

Características clínicas e anatomo-histopatológicas da infecção experimental mista por *Orthoreovirus aviario* e *Mycoplasma synoviae* em frangos de corte¹

Carolina Reck^{2*}, Álvaro Menin³, Celso Pilati⁴ e Luiz Cláudio Miletti²

ABSTRACT.- Reck C., Menin A., Pilati C. & Miletti L.C. 2012. [Clinical and histologic lesions of mixed infection with *Avian orthoreovirus* and *Mycoplasma synoviae* in broilers.] Características clínicas e anatomo-histopatológicas da infecção experimental mista por *Orthoreovirus aviario* e *Mycoplasma synoviae* em frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(8):687-691. Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, Universidade do Estado de Santa Catarina, Avenida Luiz de Camões 1020, Lages, SC 88520-000, Brazil. E-mail: carolreck@gmail.com

Infectious arthritis in broiler represents an economic and health problem resulting in severe losses due to retarded growth and down grading at slaughterhouse. The most common agents associated with cases of infectious arthritis in poultry are *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus*. This study proposed to investigate the histopathological changes caused by mixed infection with *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus* in broilers and confirm the presence of the agents through PCR and immunofluorescence assay (IFA). We used 16 broiler chickens, housed in bed, with supply of food and water *ad libitum*. Ten-day-old broilers were infected with *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus*. Clinically, they showed lethargy and swelling of the hock joint. After 30 days, we proceeded to their euthanasia and necropsy. Histological lesions were observed due to the mixed infection with *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus* in different tissues. The histopathology of the joints was characterized by infiltration of heterophil leucocytes in the synovial membrane and the digital flexor tendon. The inflammatory process was also found in trachea, lungs, air sac, liver, spleen, pericardium and proventriculus. The use of IFA was necessary to verify the presence of both agents in the hock joints, identifying the antigens of *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus*. The presence of *M. synoviae* was detected by PCR in trachea, lung, air sacs, synovial membrane and synovial fluid. *Avian orthoreovirus* was detected with PCR in liver, spleen, synovial membrane and digital flexor tendon. In conclusion, this investigation suggests that a synergistic relationship exists between *Mycoplasma synoviae* and *Avian orthoreovirus*.

INDEX TERMS: Arthritis, broiler, *Mycoplasma synoviae*, *Avian orthoreovirus*.

¹ Recebido em 26 de setembro de 2011.

Aceito para publicação em 21 de dezembro de 2011.

Parte da Dissertação de Mestrado da primeira autora junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrovetinárias (CAV), Universidade de Desenvolvimento do Estado de Santa Catarina (UDESC).

Trabalho realizado com suporte do CNPq e CAPES.

² Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, CAV-UDESC, Av. Luiz de Camões 1020, Lages, SC 88520-000, Brasil. *Autor para correspondência: carolreck@gmail.com

³ Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas, CCB/MIP-Universidade Federal de Santa Catarina, Rua João Pio Duarte Silva s/n, Córrego Grande, Bloco A, Campus Trindade, Florianópolis, SC 88040-900, Brasil.

⁴ Laboratório de Histologia, CAV-UDESC, Lages, SC.

RESUMO.- A artrite infecciosa em frangos de corte representa um problema sanitário e econômico de grande impacto, provocando perdas de produtividade e nos processos de produção e industrialização. Os principais agentes etiológicos associados aos casos de artrites e tenossinovites infecciosas em aves são *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Orthoreovirus aviario* (ARV). Esse trabalho propôs investigar as alterações anatomohistopatológicas causadas pela infecção experimental concomitante por *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovirus aviario* em frangos de corte e confirmar a presença dos agentes através das técnicas de PCR e imunofluorescência indireta (RIFI). Para tal foram utilizados 16 frangos de corte, alojados em cama, com fornecimento de

ração e água *ad libitum*. A infecção experimental foi realizada utilizando amostras atenuadas de MS e de ARV. Clinicamente as aves inoculadas apresentaram apatia e edemação da região da articulação tíbiotársica. Após 30 dias procedeu-se a eutanásia e a necropsia das aves. Na análise histopatológica constatou-se o efeito da infecção mista com MS e ARV sobre os diferentes órgãos/tecidos. Todos os animais apresentaram quadro de artrite e tenossinovite caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório linfocitário difuso, com acúmulo de heterófilos na cápsula articular/membrana sinovial e tendão flexor digital. Além disso, foi possível observar infiltrado inflamatório na traquéia, nos pulmões e sacos aéreos, no fígado, baço, pericárdio e proventrículo. A utilização da RIFI foi necessária para visualizar a presença de ambos os agentes nas articulações, identificando a presença de antígenos do ARV e do MS. A técnica de PCR constatou positividade do MS na traquéia, pulmões/sacos aéreos, cápsula articular/membrana sinovial e líquido sinovial. Já para o ARV a PCR foi positiva em amostras de fígado, baço, cápsula articular/membrana sinovial e tendão flexor digital. Com base nas lesões observadas e nos dados da literatura, sugere-se a ação concomitante por MS e ARV nos diferentes tecidos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Artrite, frango de corte, *Mycoplasma synoviae*, *Orthoreovirus aviário*.

INTRODUÇÃO

A avicultura industrial brasileira possui papel de destaque no mercado mundial de carnes, colocando o Brasil como o maior exportador de carne de frango do mundo, totalizando 12, 300 milhões de toneladas de carne de frango e um faturamento anual próximo a U\$\$ 7 bilhões (UBA 2011). O sucesso da cadeia produtiva brasileira de carne de frango é resultante do melhoramento genético e da adoção de modernas técnicas de manejo nutricional, sanitário e de biossegurança (Moretti 2006).

Os problemas locomotores, representados pelas artrites e tenossinovites infecciosas estão entre as principais causas de condenação parcial no abate (Giotto et al. 2008), mesmo assim, ainda são subestimados, pois não são contabilizadas as perdas de produção e os descartes associados a estes quadros que ocorrem durante o período de alojamento (Moretti 2006).

Como principais agentes causadores das artrites infecciosas destacam-se o *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Orthoreovirus aviário* (ARV) (Kleven 1997, Rosenberger & Olson 1997).

O *Mycoplasma synoviae* possui tropismo pelas serosas e mucosas do hospedeiro, causando doença crônica ou infecções de longa duração, associadas principalmente a quadros de sinovite infecciosa e infecções subclínicas no aparelho reprodutor e trato respiratório superior das aves (Kleven 1997, Nascimento 2000). Uma vez introduzido na granja, o MS é de difícil eliminação, apesar de ser um agente controlado nas granjas de matrizes é bastante encontrado nos plantéis avícolas (Nascimento 2001, Cardoso et al. 2006).

Orthoreovirus aviário, também denominado de reovírus, está amplamente difundido nas granjas avícolas bra-

sileiras, sendo relatado em diversos países com avicultura industrial (Savage & Jones 2003). O ARV está associado a duas importantes manifestações clínicas nas aves, artrite/tenossinovite viral e a síndrome de má absorção (Rosenberger & Olson 1997). Durante a infecção das aves é possível observar aumento de volume uni ou bilateral na articulação tíbiotarso, proliferação de tecido conjuntivo fibroso e ósseo e presença de edema do tendão flexor digital (Rosenberger & Olson 1997). Com a evolução da doença, as aves apresentam severa dificuldade de locomoção e tendem a apoiar sobre o tarso, caracterizando o quadro denominado de “perda de pernas” (Bottino 2009). Uma série de fatores deve ser considerada em relação ao agravamento das lesões artríticas, como manejo e nutrição deficiente, infecção por agentes oportunistas e mesmo a infecção concomitante por ambos os agentes (MS e ARV), provocando aumento na severidade do quadro patológico pela ação sinérgica dos mesmos (Kibenge et al. 1987).

Considerando o quadro clínico-patológico e as perdas econômicas causadas pelo MS e ARV em frangos de corte, bem como a ocorrência dos agentes nos plantéis avícolas brasileiros, esse trabalho propôs investigar as alterações clínicas e anatomohistopatológicas causadas pela infecção experimental concomitante por *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovirus aviário* em frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Para a realização do experimento foram utilizados 16 pintinhos de linhagem comercial para corte (fêmeas e machos), com 10 dias de vida, alojados em aviário de experimentação (Centro de Ciências Agroveterinárias, CAV-UDESC). Durante o experimento os animais receberam ração e água *ad libitum* e controle de luminosidade. Todos os procedimentos com animais foram avaliados e aprovados pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal, CEUA/CAV/UDESC, sob Protocolo nº1.31.11.

Infecção experimental com MS e ARV. Os animais foram inoculados com 8×10^5 CFU de MS da cepa MS-H através da via intranasal e podal e $10^{4.8}$ DICT50/0, 5ml de ARV cepa S1133, através da via oral e podal.

Necropsia e obtenção das amostras. Trinta dias após a infecção (d.p.i) foi realizada a eutanásia dos animais pelo método de deslocamento cervical seguido da necropsia e colheita de fragmentos da traquéia, pulmões/sacos aéreos, coração, sistema digestório, fígado, bursa de Fabricius, baço, cápsula articular/membrana sinovial, tendão flexor digital, que foram alicotados e conservados sob refrigeração e fixados em solução tamponada de formol 10%. Também foram coletados *swabs* do líquido sinovial da articulação tíbio-tarso.

Processamento histopatológico. Para o processamento histopatológico, as amostras de tecidos e órgãos foram fixadas solução tamponada de formalina a 10%, em seguida incluídos em parafina líquida, posteriormente cortados em micrótomo (5µm), corados com hematoxilina e eosina (H&E) e analisados em microscópio óptico (Mcmanus & Mowry 1965).

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para realização da RIFI, fragmentos de traqueia, pulmão, coração, fígado, tendão flexor digital e cápsula articular/ membrana sinovial foram incluídos em Tissue-tek (OCT, Miles, USA), mantidos a -20°C em seguida realizados os cortes (5µm) com criostato (Leica, CM 1100, Germany) e fixados com acetona gelada em lâminas pré-tratadas com Poly-L-lisina® (Quiagen Inc., Valencia, CA, USA), submetidos à reativação antigênica, bloqueio, seguida marcados

com anticorpos primário e secundário. Como anticorpo primário, foram utilizados os anticorpos policlonais anti-ARV em camundongos (cepa S1133 - MIP/UFSC, SC, Brasil) e anti-MS em coelhos (Bcell, RS, Brasil). Como anticorpos secundários foram empregados anticorpo *anti-IgG de coelho* marcados com Alexa Fluor 488 (A11008 - Invitrogen Inc., CA, USA) e anticorpo *anti-IgG de camundongo* marcados com FITC (Invitrogen®). A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus, mod. BX40).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) para detecção do MS e ARV. Para a extração do RNA do ARV foi utilizado o método do Trizol® (Invitrogen Inc., CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Para a extração do DNA do MS foi realizado protocolo conforme descrito por Fan et al. (1995). A fim de obter o cDNA (DNA complementar) do ARV realizou-se antes a técnica de transcriptase reversa (RT-PCR). O ensaio de PCR para a detecção do ARV foi realizado utilizando iniciadores para um sequencia do gene S1, permitindo um produto de amplificação de 532pb, conforme descrito por Xie et al. (1997). A detecção do MS nos tecidos através da técnica de PCR, foi realizada segundo Lauerma (1998), utilizando iniciadores para o gene 16S do rRNA, que amplificam uma produto de 207pb. A eletroforese com os produtos de amplificação foi realizada em gel de agarose a 1,5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 16 frangos apresentaram dificuldade de locomoção 30 dpi, apatia, além de aumento de volume da região da articulação tibiotársica e presença de edema. Na necropsia foi possível observar diferentes graus de artrite, grande fragilidade óssea evidenciada pela fratura do fêmur durante a desarticulação coxo-femural e aumento do líquido sinovial.

Através dos ensaios de RIFI e PCR foi detectado presença simultânea do ARV e MS na articulação tibiotársica de todos os animais (Quadro 1). A RIFI sugere a co-localização dos agentes, demonstrando a associação destes nos casos de artrites, sendo o ARV principalmente associado à superfície de fibroblastos da camada externa da membrana sinovial e tendão flexor digital e o MS na superfície interna da cápsula articular, na membrana sinovial, junto ao endotélio vascular. Na infecção por MS ou ARV, a resposta imune mediada por células desempenha um papel fundamental na imunopatologia da doença, principalmente com relação

às lesões artríticas (Kibenge et al. 1987, Senties-Cué et al. 2005) devendo ser considerada a ação sinérgica dos dois agentes na infecção mista (Kibenge et al. 1987), visto que ARV (Ni & Kemp 1995) e MS (Senties-Cué et al. 2005) estão associados a quadros de imunossupressão. A exemplo do que ocorre em outras infecções onde a patologia é agravada pela co-infecção por agentes imunossupressores, quadros gravíssimos podem ocorrer nos casos de infecção mista envolvendo ARV e/ou MS e o vírus da doença infecciosa da bursa (IBDV) que causa severa imunodepressão nos animais (Moradian et al. 1990, Senties-Cué et al. 2005). A persistência do ARV nos tendões esta relacionada à idade em que ocorre a infecção, permanecendo por um período mais longo quando a infecção ocorre em pintinhos de um dia (Jones & Georgiou 1984).

Usando a coloração convencional de hematoxilina-eosina (HE), foi possível observar o efeito histopatológico da infecção mista com MS e ARV nos diferentes órgãos/tecidos (Quadro 2). Todos os animais apresentaram quadro de artrite e tenossinovite caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório linfocitário difuso com presença de heterófilos na cápsula articular e tendão flexor digital (Fig.1e,f). Na cápsula ainda observou-se leve hiperplasia das células sinoviais. Este padrão lesional pode ser observado tanto na infecção pelo ARV (Ni & Kemp 1995, Vasconcelos et al. 2001a), quanto pelo MS (Lockaby et al. 1998). É importante considerar que o ARV e o MS causam uma doença progressiva com caráter crônico, levando a alterações graves das estruturas da articulação. Lesões mais graves como erosão da cartilagem articular pode não ter sido observado neste estudo devido ao curto período de infecção.

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear peribronquial difuso com presença de células gigantes na parede alveolar dos pulmões (Fig.1c, d) e infiltrado linfocítico

Quadro 2. Lesões histopatológicas nos diferentes órgão/tecidos na infecção experimental mista de frangos de corte com MS (8x10⁵ CFU - cepa MS-H) e ARV (10^{4.8} DICT50/0, 05 ml- cepa s1133)

Órgãos/tecidos	Achados histopatológicos*
Tendão flexor digital	Infiltrado linfocitário difuso, com presença de heterófilos.
Articulações tibiotársica	Infiltrado inflamatório linfocitário difuso moderado com presença de heterófilos.
Cápsula articular	Leve hiperplasia, com a presença de intenso infiltrado linfocitário difuso com presença de heterófilos.
Traquéia	Infiltrado linfocítico difuso na região da mucosa.
Pulmões	Infiltrado inflamatório mononuclear peribronquial difuso com presença de células gigantes na parede alveolar.
Sacos aéreos	Infiltrado linfocítico.
Fígado	Infiltrado linfocitário intenso principalmente no espaço porta e presença de heterófilos. Alguns casos de necrose hepática focal.
Baço	Necrose folicular em graus variáveis com hiperplasia esplênica reacional.
Pericárdio/coração	Presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso.
Proventrículo	Infiltrado inflamatório mononuclear leve na submucosa.
Bursa de Fabricius	Ausência de lesões.

Quadro 1. Detecção de MS e ARV e presença de lesões histopatológicas nos diferentes órgão/tecidos na infecção experimental mista de frangos de corte com MS (8x10⁵ CFU - cepa MS-H) e ARV (10^{4.8} DICT50/0, 05 ml- cepa s1133)

Órgão/tecidos	Lesões histopatológicas*	<i>Mycoplasma synoviae</i>		<i>Orthoreovirus aviario</i>	
		PCR	RIFI	PCR	RIFI
Pulmão	+**	+	-***	NR****	NR
Traquéia	+	+	+	NR	NR
Sacos aéreos	+	+	NR	NR	NR
Coração	+	-	NR	-	-
Baço	+	-	NR	+	NR
Fígado	+	-	-	+	+
Proventrículo	+	-	NR	-	NR
Bursa de Fabricius	-	NR	NR	NR	NR
Cápsula articular/ Membrana sinovial	+	+	+	+	+
Tendão flexor digital	+	-	-	+	+
Líquido sinovial	NR	+	NR	-	NR

* Cortes de tecido embebido em parafina (5µm) corados hematoxilina e eosina (HE) avaliados em microscópio óptico. ** (+) Positivos ; *** (-) Negativo; **** NR = Não realizado.

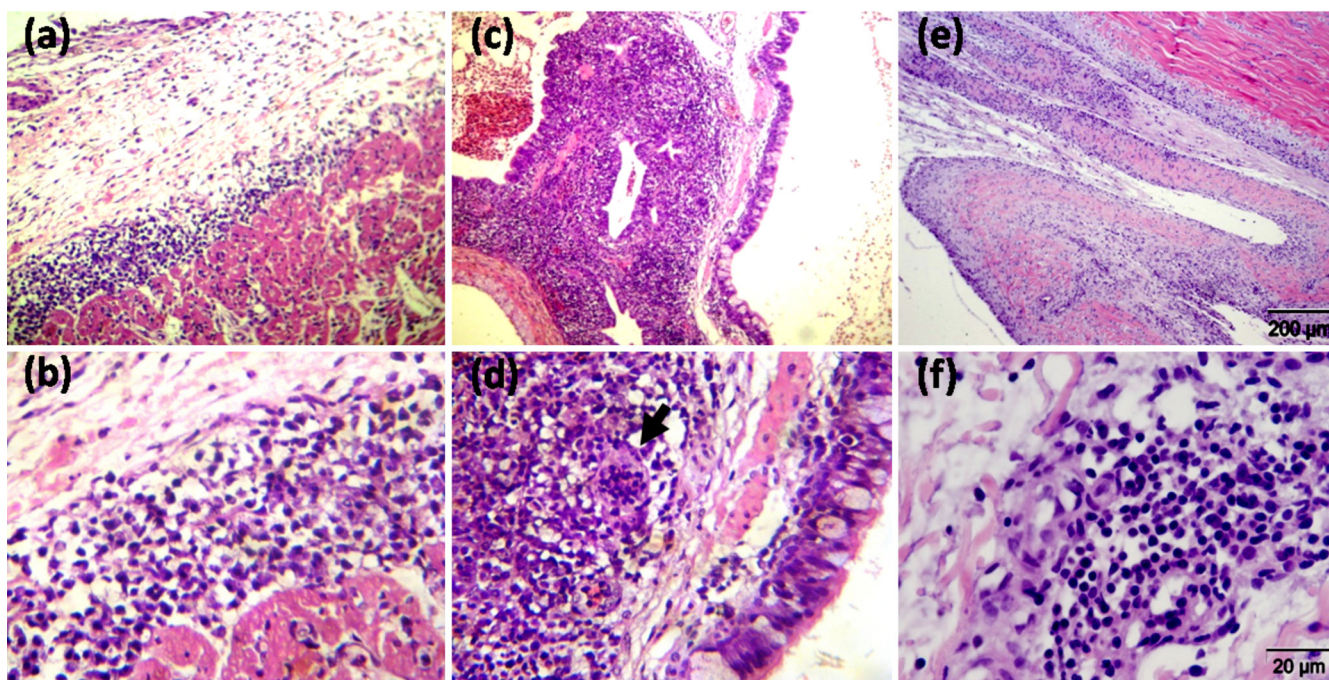


Fig.1. Análise dos achados histopatológicos na infecção experimental de frangos de corte com MS (8×10^5 CFU - cepa MS-H) e ARV ($10^{4.8}$ DICT50/0, 05 ml- cepa s1133). (a,b) Pericárdio com severo infiltrado inflamatório heterofílico e presença de células mononuclear. (c,d) Pulmão com intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso e presença de células gigantes (*seta*). (e,f) Cápsula articular com intenso infiltrado linfo-histiocitário difuso e presença de heterófilos. Cortes 5µm, coloração HE, obj.10x, figuras superiores e 40x, figuras inferiores.

difuso na mucosa da traquéia é compatível com o quadro patológico causado pela infecção por MS (Kleven 1997, Lockaby et al. 1998). Neste experimento, pode ser confirmado pela detecção do MS na traquéia e pulmões através da PCR (Fig.2a) e RIFI, corroborando com (Morrow et al. 1990, Lockaby et al. 1998, Senties-Cué et al. 2005). Apesar do ARV não ter sido detectado nestes tecidos, não exclui sua atividade em uma fase inicial da infecção, que poderia de alguma forma contribuir para o agravamento das lesões causadas pelo MS (Rosenberger & Olson 1997). A presença de infiltrado inflamatório mononuclear no proventrículo,

caracterizando um quadro de proventriculite, possivelmente está associado à via de inoculação (via oral) do ARV (Rosenberger & Olson 1997, Lenz et al. 1998).

Infiltrado linfocitário intenso principalmente no espaço porta e presença de heterófilos foi observado no fígado, além de pontos de necrose hepática focal em 43,75% (7/16) dos frangos. Possivelmente estas lesões estão associadas à replicação do ARV que atinge o fígado, replica-se nos hepatócitos, provocando degeneração vacuolar e necrose (Jones et al. 1989, Ni & Kemp 1995, Vasconcelos et al. 2001b). Os resultados da RIFI e PCR (Fig. 2b) confirmam

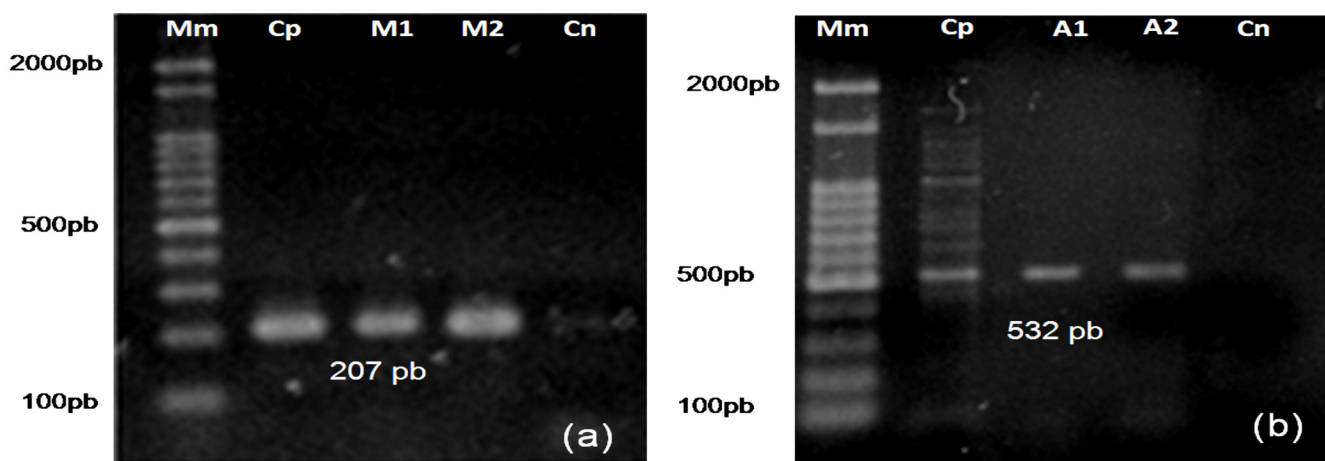


Fig.2. Detecção através da PCR de MS e ARV nos diferentes órgão/tecidos na infecção experimental mista de frangos de corte. (a) Amplificação 207pb do gene 16S rRNA do MS: M1 e M2 = amostras clínicas positivas para MS. (b) Amplificação 532pb do gene S1 do ARV: A1, A2 = amostras clínicas positivas para ARV; Mm = marcador de massa molecular 100pb; Cp = Controle positivo. Cn = Controle negativo. Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio.

esta íntima associação do quadro lesional com a infecção por ARV. Mesmo assim, é importante salientar que em casos de infecção sistêmica por MS é possível observar discreto infiltrado inflamatório hepático (Lockaby et al. 1998).

A presença de necrose folicular em graus variáveis com hiperplasia esplênica reacional, juntamente com a detecção do ARV pela PCR, sugere a associação dos achados com a infecção pelo ARV. O baço é um órgão primário para multiplicação do ARV, permitindo o re-isolamento viral a partir do tecido esplênico um dia após infecção experimental de frangos (Jones et al. 1989). Além disso, pode ser observada necrose dos folículos linfóides no baço uma semana após a inoculação (Vasconcelos et al. 2001b).

Apesar de observarmos lesões no pericárdio (Fig.1a,b), nenhum dos agentes (MS/ARV) foi detectado no tecido cardíaco pelo RIFI e PCR. Lesões no miocárdio e pericárdio é uma achado freqüente em infecção pelo ARV (Ni e Kemp 1995, Rosenberg & Olson 1997, Vasconcelos et al. 2001b), entretanto, não se descarta ação do MS nesses tecidos (Lockaby et al. 1998).

A ausência de lesões na Bursa de Fabricius (Quadro 2), também relatada por Vasconcelos et al. (2001b), pode estar associado ao período de infecção, pois é possível observar lesões na Bursa principalmente na primeira semana após a infecção pelo ARV, sendo mais severo na segunda semana da infecção (Ni & Kemp 1995).

O quadro clínico-anatomohistopatológico da infecção mista de frangos de corte por MS/ARV pode representar um problema sanitário, aumentando as perdas na produção. Com base nas lesões observadas e nos dados da literatura, sugere-se a associação concomitante por MS e ARV, considerando-se a possível ação sinérgica dos mesmos no agravamento das lesões.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Merial e Biovet S.A., pelo apoio à pesquisa realizada.

REFERÊNCIAS

- Bottino J.A. 2009. Reovirose (artrite viral), p.300-303. In: Revolledo L. & Ferreira A.J.P. (Eds), Patologia Aviária. Manole, Barueri.
- Cardoso A.L.S.P., Tessari E.N.C., Castro A.G.M., Kanashiro A.M.I. & Stoppa G.F.Z. 2006. Monitoria sorológica da Micoplasmose em plantéis de aves reprodutoras no Brasil através do teste de soroaglutinação rápida. Arqs Inst. Biológico, São Paulo, 73(1):23-26.
- Fan H.H., Kleven S.H. & Jackwood M.W. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 39:729-735.
- Giotto D.B., Zimmermann C.F., Cesco M.A.O., Borges Fortes F.B., Pinheiro D., Hiller C.C., Herpich J., Medina M., Rodrigues E. & Salle C.T. 2008. Impacto econômico de condenações post mortem de frangos de corte em um matadouro-frigorífico na região Sul do Brasil. Anais 35^o Conbravet, Gramado, RS. (Resumo)
- Jones R.C., Islam M.R. & Kelly D.F. 1989. Early pathogenesis of experimental *Avian reovirus* infection in chickens. Avian Pathol. 18:239-253.
- Jones R.C. & Georgiou K. 1984. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens the influence of age at infection. Avian Pathol. 13:441-457.
- Kibenge F.S.B., Jones R.C. & Savage C.E. 1987. Effects of experimental immunosuppression on reovirus-induced tenosynovitis in light-hybrid chickens. Avian Pathol. 16:73-92.
- Kleven S.H. 1997. *Mycoplasma synoviae* infection, p.220-225. In: Calnek S.W. (Ed.), Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Lauerman L.H. 1998. *Mycoplasma* PCR Assays: Nucleic Acid Amplification Assays for diagnosis of animal diseases. Department of Agriculture and Industries, Alabama. 150p.
- Lenz S.D., Hoerr F.J., Ellis A.C., Toivio-Kinnucan M.A. & Yu M. 1998. Gastrointestinal pathogenicity of adenoviruses and reoviruses isolated from broiler chickens in Alabama. J. Vet. Diagn. Invest. 10:145-151.
- Lockaby S.B., Hoerr E.J., Lauerman L.H. & Kleven S.H. 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. Vet. Pathol. 35:178-190.
- McManus J.F.A. & Mowry R.W. 1965. Staining methods: Histologic and histochemical. 3rd ed. Hoeber Medical Division Harper and Row, London. 423p.
- Moretti D.L. 2006. Monitoramento dos registros de condenação de frango de corte abatidos no SIF 2485, no período de 1995 a 2005: avaliação das series históricas e análises críticas. Dissertação de Mestrado em Ciência Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 201p.
- Moradian A., Thorsen J. & Julian R.J. 1990. Single and combined infections of specific-pathogen-free chickens with Infectious Bursal Disease Virus and an intestinal isolate of reovirus. Avian Dis. 34:63-72.
- Morrow C.J., Bell I.G., Walker S.B., Markham P.F., Thorp B.H. & Whithear K.G. 1990. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. Aust. Vet. J. 67:121-124.
- Nascimento E.R. 2000. Micoplasmoses, p.217-224. In: Berchieri Júnior A. & Macar M. (Eds), Doenças das Aves. FACTA, Campinas.
- Nascimento E.R. 2001. *Mycoplasma synoviae* em avicultura, implicações econômicas: conviver ou erradicar? Anais Conferência Apinco de Ciências e Tecnologia Avícolas, Campinas, SP, p.31. (Resumo)
- Ni Y. & Kemp M.C. 1995. A comparative study of *Avian reovirus* pathogenicity: Virus spread and replication and induction of lesions. Avian Dis. 39:554-566.
- Rosenberger J.K. & Olson N.O. 1997. *Orthoreovirus aviario* infections, p.639-647. In: Calnek B.W., Barnes H.J., Beard C.W., McDougald L.R. & Saif Y.M. (Eds), Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Savage C.E. & Jones R.C. 2003. The survival of *Avian reovirus* on materials associated with the poultry house environment. Avian Pathol. 32:419-425.
- Sentíes-Cué G., Shivaprasad H.L. & Chin R.P. 2005. Systemic *Mycoplasma synoviae* infection in broiler chickens. Avian Pathol. 34:137-142.
- UBA 2011. Relatório Anual 2010/2011. União Brasileira de Avicultura, São Paulo. 72p.
- Vasconcelos S.B.S., Bottino J.A., Guerra J.L. & Jerez J.A. 2001a. Lesões articulares em frangos de cortes (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo *Orthoreovirus aviario* aviário. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:80-83.
- Vasconcelos S.B.S., Bottino J.A., Guerra J.L. & Jerez J.A. 2001b. Lesões viscerais induzidas experimentalmente pela inoculação de uma amostra artrotrópica de reovírus em frangos de corte (*Gallus gallus*). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:84-87.
- Xie Z., Fadl A.A., Girshick T. & Khan M.I. 1997. Amplification of *Avian reovirus* RNA using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Dis. 41:654-660.