



DETECÇÃO E ANÁLISE GENOTÍPICA DE REOVÍRUS AVIÁRIOS ASSOCIADOS COM TENOSSINOVITE EM AVES DE PRODUÇÃO COMERCIAL NO BRASIL

Michelle Vanset^{1,2}
Silvia DeCarli³
Fernanda Kieling Moreira Lehmann²
Nilo Ikuta^{4,5}
Vagner Ricardo Lunge^{4,5}

Resumo

O reovírus aviário (ARV, *avian reovirus*) pertence ao gênero *Orthoreovirus* da família *Reoviridae* e está associado a artrite viral e síndrome de má absorção em frangos de corte. Ambas as situações resultam em grandes perdas econômicas para o setor avícola, decorrentes de condenação de carcaças e conversão alimentar, respectivamente. Os ARVs possuem um capsídeo icosaédrico não envelopado, com genoma de RNA de cadeia dupla segmentado e dividido em três classes de tamanho, possuindo aproximadamente 23.500 pares de bases. O capsídeo externo é constituído por três proteínas mais variáveis, entre as quais sigma C (σC) que tem 326 aminoácidos. O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção e a análise genotípica de ARVs circulantes no Brasil. Foram coletadas 22 amostras de lesões em membros pélvicos de frangos de corte em lotes de aves comerciais. O RNA foi extraído e o ARV foi detectado por PCR de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) utilizando uma região conservada do genoma. Região variável do gene da proteína σC foi amplificada para sequenciamento pelo método de Sanger. O alinhamento das sequências e a análise filogenética foram realizados com dados de amostras de referência dos seis genótipos principais de ARVs previamente detectadas em todo o mundo. Os ARVs do presente estudo foram classificados nos genótipos de acordo com as sequências de aminoácidos da proteína σC . Dados de sequências sugerem que os genomas de ARVs possuem elevada frequência de mutações e rearranjos, resultando em diversos genótipos bastante heterogêneos.

Palavras chave: reovírus; tenossinovite; RT-PCR; sigma C.

INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira tem participação fundamental na economia nacional, pois representa o mercado de carnes com maior projeção de crescimento anual (RECK, 2011). O sucesso da cadeia produtiva brasileira é fruto de um intenso trabalho de seleção e melhoramento genético, adoção de modernas técnicas de manejo e medidas de biossegurança (MACHADO, 2010). Devido às altas densidades populacionais decorrente da intensa

1 Aluno do curso de Medicina Veterinária – Bolsista PIBIT/CNPq – michelle.vanset@gmail.com

2 Laboratório de Diagnóstico Molecular - ULBRA

3 PPG em Ciências Veterinárias - UFRGS

4 Professor do PPGBioSaúde

5 Professor Orientador – vagner.lunge@gmail.com

produção industrial, as doenças infecciosas são mais facilmente disseminadas entre as aves (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

Uma doença de caráter econômico e com disseminação entre aves de produção é a artrite infecciosa que além de representar um problema sanitário causa grande impacto na economia do setor, provocando elevadas perdas de produtividade nos processos de industrialização. Na fase de produção dos frangos, as artrites e tenossinovites infecciosas têm como principais consequências a redução do ganho de peso, piora na conversão alimentar e transtornos de locomoção (JORDA et al., 2001). Apesar do impacto nos índices de produtividade da avicultura industrial no Brasil, existem poucas informações sobre o diagnóstico e a epidemiologia.

Os reovírus aviários (ARVs, *avian reoviruses*) caracterizam-se pela especificidade de infecção nas aves, diversidade antigênica e ausência de atividade hemaglutinante. O *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) descreve apenas oito sorotipos, porém estudos mais recentes evidenciaram 11 sorotipos distintos de acordo com distribuição geográfica, espécie aviária e material clínico de origem (ALFIERI et al., 2017). As manifestações clínicas nas aves incluem artrite viral e síndrome de má absorção (BACK, 2002).

O genoma é composto por RNA dupla-fita segmentado que está envolto em um capsídeo com dupla camada correspondendo a aproximadamente 70 a 80 nm de diâmetro. O genoma completo compreende aproximadamente 23.500 pares de bases dividido em dez segmentos divididos em três classes de tamanho: três segmentos grandes (*large* - L1, L2 e L3), três médios (*medium* - M1, M2 e M3) e quatro pequenos (*small* - S1, S2, S3 e S4) (ALFIERI et al., 2017; DAY, 2009).

Cada segmento geralmente codifica apenas uma proteína, exceto os segmentos S1 e S4 que codificam duas proteínas cada. Ou seja, o vírus expressa pelo menos oito proteínas estruturais primárias e quatro proteínas virais não estruturais. Enquanto o núcleo interno é composto por cinco proteínas altamente conservadas (λ_A , λ_B , λ_C , μ_A e σ_A), o capsídeo externo é constituído por três proteínas mais variáveis (μ_B , σ_B e σ_C). A comparação de todos os segmentos demonstrou que existem regiões mais conservadas como (λ_A , λ_B , μ_A , μ_{NS} , σ_A , σ_B e σ_{NS}) e variáveis (λ_C , μ_B e σ_C) (FARKAS et al., 2016).

O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção e a análise genotípica de ARVs circulantes no Brasil.

METODOLOGIA

Foram coletadas 22 amostras de lesões em membros pélvicos de frango de corte em lotes de aves comerciais com alta taxa de condenação de carcaças devido a lesões. As idades dos animais variaram de 22 a 28 dias, sem correlação com o sexo. Amostras consistiram de articulações tibiotársicas, músculo gastrocnêmio, tendão gastrocnêmio, músculo tibial cranial, músculo pub isquiofemoral e flexor crural medial.

O RNA dos tecidos foi extraído pelo método de adsorção em sílica. Os ARVs foram detectados através de uma PCR de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) em uma região conservada do genoma. A cepa de vacina S1133 foi utilizada como controle positivo.

A genotipagem foi realizada por RT-PCR e sequenciamento do gene σC . Um DNA complementar (cDNA) foi produzido e após a amplificação foi realizada por Nested-PCR. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata. Os fragmentos amplificados foram sequenciados pelo método de Sanger. Os resultados obtidos passaram por análises de bioinformática. As sequências obtidas foram alinhadas com dados de referência dos genótipos I, II, III, IV, V e VI. A árvore filogenética foi construída com base na sequência de aminoácidos da proteína σC pelo método de máxima verossimilhança. A filogenia foi realizada através do *software* IQ-TREE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As principais lesões patológicas e as lesões histológicas observadas no presente estudo foram semelhantes às lesões observadas em um estudo experimental por ARV, em que a fase aguda mostrou infiltrado inflamatório misto nas bainhas do tendão das amostras analisadas (Jones, 1978). O ARV infecta aves jovens, uma vez que parecem tornar-se menos suscetíveis à infecção à medida que envelhecem. As amostras positivas de ARVs foram submetidas ao sequenciamento de σC e classificadas em grupos de genótipos (ou clusters) de acordo com as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene mais variável e respectiva proteína sigma C (KANT et al., 2003; LU et al., 2015; AYALEW et al., 2017). Atualmente, seis grupos principais de ARVs já foram detectados em todo o mundo (LU et al., 2015; AYALEW et al., 2017). No presente estudo, as amostras de campo de ARVs foram classificadas em quatro grupos de genótipos/clusters caracterizados anteriormente (I, II, III e V).

Essas amostras mostraram uma similaridade de 32 a 100% entre si. Agruparam-se 7 amostras no genótipo I, próximas a isolados da França. No genótipo II, agruparam-se 6

amostras em um ramo específico da árvore filogenética, próximo a cepas dos Estados Unidos, Canadá e Israel. Uma amostra agrupou-se próxima a isolados dos Estados Unidos, no genótipo III e as 4 amostras pertencentes ao genótipo V ficaram próximas a cepas da Austrália. Não foi observada correlação entre genótipos e lesões.

CONCLUSÃO

A análise realizada no estudo, somada aos dados de sequências já existentes sugerem que os genomas de ARVs possuem elevada frequência de mutações e rearranjos, resultando em diversos genótipos bastante heterogêneos. Outros estudos, como sequenciamento, caracterização completa do genoma e determinação do mecanismo de patogenicidade são necessários para obter melhores informações sobre as cepas circulantes de ARV, a fim de desenvolver estratégias eficientes de proteção da doença.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MATOS, A. C. D.; LORENZETTI, E.; LOBATO, Z. I. P. Reoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2017. cap. 32.

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

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

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

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

JONES, R. C. Studies on Experimental Tenosynovitis in Light Hybrid Chickens. **Avian Pathology**, v.7, p. 171-181, 1978.

JONES, R. C.; & GEORGIU K. Reovirus- induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. **Avian Pathology**. v. 13, p. 441 - 457, 1984.

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

KANT, A; BALK, F.; BORN, L.; VAN ROOZELAAR, D.; HEIJMANS, J.; GIELKENS, A.; TER HUURNE, A. Classification of Dutch and German avian reoviruses by sequencing the σ C protein. **Veterinary Research**. Pulawy, v. 34, n. 1, p. 203-212, 2003.

KORT, H. Y.; BOUROGÂA, H.; GRIBAA, L.; SCOTT-ALGARA, D.; GHRAM, A. Molecular characterization of avian reovirus isolates in Tunisia. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 12, 2013.

LU, H.; TANG, Y.; DUNN, P. A.; et al. Isolation and molecular characterization of newly emerging avian reovirus variants and novel strains in Pennsylvania, USA, 2011-2014. **Scientific reports**, v. 5, n. April, p. 14727, 2015.

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

RECK, C. **Detecção de Mycoplasma synoviae e Orthoreovírus aviário em lesões de artrites em matriz e frango de corte**. [Dissertação para título de mestre, programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina]. Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages. 2011.

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