneizada e incubada a 42°C por 60 minutos e armazenada a -20°C até o momento de sua utilização na reação de PCR.

Tabela 1: Iniciadores, sequências de bases, gene e localização genômica.

Iniciador	Sequencia (5'→ 3')*	Gene	Localização
S1C	ATTGAATTCTCTGTTATCTCAACCTTG	S1	446 - 472
S1D	AAGGAATTCGTTGAGAACAGAAGTAGG	S1	1183 - 1157
S1E	TCTGAATTCATCGCAGCGAAGAGAGGTCG	S1	630 - 658
S1F	AGTGAATTCAGTATCGCCGCGTGCGCAG	S1	971 - 943

*Oligonucleotídeos descritos por LIU *et al.* (1997)

3.12 PCR – específica (1ª reação – iniciadores externos)

Uma alíquota de cada amostra de cDNA foi utilizada como molde na primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl contendo: 2µl de cDNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Phoneutria), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Phoneutria), 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (Taq DNA Polymerase – Phoneutria) e 38,3µl de água ultra pura.

A reação de PCR específica foi realizada em termociclador (Axygen - Maxygene). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 59°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 8 minutos. Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o cDNA de RNA extraído da vacina comercial Poulvac® Maternavac IBD-Reo da empresa Fort Dodge. Foi utilizado também um controle negativo contendo todos os reagentes sem a inclusão de amostra de cDNA.

3.13 Nested - PCR (2ª reação – iniciadores internos)

A reação de *nested*-PCR foi realizada em um volume final de 50µl, sendo utilizado como molde 1µl do produto amplificado da primeira reação e 1µl de cada iniciador interno a 10µmol. Os demais reagentes e as concentrações utilizadas foram as mesmas descritas para a PCR-específica, assim como o programa de amplificação.

3.14 Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR

Após o ciclo de amplificação, a cada 8µL do produto amplificado foram adicionados 2µL de tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol) na concentração de 5X, e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TBE 0,5 X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico). A corrida foi

realizada em temperatura ambiente, com tempo médio de 40 minutos, em voltagem constante (100 V). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10mg/ml), por 20 minutos, em ambiente desprovido de luz, para a visualização dos fragmentos.

Para visualização dos fragmentos amplificados, utilizou-se transiluminador ultravioleta (254nm – Pharmacia LKB MacroVue TM , Amersham, EUA).

3.15. Inoculação de amostra positiva em ovos SPF

Excretas de uma das amostras que apresentaram perfil eletroforético compatível com Reovírus, foram suspensas em partes iguais de PBS autoclavado e centrifugadas a 2.000 X g por 10min. O sobrenadante foi recolhido e tratado com antibióticos e antimicótico (penicilina G potássica 1.000 unidades, estreptomicina 500µg e anfotericina B 1µg/mL) por 30min em temperatura ambiente (25 °C). Após esse prévio tratamento, 10 ovos de galinhas livres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*) com 10 dias de incubação foram utilizados para as inoculações. A membrana cório-alantóide foi empregada como via de inoculação, com o deslocamento da câmara de ar para a lateral do ovo. Na falsa-câmara de ar e sobre a superfície da membrana, foram inoculados 0,2 ml de lavado fecal, clarificado e tratado com antibióticos. Os ovos foram incubados sendo a ovoscopia realizada diariamente. Caso houvesse mortalidade, os ovos eram separados para que se pudesse realizar a análise desse embrião com consequente coleta de material (fígado, baço, bolsa cloacal e membrana cório alantóide). Ao final de sete dias, as membranas e embriões dos ovos que não apresentaram mortalidade também foram examinados e coletados para ser realizada a extração de RNA e o diagnóstico através da técnica de *Nested-PCR*. Esses produtos amplificados foram então submetidos a um processo de seqüenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al.* (1997), em um seqüenciador automático capilar (ABI 377, Perkin Elmer, Estados Unidos), utilizando o *kit Big Dye Terminator Mix* (Applied Biosystems, Estados Unidos), de acordo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 1µl do produto de *Nested PCR* purificado foi utilizado

em cada reação de sequenciamento, adicionando, 1 µl de cada iniciador na concentração de 10 pmol, 2 µl de *Big Dye*, 1,5 µl de tampão *Save Money* (Applied Biosystems, Estados Unidos) e 1 água milliQ quantidade suficiente para 10 µl. A reação de sequenciamento foi feita em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Estados Unidos), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento do iniciador a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, sendo esse ciclo repetido por 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida, sendo então feita a desnaturação rápida a 95 °C por 2 minutos e colocado no gelo imediatamente. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita, tantas vezes quanto necessárias, até ser obtido um resultado com alta taxa de certeza.

3.16 Montagem e edição das seqüências nucleotídicas

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa Bioedit (Hall, 1999).

3.17 Busca das seqüências similares em bancos de dados

Para início das análises, todas as seqüências finais geradas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*), BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), desenvolvidos pelo NCBI, foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (Altschul *et al.*, 1997).

3.18 Alinhamento das seqüências

Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos e seqüências inferidas de aminoácidos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 3.1/ www.megasoftware.net) versão 3.1 para Windows. Todos os alinhamentos foram

revisados e editados manualmente quando necessário.

3.19 Análises filogenéticas

Os alinhamentos de nucleotídeos dos genes que codificam para a proteína $\sigma 1$ do reovírus aviário dos isolados analisados neste trabalho, foram utilizados para a construção de árvores filogenéticas com o auxílio do programa MEGA (www.megasoftware.net). Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança da topologia (*bootstrap*) com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 54 amostras analisadas, cinco obtiveram perfil eletroforético para Rotavírus em regiões da avicultura industrial de Minas Gerais, sendo elas: Pará de Minas, São Sebastião do Oeste e Pitangui (Tab.2).

Já para Reovírus, das 54 amostras analisadas três obtiveram perfil eletroforético em nested-PCR para Reovírus, sendo as regiões de Divinópolis, Pará de Minas e de São Sebastião do Oeste (Tab.2)

Dentre as várias espécies de vírus detectados em fezes de pintos de linhagem para corte, com diarreia, os Rotavírus tem se caracterizado em várias partes do mundo, como um dos mais importantes e freqüentes enteropatógenos aviários (Alfieri *et al.*, 1989).

Um estudo da presença do Rotavírus já foi relatado no Brasil (Alfieri *et al.*, 1992, Tamehiro *et al.*, 2003 e Villareal *et al.*, 2006), onde é reconhecido como um dos vírus mais frequentemente encontrados em problemas entéricos em frangos de corte, fato esse que pode ser explicado devido ao sistema de criação intensificado ao qual esses animais são submetidos, onde uma vez que ocorra o desequilíbrio no aspecto sanitário, de um plantel avícola faz com que o surgimento de infecções por microrganismos representem um fator limitante à exploração da avicultura de forma intensiva.

Através da técnica de PAGE seguida de coloração pela prata foi possível a detecção do ácido nucléico de RV em cinco (9,25%), das 54 amostras de fezes analisadas, sendo que em quatro casos, as aves apresentavam algum tipo de distúrbio entérico, como diarréia ou excretas mais aquosas, apresentando também, cama com excesso de umidade ou emplastadas, aves com o empenamento sujo e desuniformidade do lote, e em uma amostra, as aves apresentavam-se aparentemente saudáveis.

No presente trabalho foi possível verificar a ocorrência de Rotavírose aviária no estado de Minas Gerais, porém deve-se salientar que os diagnósticos positivos para a presença de Rotavírus foi exclusivo em aves para corte. Embora houvesse necessidade de uma amostragem maior de frangas de postura, esses resultados ratificam os encontrados por Alfieri (1992) e em várias outras partes do mundo, onde os distúrbios entéricos determinados pela rotavírose aviária ocorrem principalmente em aves criadas para corte (McNulty *et al*, 1983, Alfieri *et al*, 1989).

As duas amostras positivas registradas na região de Pará de Minas pode ser explicado pela intensa produção avícola na região, sendo que apesar de procedimentos de biossegurança existirem, algumas granjas, possuem falhas nos mesmos, que dão a possibilidade da entrada de agentes patogênicos nas granjas. Nessas granjas que obtiveram positividade na mesma região, foi observado o trânsito de pessoas como veterinário, técnico, granjeiro, entre as granjas

sem os devidos cuidados sanitários, fato esse que provavelmente pode ter sido o responsável pelo trânsito do patógeno entre os galpões. Nas demais regiões onde obteve-se os resultados positivos, apenas um caso em cada uma delas, obteve o perfil eletroforético para Rotavírus, fato esse que possivelmente esteja atrelado às boas condições sanitárias e de manejo que foram observados.

Em uma das granjas onde obteve-se o perfil eletroforético positivo para Rotavírus, e as aves apresentavam-se aparentemente saudáveis pode ser explicado provavelmente pelo fato de que essas aves estavam no início da infecção, já eliminando vírus através das excretas, mas ainda no período de incubação de dois a cinco dias (McNulty, 2003). Outra possibilidade é que as aves tenham se recuperado do período de doença clínica, mas ainda estivessem eliminando os vírus, o qual foi então detectado.

Em trabalho realizado por Tamehiro *et al*, (2003), no estado do Paraná, os autores encontraram a presença de Rotavírus em 8,5% das amostras analisadas, valor esse muito próximo ao encontrado no presente trabalho, onde 9,25% das amostras mostraram perfil eletroforético compatível para Rotavírus. Em um estudo de prevalência realizado por Villareal *et al*, (2006), mostraram a presença de Rotavírus em 48% das amostras analisadas. Essa diferença de resultado, quando comparado com o do presente estudo, pode ser explicado pelo fato de que os autores coletaram parte de suas amostras

Tabela 2. Amostragem de frangos de corte e poedeiras comerciais das principais regiões de avicultura industrial do estado de Minas Gerais (n = 20 em todas as coletas)

Região avícola	Idade (dias)	Número de galpões visitados	Resultado	Observações
Barbacena	14 a 35	7	-	Normal
Divinópolis	13 a 33	5	-	Normal
Divinópolis	8	1	+ Reo	Diarréia
Itanhandú	70	6	-	Normais
Lavras	13	2	-	Normais
Nepomuceno	90	6	-	Normais
Pará de Minas	31	1	+ Reo	Desuniformidade e Claudicação
Pará de Minas	13 a 43	4	-	Normais
Pará-de-Minas	14	1	+ Rota	Diarréia
Pará-de-Minas	12	1	+ Rota	Diarréia
Pitangui	31	1	+ Rota	Diarréia
Pitangui	13 a 41	7	-	Normais
São Sebastião do Oeste	12	1	+ Reo	Normais
São Sebastião do Oeste	40	1	+ Rota	Diarréia
São Sebastião do Oeste	1 a 37	7	-	Normais
Sete Lagoas	15	1	-	Diarréia
Sete Lagoas	37	2	-	Normais

em granjas com problemas de diarreia, desuniformidade, baixo desempenho, etc, fato esse que não ocorreu em nosso estudo, uma vez que foram coletadas amostras de forma aleatória em granjas das regiões da avicultura industrial de Minas Gerais.

Sabe-se que aves com menos de duas semanas, não excretam normalmente Rotavírus, provavelmente pela modulação da imunidade passiva (McNulty *et al* 1983), ocorrendo mais frequentemente, em nível de campo, na segunda e terceira semanas de idade, dados esses que estão em concordância com o que foi encontrado no presente trabalho, onde foram encontradas amostras de Rotavírus em frangos de corte com idades variando de 16 a 31 dias de idade.

É muito provável que a maior ocorrência de Rotavírus na segunda e terceira semanas de idade deva-se ao efeito da queda de imunidade passiva, aliada ao aumento do desafio em nível de campo. Desta forma é muito provável que aves mais velhas (frangos de corte em idade de abate e galinhas poedeiras), não exerçam papel muito importante na epidemiologia da rotavirose aviária, atuando como portadores sadios que manteriam o vírus no meio ambiente (Alfieri 1992)

Com relação às aves com idade igual ou superior a cinco semanas, não foi possível detectar rotavírus em nenhuma das amostras de fezes com as metodologias empregadas nesse estudo.

O encontro de Rotavírus em aves apresentando diarreia e desuniformidade, observados nas amostras estudadas permite sugerir que o mesmo tenha tido um papel primário na etiologia destas doenças, uma vez que os Rotavírus se replicam no epitélio intestinal levando à diarreia e má absorção (Barnes, 1977). Além disso, os Rotavírus afetam o valor do lote por redução do ganho de peso, diminuição da uniformidade do lote, incremento da susceptibilidade a doenças e, portanto, incremento devido ao uso de medicamentos, permanecendo os efeitos da doença por longo tempo após o desaparecimento dos sintomas clínicos (Barnes, 1977)

Consequentemente, neste estudo, considerando as aves sintomáticas, nas quais os Rotavírus forma encontrados, pode ser sugerido que tanto a

diarreia quanto o retardo no crescimento podem ser atribuídos, parcialmente a este vírus (Villareal., 2006)

Na avicultura industrial não há o contato direto entre matrizes e aves jovens. Assim a ausência de aves adultas onde o Rotavírus se manteria de forma subclínica, dificultaria a perpetuação do vírus nas granjas (Alfieri, 1992)

As medidas de biossegurança, como vazio sanitário, limpeza e desinfecção das instalações de modo adequado e criação de lotes com uma única idade, facilitam ainda mais o controle de viroses, condições essas que foram encontradas na grande maioria das granjas visitadas.

Os dados deste trabalho ratificam a importância da rotavirose nos distúrbios entéricos que comprometem principalmente as aves com duas a três semanas de idade, bem como demonstraram sua ocorrência em 9,25% das granjas de frangos de corte com até 31 dias de idade.

Partindo-se do princípio que a transmissão vertical não tem tanta importância para a manutenção da rotavirose no plantel avícola, faz-se necessário medidas de biossegurança cada vez mais eficientes, principalmente em aves jovens, uma vez que são vírus bastante resistentes às condições ambientais, inclusive à desinfecção.

A natureza múltipla das patologias e a grande variedade de termos utilizados para descrever doenças associadas ao Reovírus, tem demonstrado confusão sobre a importância das patologias induzidas pelo vírus (Robertson & Wilcox, 1986). Contudo, infecções por Reovírus são rotineiramente consideradas uma das causas de perdas econômicas na avicultura. Os prejuízos são devido ao grande número de condenação em abatedouro, mortalidade, refugagem, queda a produção de ovos e predisposição a outros patógenos (Rosenberger *et al.*, 1989).

Poucos são os levantamentos epidemiológicos com relação aos vírus entéricos, efetuados em pintos de linhagem para corte acometidos por sinais da síndrome da má absorção, desigualdade de lote, atraso no crescimento e problemas entéricos no Brasil.

Através da técnica de *Nested-PCR*, foi possível o diagnóstico de três (5,55%), das 54 amostras de fezes analisadas, sendo que em uma delas, as aves apresentavam problemas de claudicação e nas outras duas, apresentavam problemas de desuniformidade e diarreia. A detecção de Reovírus em aves de produção com problemas entéricos foi relatada no Brasil por Tamehiro *et al.*, (2003) e por Villareal, (2006), também nos Estados Unidos, Austrália, Suécia, Inglaterra e Alemanha (Apple *et al.*, 1991, Lenz *et al.*, 1998).

Reovírus também estão associados com problemas de artrite viral, uma doença importante economicamente e que causa problemas principalmente em frangos de corte, sendo as principais lesões e sintomas a ruptura do tendão do gastrocnêmio, pericardite, miocardite, hidropericárdio, retardo no crescimento e mortalidade (Rosenberger 2003).

Os Reovírus estão associados à síndrome da má absorção em aves com menos de 15 dias de idade (Ruff & Rosenberger, 1985). Dado este, condizente com o encontrado no presente estudo, onde as aves com problemas entéricos que apresentaram diagnóstico positivo, tinham 8 dias de idade. Já no resultado positivo em que as aves apresentavam problemas locomotores, como claudicação e aumento de volume na região tíbia-társica, as mesmas tinham 31 dias de idade.

Em uma das granjas, onde foi encontrado amplicon específico de Reovírus, observou também, a partir da colheita de baço e timo de uma ave abatida, a presença do vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), mostrando a associação dos dois agentes. Essas aves encontravam-se deprimidas, anoréxicas com edema na região articular, claudicação e diarreia. Nesses casos, o processo é muito mais grave tanto de imunossupressão como no quadro entérico (Rosemberger, 2003). Tanto em nível de campo como em inoculações experimentais, verifica-se uma exacerbação da sintomatologia clínica apresentada pelas aves, quando a infecção por Reovírus ocorre concomitantemente com outros patógenos (Andral *et al.*, 1985).

Os dados encontrados, mostram uma correlação positiva entre a consistência das excretas com o diagnóstico obtido, fato esse que está em concordância com o encontrado por Tamehiro *et al.*, (2003). Um estudo de prevalência realizado

por Villareal *et al.* (2006), indicou que cerca de 2,52% das amostras analisadas foram positivas para a presença de Reovírus, sendo que 1% delas era proveniente de excreta de aves que apresentavam apenas retardo no crescimento, 1,52% era proveniente de aves que apresentavam distúrbios entéricos. Mesmo tendo ocorrido em baixa frequência, um constante monitoramento dos planteis avícolas com relação à presença de reovírus é de fundamental importância. Isso se deve principalmente às características peculiares encontradas na Reovirose entérica diagnosticada no presente trabalho. A constante associação com diarreias graves, desuniformidade do lote, aumento na refugagem, empenamento anormal, síndrome da má absorção, desidratação e morte, caracterizam essa patologia como importante fator de risco para sanidade avícola, podendo inclusive determinar graves prejuízos econômicos.

Desta forma, a possibilidade de transmissão vertical, aliada a relativa existência do vírus no ambiente, reforça a necessidade da adoção de medidas higiênicas sanitárias rigorosas e de rastreamento epidemiológico constante desta virose.

As inoculações experimentais realizadas com uma das amostras que apresentaram o perfil eletroforético compatível com Reovírus, apresentaram mortalidade em 70% dos embriões, sendo que as mortes ocorreram, 24, 48 e 72 horas após as inoculações, sendo duas, três e duas mortes respectivamente. Os embriões que permaneceram vivos no período de sete dias pós inoculações, foram examinados para a descrição de lesões. As membranas cório-alantóides dos ovos em que houve mortalidade, apresentaram à inspeção visual em fundo preto, focos brancacentos arredondados e/ou confluentes e aumento de espessura, com edema translúcido ou opaco da membrana e nos focos brancacentos. Já os embriões, apresentaram congestão vascular e/ou hemorragias localizadas ou generalizadas e alterações da coloração hepática e renal (Figuras 6 e 7).

Os resultados obtidos com a análise filogenética demonstraram que as estirpes do estudo apresentaram alta similaridade com isolados de várias partes do mundo, não apresentando relação geográfica entre elas (Figura 09).

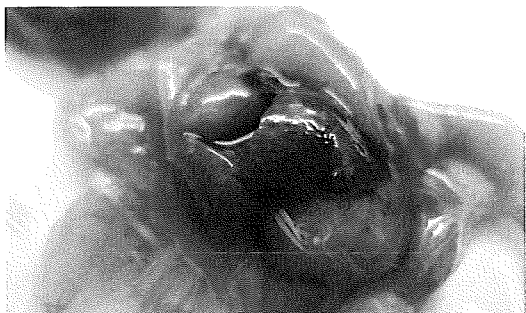


Figura 6: Foto mostrando hepatomegalia com focos de hemorragias e palidez;



Figura 7: Foto mostrando congestão e hemorragia embrionária; visível hepatomegalia através da parede toracoabdominal.

Através de buscas no banco de dados Gene Bank pode-se constatar que essa sequência obtida da amostra de campo é muito semelhante à estirpe vacinal S1133, diferenciando apenas em algumas bases. Esse fato pode ser explicado pelo fato de que o local de onde foram coletadas essas excretas, possuía em sua proximidade, matrizes de frangos de corte que foram vacinadas a meses atrás, fazendo com que o vírus vacinal tenha se tornado mais virulento e por razões de biossegurança não eficazes, esse vírus esteja circulante no campo, causando danos na avicultura de corte local.

A análise filogenética das estirpes de RA obtidas neste estudo em comparação com as sequências publicadas, permitiu determinar que os isolados presentes na avicultura industrial de Minas Gerais têm alta homologia com a estirpe S1133. A alta disseminação e homologia dos isolados pode significar que a origem de todos é comum e possivelmente de origem vacinal, tendo em vista a utilização de vacinas vivas de RA por muitos anos, embora de forma descontínua, em

reprodutores de algumas regiões da avicultura industrial brasileira.

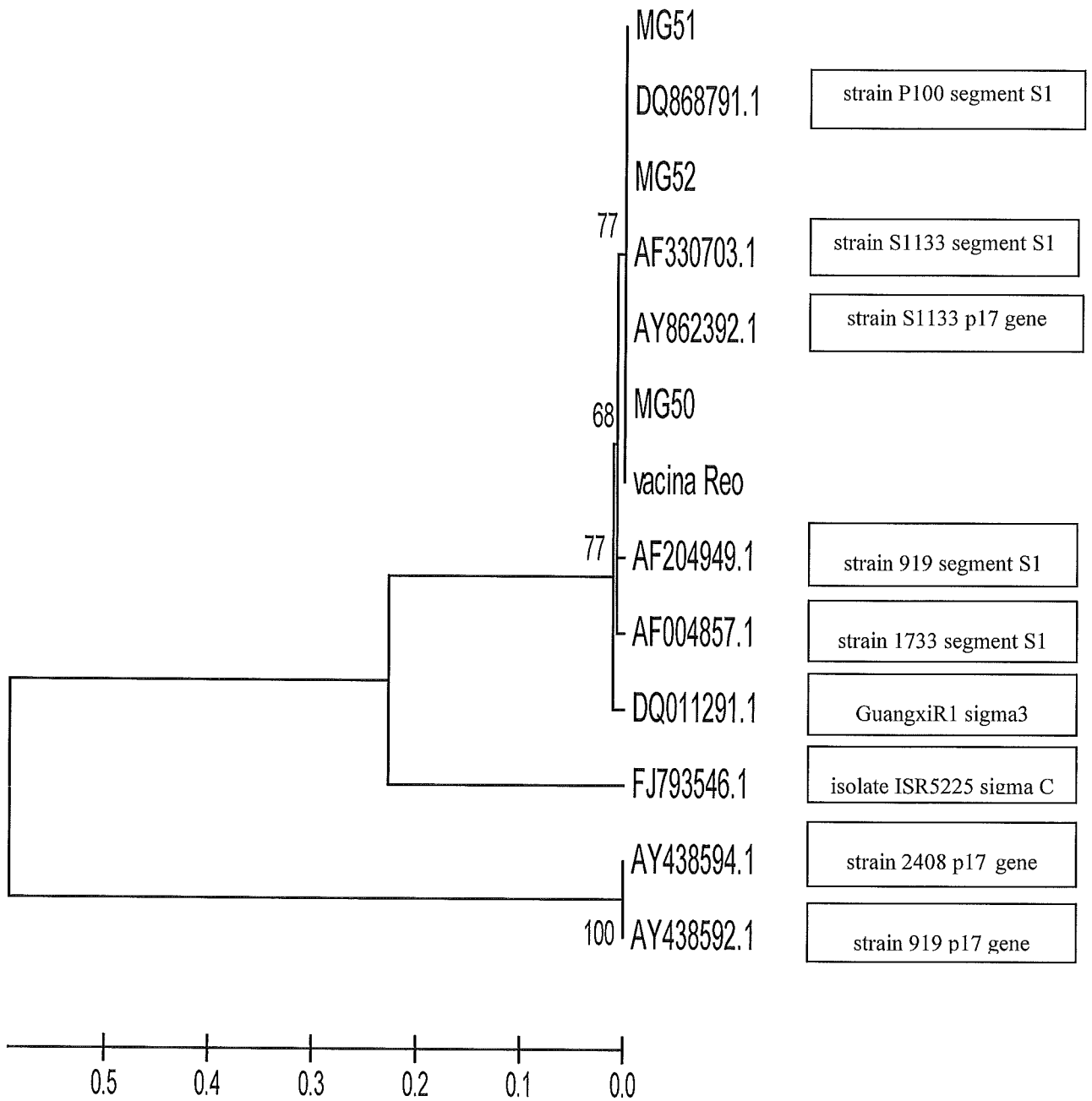


Figura 09. Árvore filogenética de estirpes de *Orthoreovirus* aviário com base nas sequências do gene que codifica a proteína $\sigma 1$. Os isolados MG50, MG51 e MG52 estão agrupados com 100% de homologia com as estirpes S1133 originárias da Europa, Estados Unidos e empregadas nas vacinas vivas atenuadas comerciais no Brasil.

5. CONCLUSÕES

Com esse trabalho pode-se concluir que o Reovírus e o Rotavírus estão presentes na avicultura industrial de Minas Gerais, necessitando assim que medidas de biossegurança mais rígidas sejam tomadas, evitando a presença dos agentes nos planteis levando consequentemente a diminuição das perdas econômicas no setor causadas pelos vírus estudados.

Com a detecção de Reovírus em frangos de corte nas regiões da avicultura industrial de Minas Gerais, vê-se uma maior necessidade de medidas de biossegurança uma vez que nas proximidades há a produção de matrizes, podendo haver a infecção desses animais, o que é um risco para a avicultura já que a transmissão vertical determina a infecção da sua progênie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A.A. *Contribuição ao estudo da rotavírose suína no Brasil: Prevalência, ensaio imunoenzimático e eletroferotipagem*. 1989. 150f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Minas Gerais
- ALFIERI, A.F. *Rotavirus e outros virus de genoma RNA fita dupla segmentado em fezes de aves*. 1992. 180f. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, Minas Gerais.
- ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A.A.; RESENDE, M. Detection and propagation of avian enteric Reovirus in chicken. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 41, n.6, p. 493-501, 1989
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., HAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 48: 984-987, 1997.
- ANDRAL, B., TOQUIN, D. Observation of pseudopicornavirus isolations from diseased ducks. *Avian Pathology*, v.13, p. 377-388, 1984
- ANDRAL, B., TOQUIN, D., L'HARIDON, R. et al. Les diarrhées du dindon: un bilan des recherches virales effectuées (Rotavirus, Reovirus, Adenovirus, Pseudopicornavirus). *Avian Pathology*, v.14, p. 147-162, 1985
- APPLE, R. O.; SKEELES, J.K.; HOUGHTEN, G.E. et al. Investigation of a chronic feed-passage problem in a broiler farm in a Northwest Arkansas. *Avian Diseases*, v.35, n.2, p.422-425. 1991
- BARNES, H.J. Viral enteric infection In: CALNEK, B.W.; BAENES, H.J.; BEARD, C.W. et al. *Diseases of Poultry*. Iowa: Iowa state university press, 1977, p.685-686
- BACK, A. *Manual de Doenças de Aves*. Cascavel: Coluna do Saber, 2006, 222 p.
- BENFIELD, D.A.; STOTZ, I.J.; NELSON, E.A. et al. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assay with electron microscopy, fluorescent antibody and virus isolation for detection of bovine and porcine rotavirus. *American Journal Veterinary Research*, v.45, p. 1998-2002, 1984
- BERGELAND, M.E.; McADARAGH, J.P.; STOTZ, J. *Rotaviral enteritis in turkey poult*. In: Western poultry disease conference, 26 Proc. Local: University of California Davis, p. 129-130, 1977
- BERNARDINO, A. *Curso de sanidade avícola* 14. Disponível em: <<http://www.fortdodge.com.br/14sanidade/pdf/13reovirose.pdf>> Acesso: 16 de dezembro de 2009
- BOLETIM da avicultura de janeiro a junho de 2009, ABEF. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>> Acesso: 15 de dezembro de 2009

- BOHL, E.H. Rotaviral diarrhea in pigs: Brief review. *Journal of American Veterinary Association.*, v.174, p. 613-615, 1979
- BRANDT,C.D.; KIM, H.W.; RODRIGUEZ, W.J.; et al. Comparasion of direct electron microscopy, and Roatvirus enzyme linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *Journal Clinical Microbiology.*, v.13, n.14, p. 976-981, 1981
- BRIDGER, J. C. Novel rotaviruses in animals and man. *Ciba Found Symp.*, v. 128, p. 6-23, 1987
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific- pathogen-free chickens. *Journal Genetic Virology* v. 81, p. 2067 – 2075, 2000.
- CHANOCK, S. J.; WENSKE, E. A.; FIELSD, B. N. Human rotaviruses and genomic. *Journal Infections Diseases*, v. 148, p. 49-50, 1983
- CUKOR, G., BLACKLOW, N. R. Human viral gastroenteritis. *Microbiology Reviews* v.48, p. 157-179, 1984
- DEA, S.; E TIJSSSEN, P. Viral agents associated with outbreaks of diarrhea in tukey flocks in Quebec. *Canada Journal Veterinary Research*, v.52, p.53-57, 1988
- DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G.; MEULEMANS, G. Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: Comparasion of Tissue culture and direct electron microscopy. *Avian Pathology* v.17, p. 477-486, 1988.
- DOLAN, K. T.; TWIST, E. M.; HORTON-SLIGHT, P. et al. Epidemiology of rotavirus eletropherotips determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.21, p. 753-758, 1985
- DUTTA, S. K. e POMEROY B.S. Isolation and characterization of an enterovirus from baby chicks having an enteric infection. I. Isolation and pathogenicity. *Avian Diseases*, v.11, p.1—9, 1967
- ELLIS, M. N.; EIDSON, C.S.; BROWN, J. S. et al. Studies on interferon induction and interferon sensitivity of avian reoviruses. *Avian Diseases*, v. 27, p. 936. 1983
- ESPEJO, R. T., LOPEZ, S., ARIAS, C.F., Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *Journal Virology*, v.37, p. 156-160, 1981
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; GERBA, C.P. et al, Simian Rotavirus SA11, replication in cell cultures. *Journal Virology*, v.31, p. 810-815, 1979
- ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; DIMITROV, D. H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenterites. In: MELNICK, J.L. *Progress in Medical Virology*. Basel: Karger, S., 1984, p. 1-22
- ESTES, M. K., e COHEN, J., Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Reviews*, v.53, p. 410-449, 1989
- FLEWETT, T. e WOOD, G. N., The rotaviruses: brief review. *Archieve Virology*, Vienna, v.57, p. 1-23, 1978
- GLASS, S. E.; NAQI, S.A.; HALL, C.F. et al. Isolation and characterization of a virus associated with arthritis of chickens. *Avian Dieaseases* v. 17, p. 415—424. 1973
- GOMES, A. D.; ABREU, J. T.; REDONDO, R. A. F. et al. Genotyping of IBDV strains by restriction fragment length polymorphism of the VP1, VP2 and VP3 genes. *Avian Diseases*, v.49, n.4, p.500-506, 2005.
- GOUCH, R.E.; ALEXANDER, D.J.; COLLINS, M.S. et al. Routine virus isolation for detection for detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathology.*, v. 17, p. 893-907, 1988
- GOUVEA, V. S.; SCHNITZER, T. J., Polymorphism of the migration of double-stranded RNA genome segments og avian reoviruses. *Journal of Virology*, v.43, p. 465-471, 1982

- GUY, J. S. Virus infections of gastrointestinal tract of poultry. *Poultry Science*, v.77, n.8, p.1166-1175, 1998.
- HALL T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98, 1999.
- HAMILTON, J. R. & D. G. GALL.. Pathophysiological and clinical features of viral enteritis. In TYRREL, D. A. J.; e KAPIKIAN, A. Z. (eds.). *Virus infections of the gastrointestinal tract*. Marcel Dekker: New York, 227—238, 1982
- HERRING, A.J.; INGLIS,N.F.; OJEH,C. K. et al. Rapid Diagnosis of Rotavirus Infection by Direct Detection of Viral Nucleic Acid in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v.16, p. 473-477, 1982
- IMAI, K.; MASE, M.; YAMAGUCHI, S. Detection of chicken anemia virus from formalin-fixed tissues by polimerase chain reaction. *Research Veterinary Science* v.64 p. 205 – 208, 1998.
- JONES, R.C. Reovirus from chickens with hydropericardium. *Veterinary Records*, v.99, p.458, 1976
- JONES, R. C.; JORDAN, F.T.W.; LIOUPIS. S. Characteristics of reovirus isolated from ruptured gastrocnemius tendons of chickens. *Veterinary Records* v.96, p.153—154. 1975
- JONES, R. C., HUGHES, C. S., HENRY, R. R., Rotavirus infection in commercial laying hens. *Veterinary Records*., v.22, p.104, 1979
- JONES, R. C. e GEORGIU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The influence of age at infection. *Avian Pathology* v.13 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, p.239—253. 1989
- KANG, S. Y.; NAGARAJA, K. V.; NEWMAN, J.A. Physical, chemical and serological characterization of avian rotaviruses. *Avian Diseases*, v.32, p. 195-203, 1987
- KAWAMURA, H. e TSUBAHARA, H., Common antigenicity of avian reoviruses. *Nat. Institute Animal Health*., v.6, p. 187-193, 1966
- KERR, K. M.; OLSON, N. O. Pathology of chickens experimentally inoculated or contact-infected with an arthritis producing virus. *Avian Diseases* v.13, p.729—745, 1969
- KIBENGE, F. S. B. e WILCOX, G. E. Tenosynovitis in chickens. *Veterinary Bulletin* v. 53, p. 431—444, 1983
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-685, 1970
- LEECE, J. G.; KING, M.W.; MOCK, R. Reovirus like agents associated with fatal diarrhea in neonatal pigs. *Infection and Immunity* v.14, p. 816-825, 1976
- LENZ, S.D.; HOERR, F.J.; ELLIS, A.C. et al. Gastrointestinal pathogenicity of Adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. *Avian Diseases*., v.10, n.2, p 145-151, 1998.
- LIU, J.H.; GIAMBRONE, J.J.; NIELSEN, B.L. Molecular characterization of avian reovirus using nested PCR and nucleotide sequence analysis. *Journal of Virological Methods*, v. 65, p. 159-167, 1997
- LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, J.C.; COHEN, J. et al. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: Attempt of classification among strains isolated in France. *Annals Institute Pasteur Virology*, v.132, p. 161-173, 1981
- MARTINS, N. R. S., RESENDE, J.S., Adenoviruses, reoviruses, rotaviruses e viroses intestinais. In. BERCHIERI JR, A., SILVA, E.N., DI FABIO, J. *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009, cap. 5.6 p. 677 - 710.

- McDONALD, J. W.; RANDELL, C. J.; DAGLESS, M. C. Observations on viral tenosynovitis (viral arthritis) in Scotland. *Avian Pathology*, v.7, p. 471-482, 1978
- McFERRAN, J.B., Immunity to adenoviruses, In: *Avian Immunology*. Edited by ROSE, M. E.; PAINE, L. N.; FREEMAN, B. M, Edinburgh, Longman,1981, p.187-203
- McFERRAN, J.B.; McNULTY, M.S.; McCracken, P.M. et al. Enteritis and associated problems. In. HUNGERFORD, T.G., *Disease Prevention and control in poultry production*. Sidney: University Press, 1983, p. 129-138
- McNEILLY, F.; SMYTH, J.A.; ADAIR, B.M. et al Synergism between Chicken Anemia Virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of –day-old chicks by a natural route. *Avian Diseases*, v. 39, p, 532 - 537, 1995
- McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M., TODD, D.; McFERRAN, J, B. Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. *Archieve Virology*. v.61 , p.13, 1979
- McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D. et al. Isolation OF ROTAVIRUSES from turkeys and chickens: demonstrations of distinct serotypes and RNA eletropherotypes. *Avian Pathology*, v.9, p.363-375, 1980
- McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; McCracken, R. M., Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. *Avian Pathology*, v.12, p.45-54, 1983
- McNULTY, M.S., Avian Rotavirus infection. In: *Diseases of Poultry 11 ed*. Ames, IA: Iowa State Universitu Press, 2003. P. 308-320
- MENENDEZ, N. A.; CALNEK, B.W.; COWEN, B.S. Experimental egg-transmission of avian reovirus. *Avian Diseases* v. 19, p.104—111, 1975
- MOON, H. W. e SKARTVEDT, S. M., Effect of age epithelial cell migration in small intestine of chickens. *American Journal Veterinary Research*, v.36, p. 213-215, 1975
- OFFIT, P.A.; FRED CLARK, H.; HORNSTEIN M. J., A murine model for oral infection with a primate rotavirus (simian SA11). *Journal Virology*, v.51, p. 233-236, 1984
- OLSON, N. O.; SHELTON, D. C.; AND MUNRO, D. A. Infectious synovitis control by medication-effect of strain differences and pleuropneumonia-like organisms. *Am Journal Veterinary Research* v.18, p.735 - 739, 1957
- OLSON, N. O.; KERR, K.M.; CAMPBELL, A. Controll of infectious synovitis. The antigen study of three strains. *Avian Diseases*, v.8, p. 209-214, 1964
- OLSON, N. O.; SOLOMON, D. P. A natural outbreak of synovitis caused by viral arthritis agent. *Avian Diseases*, v. 12, n. 4, p. 311-316, 1968.
- OLSON, N. O. e KERR, K.M. The duration and distribution of synovitis-producing agents in chickens. *Avian Diseases* v.11, p. 578—585, 1967.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G. et al. Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IME) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v.78, p.483-490, 1983.
- PETEK, M.; FELLUGA, B.; BORGHI, G. et al. The crawley agent: an avian reovirus. *Archieve Fuer. Die. Gesante Virus forschung*, Heidelberg, v.21, p. 413-424, 1967
- REYNOLDS, D. L., e SAIF, Y. M.. Astrovirus: A cause of na enteric disease in turkey poults. *Avian diseases*, v.30, p. 728-735, 1986
- RITTER, G.D.; LEY, D.H.; LEVY, M. et al. Intestinal cryptosporidiosis and reovirus isolation from bobwhite quail (*Colinus virginianus*) with enteritis. *Avian Diseases*, v.30, p. 603-608, 1986
- ROBERTSON, M. D. e WILCOX, G.E. Serological characteristics of avian reoviruses of Australian origin. *Avian Pathology*, v.13, p.585—594, 1986

- ROSENBERGER, J. K.; STERNER, F.L.; BOTTS, S. et al. In viro and in vivo characterization of avian reoviruses. Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates. *Avian Diseases*, v.33, p. 535-544, 1989
- ROSENBERGER, J. K.; OLSON, N. O. Reovirus infections. In: CALNEK, B. W. *Diseases of poultry*. 9.ed. Iowa: Iowa State University Press, 1991. p. 639-646.
- ROSENBERGER, J. K. Reovirus infections. In: CALNEK, B. W. *Diseases of poultry*. 11.ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003. p. 283 – 293
- ROSENBERGER, J. K.. *Characterization of reoviruses associated with runtting syndrome in chickens*. In: International Union of the Immunological Society 66. Local: Sydney, Australia, p. 141—152, 1983
- RUFF, M.D.; ROSENBERGER, J.K. Concurrent infections with reoviruses and coccidian in broilers. *Avian Diseases*, v.29, p. 465-478, 1985
- SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M. et al. Diseases of poultry. In: ROSENBERGER, J.K. *Reovirus infections*. 11 ed. Iowa: Blackwell Publishing company, 2003, p. 283-293.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 ed. Cold Spring Harbos Laboratory Press, v.3, 1989
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA. Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science of USA* 74: 5463-5467, 1977.
- SANTOS, B.M.; PEREIRA, G.P.; GOMEZ, S.Y.M. *Prevenção e controle de doenças infecciosas nas aves de produção*. Viçosa: ed. UFV, 2009, 150 p.
- SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C. A. V.; RUBIN, L. L. et al. Um protocolo de “nested-pcr” para detecção do vírus da anemia das galinhas. *Pesq. Vet. Bras.* v. 25, n.2, p.106-110, 2005.
- SPANDIDOS, D. A.; GRAHAN, A. F. Physical and chemical characterization of avian Reovirus. *Journal Virology*, v.19, p. 968-976, 1976
- TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C. et al. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken., *Brazilian Journal of Microbiology* v. 34, p. 349-353, 2003
- TAN, J.A e SCHNAGL, R.D. Inactivation of a Rotavirus by disinfectants. *Med. Journal Aust.*, v.1, p. 19-23, 1981
- TAN, J.A e SCHNAGL, R.D. Rotavirus inactivated by a hipoclorite – based disinfectants, *Journal Aust.*, v.12, p. 550, 1983
- TANG, K. e FLETCHER, O.J. Application of the avidinbiotin- peroxidase complex (ABC) techniques for detecting avian reovirus in chickens. *Avian Diseases*, v.31, p. 591—596, 1987
- THEIL, K. W.; BOHL, E.H.; CROSS, R.F. et al. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. *American Journal Veterinary Research*, v.39, p. 213-220, 1978
- THEIL, K. W.; McCLOSKEY, C.M.; SAIF, E.J. et al. Rapid simple method of preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.14, p. 273-280, 1981.
- THEIL, K. W., REYNOLDS, D. L., SAIF, Y. M. Comparison of immune electron microscopy and genome eletropherotyping techniques for detection of turkey rotaviruses and rotavirus like viruses in intestinal contents. *Journal of Clinical Microbiology*, v.23, p. 695-699, 1986
- VAN DER HEIDE, L. AND. KALBAC, M. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Diseases* v.19, p.683-688, 1975

- VAN DER HEIDE, L. Introduction on avian reovirus. International Symposium on Adenovirus and Reovirus *Infections in Poultry*, Rauschholzhausen, Germany, 1996, p. 138—142.
- VAN REGENMORTEL M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. et al. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. San Diego: Academi Press, 2000. 1167p *The seventh report of international commite on taxonomy of viruses*.
- VARLEY, J.; JONES, R. C.; BRADBURY, J. M. et al. A survey of the viral flora of two commercial Pekin duck flocks. *Avian Pathology*, v. 22, p.703 – 714, 1993.
- VASCONCELOS, S B S; BOTTINO J A; GUERRA J L. et al. Lesões articulares em frangos de corte (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário *Braz. Journal. Veterinary Research animal Science*, v. 38, n. 2, p. 80-83, 2001
- VILLAREAL, L.Y.B.,. *Detecção de um coronavírus entérico em aves de corte, poedeiras comerciais e matrizes: Distribuição, diversidade molecular e diagnóstico diferencial com outros vírus entéricos aviários*, 2006, 96f. Tese (Doutorado em Patologia experimental e comparada. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP), São Paulo
- WALKER, E. R.; FRIEDMAN, M. H.; OLSON, N. O. Electron microscopic study of an avian reovirus that causes arthritis. *Journal Ultrastruct Res*, v.41, p. 67 - 79, 1972
- YASON, C. V.; SCHAT, K.A., Experimental rotavirus infection in specific-pathogen-free white leghorn chickens. *Avian Diseases*, v.30, p. 551-556, 1986
- YASON, C. V.; SCHAT, K.A.; SUMMERS, B.A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens ans turkeys: Clinical signs and virology. *Am. Journal Veterinary Research*, v.48, p. 977-983, 1987
- YAWEI, N. e KEMP, M. C. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and induction of lesions. *Avian Diseases*, v. 39, n. 5, p. 554-566, 1995