THIAGO SANCHES AGUIAR

RELAÇÃO DE DOADORAS INFECTADAS PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EMBRIÕES

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Coorientadora: Prof. Dra. Fabiana Forell

LAGES
2014

A282r

Aguiar, Thiago Sanches
Relação de doadoras infectadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina com a produção *in vitro* e *in vivo* de embriões / Thiago Sanches Aguiar – Lages, 2014.
70 p.: il.; 21 cm

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa
Coorientadora: Fabiana Forell
Bibliografia: p. 55-68
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Produção *in vitro de* embriões. 2. Rinotraqueíte infecciosa bovina. 3. Sanidade. I. Aguiar, Thiago Sanches. II. Costa, Ubirajara Maciel da. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do CAV/ UDESC

THIAGO SANCHES AGUIAR

RELAÇÃO DE DOADORAS INFECTADAS PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 E VÍRUS DA DIARREIA VIRAL BOVINA COM A PRODUÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE EMBRIÕES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
UDESC/Lages-SC

Membro: _____ _____
Prof. Dra. Fabiana Forell
UDESC/Lages-SC

Membro: _____
Prof. Dr. Maicon Gaissler Lorena Pinto
EPAGRI-SC

Lages, 15/12/2014.

A meus pais, **Cristiane W. Sanches de Lim**a e **José Pereira de Aguiar** *(in memorian),* pela oportunidade do fôlego da vida.

À **Luis Felipe de Nez** *(in memorian),* afinal amigos fiéis são como o sol, não precisam aparecer todos os dias para sabermos que existem.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Celestial por possibilitar força e coragem para que pudesse suportar e finalizar essa etapa da jornada.

Aos meus avós e padrinhos, João Miguel de Lima (meu exemplo de vida) e Maria Dolores Sanches de Lima, que me ensinaram de forma prática o que é o amor.

Aos meus dois irmãos, João Pablo e José Guilherme (Tião), a existência de vocês em minha vida deixa evidente o quanto Deus é benigno e maravilhoso.

Ao Professor, Ubirajara Maciel da Costa, pela orientação deste trabalho. Agradeço muito pela confiança, paciência e pela contribuição científica. Ainda por permitir-me a oportunidade de conclusão desta etapa tão importante na vida de um acadêmico que anseia a carreira de docência.

À Professora, Fabiana Forell, pela coorientação do trabalho, grandes contribuições realizadas no delineamento experimental, e bem como durante as rotinas laboratoriais, quando não presente, sempre a incomodava pelo telefone. Também Agradeço, principalmente pela amizade desenvolvida durante o período de trabalho.

Ao Professor, Cláudio Vieira de Araújo, pela realização da análise estatística dos dados deste trabalho.

A In Vitro, pela parceria desenvolvida na condução do experimento.

Aos Colegas de laboratório pela contribuição durante as rotinas.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

E a todos que acreditaram em mim, pois, me deram ânimo para suportar os momentos que vem a mente a ideia de desistência, os quais foram superados com determinação e esforço.

Até a tese de Doutorado!

RESUMO

AGUIAR, Thiago Sanches. **Relação de doadoras infectadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina com a produção *in vitro* e *in vivo* de embriões.** 2014. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

Este estudo avaliou a relação de doadoras da raça nelore infectadas pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina com a produção *in vitro* e *in vivo* de embriões e efeitos sobre a taxa de concepção de receptoras de embriões. O experimento foi realizado no município de Boca do Acre - AM (2013 - 2014). Foram utilizadas 150 vacas doadoras de embriões, as quais foram acasaladas com um único touro da mesma raça, Nelore, após a aspiração folicular das doadoras e posterior produção *in vitro* dos embriões, estes foram transferidos em receptoras, sabidamente livre do patógeno em questão. Foram coletadas amostras de líquido folicular de todas as doadoras individualmente e avaliadas quanto a presença de BoHV-1 via PCR (reação da polimerase em cadeia). Analisando os dados, observou-se uma prevalência de 14% (χ^2=77,76; p<0,001) de doadoras portadoras do vírus do BoHV-1 em ralação as vacas avaliadas (21/150). Não foi encontrado diferença significativa na produção média de oócitos, (positivas=20,48 (430/21); negativas=19,38 (2500/129), (avaliação realizada pelo teste de Kruskal-Wallis Test, k=0,0214; p=0,8837) e de embriões (positivas=7,67 (161/21); negativas=9,05 (1168/129), (k=1,5238; p=0,217), entre as doadoras. Avaliando a taxa de concepção entre as receptoras (N=1329) nas quais foram transferidos embriões (n=161) oriundos de doadoras positivas ou não (n=1168), para

BoHV-1. As receptoras que receberam embriões das vacas positivas tiveram uma taxa de prenhes de 39,13% (63/161), já as que receberam embriões de doadoras negativas, apresentaram uma taxa de 44,95% (525/1168), não diferindo significativamente entre si, (χ^2=1,9417, p=0,1635). Estes resultados não corroboram com a hipótese de que oócitos provenientes de doadoras infectadas pelo BoHV-1 apresentariam um menor desenvolvimento embrionário *in vitro* e uma menor taxa de prenhez quando da sua transferência para as receptoras de embriões.

Palavras-chave: Produção *in vitro de* embriões. Rinotraqueíte Infecciosa Bovina. Sanidade.

ABSTRACT

AGUIAR, Thiago Sanches. **List of donors infected with bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea virus production in vitro and in vivo embryos**. 2014. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

This study evaluated the relationship of nelore breed donor infected with bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and bovine viral diarrhea with *in vitro* and *in vivo* embryos and effects on conception rate of embryo recipients. The experiment was conducted in the municipality of Boca do Acre - AM (2013 to 2014). 150 cows were used as donors of embryos, which were mated with one of the same breed bull, Nelore, after aspiration of donors and subsequent *in vitro* production of embryos were transferred in to receptors, free of all pathogens in question. Follicular fluid samples from all donors were individually collected and evaluated for the presence of bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhea by PCR (polymerase chain reaction). Analyzing the data, there was a prevalence of 14% ($\chi 2$ = 77.76; p<0,001) of donor infected with BoHV-1 virus compared to the evaluated cows (21/150). There was not found to be significant difference in the average production of oocytes (positive = 20,48 (430/21); negative = 19,38 (2500/129) (evaluation by the Kruskal-Wallis Test, k=0,0214, p=0,8837) and embryos (positive =7,67 (161/21), negative = 9,05 (1168/129) (k = 1,5238, p=0,217), between donor. Assessing the rate of conception between the receiver (N = 1329) in which embryos were transferred (n=161) derived from

donors positive or not (n=1168), to bovine herpesvirus type 1. The receptors that received embryos from positive cows had a rate of pregnancy of 39,13% (63/161), while those who received negative embryo donors, had a rate of 44,95% (525/1168) did not differ significantly from each other, (χ2=1,417, p=0,1635). These results do not support the hypothesis that oocytes from donors infected with BoHV-1 present a minor in vitro embryo development and a lower pregnancy rate when transferred to the recipient embryo.

Key-words: In vitro production of embryos. Infectious bovine rhinotracheitis. Sanity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de doadoras da raça nelores portadoras do Herpesvírus Bovino Tipo 1(BoHV-1), em relação à produção de oócitos e embriões, Boca do Acre – AM, 2014.....50
Tabela 2 – Taxa de concepção de vacas utilizadas como receptoras de embriões oriundos de doadoras portadoras de Herpesvírus Bovino Tipo 1(BoHV-1), Boca do Acre – AM, 2014.....51

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	21
2	**REVISÃO DE LITERATURA.....**	24
2.1	PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES.....	24
2.1.1	**Seleção de doadoras e receptoras.....**	26
2.2	HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1)	28
2.2.1	**Etiologia.....**	29
2.2.2	**Epidemiologia.....**	30
2.2.3	**Patogenia.....**	32
2.2.4	**Sinais clínicos.....**	36
2.2.5	**Diagnóstico.....**	39
2.2.6	**Controle e profilaxia.....**	42
3	**OBJETIVOS.....**	44
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4	**MATERIAL E MÉTODOS.....**	45
5	**RESULTADOS.....**	50
6	**DISCUSSÃO.....**	52
7	**CONCLUSÃO.....**	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……	57

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil se tornou um dos maiores exportadores de carne bovina do mundo, sendo detentor do maior rebanho comercial bovino, com efetivo de 209,5 milhões de cabeças (ANUALPEC, 2013). Atualmente tem-se destacado no desenvolvimento científico e na aplicação comercial de biotecnologias, como inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vitro* de embriões (PIV). O país lidera a produção de embriões *in vitro*, sendo responsável por mais de 70% da produção mundial atual (STROUD, 2010), com isso tem-se aumentado a preocupação com o risco sanitário que possa estar envolvido pelo massivo uso dessas biotecnologias em propagar doenças de interesse agropecuário (WEBER *et al.*, 2013).

Apesar do grande avanço no número de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transferidos durante os últimos anos, o estabelecimento de prenhez em receptoras de embriões permanece com alta taxa de variação, com mortalidade embrionária oscilando entre 24-34% até a segunda semana de gestação (BERG *et al.*, 2010). Aproximadamente 37 a 50% das perdas gestacionais em bovinos produzidos *in vitro* estão associados com agentes infecciosos, como a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarréia viral bovina (BVD) e leptospirose (KHODAKARAM-TAFI *et al.*, 2005; MCEWAN *et al.*, 2005). Mais especificamente, o herpesvírus bovino-1 (BoHV-1), que provoca IBR é conhecido por prejudicar diretamente a função ovariana e qualidade embrionária (KELLING *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 1986). A soroprevalência para BoHV-1, *Leptospira* spp., e o BVDV, assim como a incidência de IBR, leptospirose, e BVD, são relativamente elevados em rebanhos de cria comerciais no Brasil (FLORES *et al.*, 2005; JUNQUEIRA *et al.*, 2006; TAKIUCHI *et al.*, 2001), o que sugere que as doenças

reprodutivas têm um importante efeito sobre a eficiência reprodutiva em rebanhos no Brasil.

Os agentes infecciosos presentes no trato reprodutivo dos bovinos podem reduzir o número e a qualidade dos embriões produzidos, (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000). Dentre os agentes, o Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) é um patógeno de grande importância, em virtude de ser responsável por perdas econômicas substanciais em todo o mundo (MACLACHLAN *et al.,* 2011). Segundo Gibbs *et al*. (1977) provoca predominantemente doença do trato respiratório e genital em bovinos, embora também possa ser associado com meningoencefalite. Este vírus têm sido responsável por falhas na reprodução, como, morte embrionária precoce e abortos, que representam provavelmente as perdas mais significativas ligadas ao BoHV-1 (ENGELS *et al*., 1996; DEJUCQ *et al*., 2001).

Estudos anteriores demonstraram que o BoHV-1 pode estar presente no material biológico utilizado nos sistemas de PIV (VANROOSE *et al*., 2000), incluindo neste conjunto, a sua presença em fluído folicular e nos oócitos (BIELANSKI *et al*., 1993). O risco de transmissão do BoHV-1 pela produção *in vitro* de embriões deve ser determinado, uma vez que este vírus pode estar presente em animais aparentemente saudáveis (FENNER, 1993).

Em consequência observa-se uma necessidade de elucidar a relação entre a técnica de produção *in vitro* de embriões no que diz respeito a transmissão de doenças infecciosas, notadamente as potencialmente responsáveis por perdas reprodutivas, bem como o estudo da interação entre os embriões e os microrganismos patogênicos (KOZASA *et al.*, 2011).

No Brasil, BoHV-1 teve seu primeiro isolamento, em 1978, a partir de um caso de vulvovaginite na Bahia (ALICE, 1978). Diversos relatos confirmam a ampla distribuição viral em nosso País. Levantamentos revelam variações entre 8-82%

de prevalência da infecção em diversas regiões brasileiras. Dessa forma acredita-se que uma parcela muito pequena do rebanho bovino nacional esteja livre desse agente infeccioso (Dias *et al.*, 2008).

Segundo Flores, (2003) entre os métodos de diagnóstico, a detecção de DNA viral em amostras biológicas por PCR (reação da polimerase em cadeia) também pode ser utilizada, apresentando as vantagens de rapidez, especificidade e sensibilidade. Esta técnica, no entanto, tem aplicação restrita para o diagnóstico de infecções agudas pelo BoHV-1. Possui aplicação importante na detecção da infecção latente, quando a presença do DNA viral nos sítios de latência pode ser o único meio indicativo da infecção.

O objetivo do presente estudo foi detectar a presença de agentes virais em líquido folicular provenientes de vacas da raça Nelore utilizadas como doadoras de oócitos para produção de embriões *in vitro*, utilizando como método de diagnóstico a reação em cadeia da polimerase (PCR) e relacionar a presença dos vírus com a taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro*, taxa de concepção das vacas utilizadas como receptoras dos embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A produção *in vitro* de embriões (PIV), refere-se à manipulação dos gametas e a obtenção de embriões em laboratório, ou seja, fora do organismo materno. Essa biotécnica envolve recuperação de oócitos e cultivo embrionário por sete dias, quando então os embriões são transferidos para as receptoras (inovulados) as quais levam a gestação a termo (PALMA, 1993).

A PIV inicialmente resumia-se na FIV (*fecundação in vitro*), que foi originalmente desenvolvida como uma ferramenta para o estudo dos aspectos morfológicos e fisiológicos do processo de fecundação e, posteriormente, para resolver casos de infertilidade, principalmente em humanos. A primeira demonstração conclusiva de FIV, resultando no nascimento de um produto, foi realizada em coelhos em 1959 (CHANG, 1959). Desde então, essa técnica foi desenvolvida para várias espécies de mamíferos. Após o nascimento do primeiro bezerro produzido por FIV (BRACKETT *et al*., 1982), em que oócitos maduros foram cirurgicamente removidos dos ovários, fecundados e cultivados *in vitro* até o estágio de quatro células, avanços consideráveis foram obtidos. A primeira prenhez produzida pelo procedimento totalmente *in vitro* foi relatada por Lu *et al*. (1987).

Entretanto, somente com o desenvolvimento da técnica de aspiração transvaginal de oócitos, guiada por ultrassom (OPU) e sua adaptação para bovinos, em 1988 (PIETERSE *et al*., 1988), é que essa biotécnica teve impulso considerável e passou a ser utilizada comercialmente. Na última década, a PIV em bovinos tornou-se importante ferramenta comercial para o melhoramento genético do rebanho, sendo amplamente utilizada para esse fim (RODRIGUES *et al.*, 2000). Com o objetivo de incremento no aproveitamento dos oócitos,

pesquisas no âmbito das biotecnologias reprodutivas procuram desenvolver sistemas cada vez mais eficientes visando uma maior produção de embriões viáveis (VAN DE VELDE *et al.*, 2000). Neste sentido, várias pesquisas veem sendo desenvolvidas a fim de propiciar condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* mais adequados (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002).

Segundo van Wagtendonk-de Leeuw A.M. (2006), as limitações da técnica ainda são grandes, sendo que a eficiência relativa ainda é baixa, se considerar desde a obtenção dos oócitos até o nascimento de produtos viáveis, a eficiência global da PIV não ultrapassa 10%. Além disso, após a transferência, as taxas de gestação de embriões PIV variam de 30 a 40% (PETERSON, 2003; PONTES *et al*., 2009; SIQUEIRA *et al*., 2009).

Não são conhecidas com exatidão as verdadeiras causas dessa ineficiência, todavia, é conhecido que agentes infecciosos possam contribuir para prejuízos neste sistema de produção. Tendo como base, o que foi proposto por Stringfellow e Givens (2000), de que os riscos de um agente patogénico causar danos ao embrião são dados por uma sequência de eventos resumidos a partir de um ponto de vista epidemiológico, ou seja: a) a exposição dos embriões aos agentes patogénicos; b) a associação permanente do patógeno com o embrião; c) a manutenção da infecciosidade do patógeno durante a manipulação e processamento do embrião e d) garantia de uma dose infectante do patógeno para o receptor susceptível. Mais estudos devem ser conduzidos para avaliar os danos reais ocasionados por agentes em rebanhos comerciais utilizados em sistemas de PIV.

Segundo Viana *et al.*, (2007), em bovinos, uma das principais limitações da eficiência reprodutiva e do melhoramento genético tem sido o grande intervalo entre gerações. Nas últimas décadas, as biotecnologias de reprodução assistida têm contribuído para minimizar este

problema, e dentre elas a PIV destaca-se principalmente pelo melhor custo-benefício em relação às demais técnicas existentes no mercado atual. Agregados a isso, ainda pode-se, maximizar a rentabilidade de um animal geneticamente superior, aumentando o número de seus descendentes, diminuindo o uso intensivo de hormônios utilizados em programas de superovulação, e ainda tem-se a possibilidade de aproveitar animais pouco responsivos à superovulação, o que por sua vez maximiza a utilização do sêmen, com prévio planejamento dos acasalamentos (SANTOS *et al.*, 2008). Uma peculiaridade muito relevante é a possibilidade de aplicá-la em diversas fases reprodutivas da fêmea bovina: novilhas pré-púberes, vacas cíclicas, vacas gestantes, pós-parto, vacas senis, e em animais que, por ventura, venham à óbito e tenham os ovários transportados para o laboratório para recuperação dos oócitos (VIANA *et al.*, 2007).

2.1.1 Seleção de doadoras e receptoras

A seleção de doadoras de oócitos deve ser baseada em critérios que busquem a multiplicação e difusão de produtos geneticamente superiores e clinicamente saudáveis. Esses critérios são: valor genético para as doadoras, de boa performance reprodutiva e produtiva, livres de alterações raciais e doenças hereditárias, condições nutricionais intermediárias, pois é conhecido que os extremos prejudicam os resultados da reprodução (SANTOS *et al*., 2008), um outro ponto importante é o aspecto sanitário, onde os esquemas de imunizações tanto para doadoras quanto para receptoras devem ser elaborados de acordo com as condições de cada região. No que tange as receptoras, devem ser animais de conhecida habilidade maternal e de porte físico adequado para a genética do embrião que irá receber e posteriormente conceber.

Com relação a avaliação do mérito animal os criadores e veterinários possuem uma gama de ferramentas, em que o

Brasil novamente em termos de gado de corte é referência mundial. A existência dos programas de melhoramento genético animal no país auxilia muito esta avaliação, dentre estes programas podem ser mencionados o Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore, que no início estava sob a coordenação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e hoje com a ANCP (Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores), o Programa Nacional de Melhoramento Genético de Zebuínos, coordenado pela ABCZ (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu), o Programa de Melhoramento Genético coordenado pelo grupo GENSYS (com uma vertente somente para taurinos), e outros grupos que têm sido formados principalmente após o lançamento do Certificado Especial de Produção (CEIP). Além dos programas acima o uso atual da genômica, onde ao nascimento do animal já é possível aferir seu mérito genético com uma maior acurácia, facilita muito estas avaliações quando comparado somente com o uso de ferramentas estatísticas baseadas no parentesco.

Contudo, com relação ao status sanitário, pouco ou quase nada é feito neste sentido nos sistemas comerciais, não se tem hoje um protocolo a ser realizado quanto a padronização de avaliações de enfermidades que possam causar danos ao sistema de produção para aplicação prática em doadoras e receptoras, o que deve ser desenvolvido pelas instituições de pesquisa relacionadas com o assunto. A principal instituição mundial vinculada com está biotécnica, a IETS, descreve os procedimentos de gestão de risco que devem ser seguidos para garantir a segurança das vacas utilizadas como receptoras, as quais iram receberam os embriões produzidos *in vitro* (International Embryo Transfer Society, 2009). O primeiro passo crucial é o exame clínico completo da doadora, para assegurar a ausência de doenças infecciosas. Como apontado por Wrathall, (1995), a segurança do sêmen utilizado não deve ser esquecida, uma vez que estudos mostraram que os

espermatozóides de touros infectados são portadores do BoHV-1 (ROCHA *et al*., 1998)

Thibier e Guérin (1993) descrevem uma sequência de riscos envolvendo agentes infecciosos no processo de produção de embriões *in vitro*. Estes riscos estão relacionados com os seguintes aspectos: a) a vaca utilizada como doadora de oócitos e/ou o modo de coleta se for oriundo de ovários de abatedouro (frigorífico); b) o processo de maturação dos oócitos (MIV); c) a etapa de fertilização dos oócitos (qualidade sanitária do sêmen e do botijão de armazenamento); d) Cultivo das estruturas fertilizadas (CIV) (desenvolvimento *in vitro*); e) quando utilizado, a etapa de criopreservação e f) última etapa, que é transferência dos embriões para as receptoras.

A saúde da vaca doadora é muito importante para o sucesso dos programas de PIV, pois, o primeiro ponto de interação é o que ocorre entre os oócitos e o ambiente folicular (células circundantes do oócitos e o fluido folicular). Uma vez que a contaminação de oócitos com vírus, BoHV-1 (IBR/IPV), segundo Stringfellow *et al*., (2004) é comum, e que os vírus podem aderir à zona pelúcida dos oócitos, e isso pode se complicar pelo fato de que esses vírus muitas vezes resultam em infecções assintomáticas, logo, uma atenção especial deve ser dada a este patógeno.

2.2 HERPESVIRUS BOVINO TIPO 1 (BHV-1)

O Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) tem atraído a atenção mundial desde que foi relatado pela primeira vez como agente da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) em gado leiteiro na Califórnia, EUA, em 1953 (YATES, 1982). Sendo que no Brasil, foi descrito a primeira vez na região nordeste e sudeste, a saber, nos estados da Bahia e São Paulo (ALICE 1978).

A etiologia viral foi demonstrada, em 1928, (MUYLKENS et al., 2007), ao conseguirem filtrar o agente

infecioso e reproduzir a doença venérea. Inicialmente, a infeção se restringia ao sistema reprodutor. Em meados do século 20, uma enfermidade que acometia o sistema respiratório se espalhou pela América do Norte. Esse tipo mais severo de infecção por BoHV-1 foi chamado de rinotraqueíte infeciosa bovina (IBR). A doença se disseminou rapidamente pela Europa pela importação de animais leiteiros da América do Norte (YATES, 1982).

2.2.1 Etiologia

BoHV-1 é um dos herpesvírus isolados de bovinos naturalmente infectados. Essa espécie viral faz parte da subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, formada por vírus caracterizados por possuírem grande número de hospedeiros, ciclo replicativo curto e habilidade de induzir infecção latente (MUYLKENS *et al*., 2007).

Esses vírus têm sido associados com diversas manifestações clínicas em bovinos, IBR, vulvovaginite pustular/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortamentos e infeção generalizada em neonatos.

BoHV-1 pode ser subdividido em três diferentes genótipos baseados em características antigênicas: 1.1 (refere-se a amostras clássicas associadas a IBR e também associados com abortamentos); 1.2a (este tem alta prevalência no Brasil, sendo associado principalmente com IVP/IPB, abortamentos e também com infeções do trato respiratório); 1.2b (este é associado com doença respiratória branda e com IVP e IPB, mas ainda não foi relacionado com abortamento (EDWARDS *et al*., 1990). BoHV-1.3, que é um agente neuropatogênico, foi reclassificado como o BoHV-5 (METZLER *et al.*, 1985). Os subtipos BoHV-1.2 são menos virulentos do que o subtipo 1.1.

O vírus BoHV-1 é pleomórfico, com um diâmetro que varia de 120 a 200 nm (SCHWYZER e ACKERMANN, 1996). O vírus de BoHV-1 é resistente às influências ambientais. A

inativação do vírus no meio ambiente depende fatores como a temperatura, pH, luz, humidade e tipo de meio portador do vírus (GIBBS e RWEYEMAMU, 1977). O vírus é sensível a muitos desinfetantes e é prontamente inativado 0,5% de NaOH, 0,01% de $HgCl_2$, 1% de cal clorada, 1% derivados fenólicos, 1% de amónia quaternária e 10% solução de Lugol. A formalina (5%) inativa o BoHV-1 dentro de 1 min (STRAUB, 1991).

BoHV-1 está relacionado na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE (World Organisation for Animal Health), que inclui doenças transmissíveis que são consideradas de impacto socioeconômico dentro dos países e que são significativas para o comércio internacional de animais e produtos de origem animal (TURIM e RUSSO, 1999).

De acordo com dados da OIE, BoHV-1 é distribuído em todo o mundo, mas foi erradicada na Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia, Itália (Província de Bolzano), Suíça e Noruega, e programas de controle estão em vigor em outros países, incluindo Austrália, Bélgica, Canadá, Índia, Polônia, Turquia e EUA (OIE, 2010).

2.2.2 Epidemiologia

Segundo Ackermann e Engels (2006), o BoHV-1 é um microrganismo cosmopolita, mundialmente disseminado, apresentando diferenças significativas na incidência regional e na prevalência, de acordo com a localização geográfica e manejo reprodutivo. Baseado em levantamentos sorológicos, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar fatores de risco para soropositividade para BoHV-1. Muitos desses fatores são bem caracterizados: idade, sexo (macho são mais frequentemente positivos do que fêmeas) e tamanho do rebanho. O contato direto entre animais, como feiras agropecuárias, também é um importante fator de risco.

Em um estudo conduzido por Van Schaik *et al*. (1998) na Holanda, concluíram que a aquisição de animais para fins de reprodução foi identificada como fator de risco para infecção por estudo de análise de regressão múltipla, mostrando que as fazendas nas quais a prática de compra de animais era frequente, tinha uma chance de 3,5 vezes maior de terem animais positivos do que as fazendas que não a fazia. Os principais fatores que vêm contribuindo para a difusão desses microrganismos são a introdução nos rebanhos de animais oriundos de leilões ou de importações, sem exigências sanitárias necessárias para prevenir a infeção, a crescente utilização de confinamentos para engorda de animais, a não-obrigatoriedade do controle virológico do sêmen comercializado no País e, principalmente, a falta de informação dos criadores, das autoridades e veterinários sobre esses agentes virais.

De acordo com Ackermann e Engels (2006), o vírus pode, ainda, estar presente no sêmen de touros infectados, podendo ser disseminado tanto por monta natural como por inseminação artificial, ou através da fertilização *in vitro*. A infecção de fêmeas soronegativas gestantes, com amostras virais de alta virulência, pode resultar em abortos, que ocorrem principalmente entre o quinto e oitavo mês da gestação. Os abortos ocorrem geralmente após um período de incubação de três a seis semanas, durante o qual o vírus alcança o feto durante a viremia. Até 25% das fêmeas em gestação de um rebanho podem abortar durante um surto, constituindo-se em uma importante causa de perdas econômicas nas criações de bovinos.

Em um trabalho conduzido no ano de 2013 por Dias *et al*. (2013), mostraram uma observação relevante do ponto de vista epidemiológico, ou seja, em fazendas que fazem o uso de pasto maternidade, a chance de ter contaminação é de 1,56 vezes maior que as que não utilizam tal manejo, pois, sabe-se que durante o parto os animais encontram-se em

imunossupressão fisiológica, situação está propicia para que animais com infecções latentes possam sofrer reativação do vírus e então excretar o vírus no meio ambiente. Este mesmo trabalho, no qual foram avaliados mais de 14 mil animais por sorologia, revelou alta prevalência de BoHV-1 nos animais avaliados, ou seja, 71.3% (95% CI: 69.3–73.3), mostrando que o vírus está amplamente distribuído em todas as regiões do Estado, avaliado que no caso foi o Paraná. A aquisição de animais durante o período de incubação, ou mesmo durante as fases agudas ou latentes da infecção pelo BoHV-1, é descrita como fator relevante na contribuição para a introdução da infecção em um rebanho livre (MSOLLA *et al*., 1981; PASTORET *et al*., 1982).

A presença de portadores latentes é de fundamental importância para a manutenção do agente em uma população bovina. A reativação viral e a infecção de novas gerações de animais pode ocorrer ao nascimento, na cópula, durante o transporte ou após a introdução de novas matrizes no grupo de vacas leiteiras. A detecção de anticorpos específicos para BoHV-1 é a base para a identificação dos portadores e essa é a chave para o sucesso do programa de controle. A capacidade do BoHV-1 infectar outras espécies, como?, quais? é mais um entrave para sua erradicação (DIAS *et al*., 2013).

2.2.3 Patogenia

Após um período de incubação de 2 a 4 dias, tornam-se evidentes os seguintes sintomas, corrimento nasal seroso, salivação, febre, inapetência e depressão. Dentro de alguns dias as descargas nasais e oculares tornam-se mucopurulenta. Em rebanhos onde os acasalamentos são feitos via monta natural, a infecção genital pode levar a vulvovaginite ou balanopostite, Dias *et al.* (2013) ao avaliar os fatores predisponentes concluiu que em fazendas que utilizam a monta natural, a chance de contaminação aumenta 1,48 vezes (1,02-2,14). Algumas

infecções podem não expressar sinais clínicos (VAN OIRSCHOT *et al.*, 1996).

BoHV-1 inicia sua infecção após três passos. A primeira interação envolve afinidade entre as proteínas virais e os receptores celulares. Esse passo é seguido por uma ligação estável com receptores celulares específicos. Após essa fase, a penetração viral na célula ocorre pela fusão do envelope viral coma membrana plasmática celular. Subsequentemente, o vírus entra no citosol celular. As partículas de BoHV-1 são transportadas para o núcleo, permitindo sua replicação (ACKERMANN *et al*., 1982). A porta de entrada de BoHV-1 é a mucosa do trato respiratório superior ou do trato genital. A infecção também pode ocorrer por inoculação no epitélio conjuntival. A principal via de transmissão é a direta, entre narinas. No entanto, a transmissão aerógena por aerossóis pode ocorrer entre distâncias curtas. A infeção genital direta requer contato ou cópula, porém também pode ocorrer por meio de inseminação ou fertilização com sêmen contaminado com o vírus. Estudos comprovam a resistência do agente ao congelamento (BIELANSKI *et al.*, (1993); BIELANSKI e DUBUC, 1994).

Segundo MARS *et al*. (1999), em consequência dessa predisposição por tecidos epiteliais, a mucosa da boca, da região do muflo e vias respiratórias internas, genital e ocular tornam-se as principais vias de entrada dos vírus nos bovinos.

Uma vez dentro das células epiteliais, a fase lítica de replicação de BoHV-1 se inicia. Esta corresponde a expressão sequencial de genes virais e da consequente produção de nova progênie viral e morte celular. O efeito citopático (ECP) é caracterizado pelo abaulamento celular e pelo aparecimento de inclusões intranucleares. A morte celular ocorre por processos de apoptose e necrose durante o ciclo replicativo. Além do efeito citopático direto, BoHV-1 também pode reduzir a reparação do epitélio respiratório, pela inibição da migração de

novas células epiteliais nas áreas afetadas (WEIBLEN *et al.*, 1991; ROEHE e EDWADS, 1994).

A infecção natural por BoVH-1 resulta na produção viral massiva na porta de entrada. A nova progênie de vírus se difunde no muco nasal sendo excretada e é responsável pela rápida disseminação da infeção no rebanho. Os novos vírus também se espalham no organismo do hospedeiro por disseminação local ou disseminação sistêmica por viremia e, eventualmente, por neuroinvasão (JONES *et al.*, 2011). Dois caminhos diferentes são responsáveis pela disseminação de BoHV-1 na mucosa infectada. Inicialmente, os vírus expressam partículas no envelope capazes de interagir com os receptores das células susceptíveis. Por outro lado, as partículas virais podem migrar das células infectadas para as adjacentes não-infectadas (infecção direta célula a célula). Esse caminho é vantajoso porque a disseminação ocorre mesmo com a presença de anticorpos neutralizantes no meio extracelular (DENIS *et al.*, 1994).

BoHV-1 pode se difundir no hospedeiro por viremia, conseguindo o acesso para um grande número de tecidos e órgãos, causando outras manifestações clínicas, como exemplo, abortamentos em vacas prenhas e infeção sistêmica fatal animais jovens soronegativos. Durante a replicação primária nas superfícies mucosas, BoHV-1 pode infectar neurônios via terminações nervosas das mucosas e ascender até o sistema nervoso central (SNC). A mucosa da orofaringe possui terminações de pelo menos seis nervos, sendo os nervos olfatório e trigêmeo os principais caminhos da neuroinvasão viral no SNC. Sendo então esporadicamente isolado de bovinos com desordens no SNC, muitos desses isolados são responsáveis por meningoencefalite aguda (DISPAS *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2011).

Bovinos são capazes desenvolver uma resposta imune eficiente após a infeção primária por BoVH-1, seguida, em muitos casos, de recuperação da doença e parada na excreção viral. No

entanto, isso é controverso, pois bovinos desenvolvem infeção latente. Dessa forma, alguns pesquisadores especulam que essas estratégias de evasão facilitam o estabelecimento de infecção persistente (BABIUK *et al.*, 1987; BROWN *et al.*, 1998). Após a infecção primária por BoHV-1, os bovinos podem tornar-se portadores latentes. O vírus estabelece latência nos neurônios sensoriais do sistema nervoso periférico após replicação na mucosa. Ele penetra nas terminações dos nervos distribuídas no epitélio infectado. Os vírus, então, são transportados através de microtúbulos dos axônios para alcançar o corpo dos neurônios nos gânglios nervosos (JONES *et al.*, 2011).

A reativação da infecção pode ocorrer após exposição a estímulos naturais ou tratamento com corticosteroides, culminando na transmissão viral para animais não infectados geralmente sem sinais clínicos (WINKLER *et al.*, 2000). Uma vez reativado nos neurônios dos gânglios regionais, BoHV-1 inicia um novo ciclo de replicação. A progênie viral alcança o sítio primário da infecção por meio dos axônios. No epitélio pode ou não haver reexcreção viral (PASTORET *et al*., 1982). Dois fatores podem influenciar a reexcreção do vírus: o estado imunológico e o fenótipo da progênie viral. A resposta imune primária obtida após a exposição natural ao BoHV-1 ou ao esquema vacinal tem habilidade para um controle efetivo da reexcreção viral. A resposta imune secundária reforçada por sucessivos estímulos também é efetiva para inibir a reexcreção do vírus (JONES *et al.*, 2011). No entanto, quando o estímulo para a reativação ocorre nos dois primeiros meses após a primo-infecção não se espera que o sistema imune consiga inibir a reexcreção. Animais com altos títulos de anticorpos neutralizantes contra BoHV-1 antes da reativação poderão não reexcretar o vírus. Já o fenótipo da progênie viral tem influência na habilidade para o vírus ser reexcretado (ACKERMANN *et al*., 1982).

Conhecida como a principal fonte de infecção do BoHV-1 a espécie bovina tem como principal via de eliminação as secreções respiratórias, oculares e genitais (muco prepucial e muco vaginal) e o sêmen de animais infectados. Os animais de todas as idades podem apresentar títulos de anticorpos contra o BoHV-1, porém, segundo Dias et al., 2013, tem-se uma maior prevalência em animais com idade superior a 24 meses. O período de incubação do BoHV-1 varia entre 1 a 4 dias, e os maiores títulos virais são produzidos e excretados no estágio agudo da infecção (ENGELS e ACKERMANN, 1996). Surtos da doença podem aparecer quando animais portadores são introduzidos em rebanhos soronegativos susceptíveis (GUSTAFSON, 1981).

O aborto é uma consequência da infecção respiratória por BoHV-1 em vacas soronegativas. Após um período de viremia o BoHV-1 atravessa a barreira materno-fetal desencadeando a infecção fetal (OWEN *et al*., 1964). A via pela qual o BoHV-1 vai da placenta para o feto é desconhecida mas uma vez que as lesões virais são consistentemente observados no fígado do feto, acredita-se que este transito ocorra provavelmente através da disseminação hematogênica via veia umbilical. Embora as lesões sejam observadas na placenta e em diversos órgãos fetais, foi sugerido que a degeneração placentária seria secundária à morte fetal (GRAHAM, 2013).

Durante o período febril as prostaglandinas também podem estar elevadas, levando a luteólise e à perda da gestação (VANROOSE *et al.*, 2000).

2.2.4 Sinais Clínicos

A severidade da doença causada por BoHV-1 é influenciada por diversos fatores, como a virulência da cepa, os fatores de resistência do hospedeiro, especialmente a idade, e o potencial para ocorrer infecção bacteriana secundária

(VANROOSE *et al.*, 2000). Infecções subclínicas por BoHV-1 são comuns. Diversas cepas demonstram pouca habilidade para induzir sinais clínicos e são caracterizadas como fracamente virulentas. A imunidade colostral protege animais infectados de apresentarem sinais clínicos. A forma clássica da IBR é caracterizada por pirexia (40,5-42°C), inapetência, aumento da frequência respiratória, dispneia, tosse severa persistente, depressão e severa queda na produção de leite em vacas leiteiras. Em decorrência da grande resposta inflamatória e dos danos causados no epitélio observa-se, mucosa nasal vermelha (nariz vermelho/*red nose*) descarga nasal de serosa a mucopurulenta e, em casos mais graves, tosse e dificuldade respiratória. Sinais oculares como conjuntivite e secreção mucopurulenta são comuns. (RIET-CORREA, 1996).

Após a inoculação intranasal em bovinos soronegativos, há o desenvolvimento de febre de 41ºC por 4 a 5 dias, que pode ser acompanhada de apatia e anorexia. A morte não é comum na doença sem infecções secundárias, no entanto, doenças intercorrentes podem agravar muito o quadro clínico do animal podendo leva-lo a óbito. Em 10% dos animais afetados ocorre perda de condição corporal e a pneumonia é uma sequela (GIBBS E RWEYEMAMU, 1977). A forma ocular pode ocorrer em conjunto com a forma respiratória ou como entidade clínica distinta, manifestando como severa conjuntivite (BOTELHO, 2000).

Os nomes dados para as doenças que afetam a vaca (vulvovaginite pustular infecciosa – VPI) e o touro (balanopostite pustular infecciosa – BPI) descrevem claramente o quadro clínico observado na infecção primária. Com essa forma de IBR, as fêmeas apresentam discreta elevação de temperatura corpórea e descargas vaginais leitosas (WYLER *et al.*, 1990). A cauda permanece elevada e em constante movimento. A vulva dos animais pode apresentar a mucosa hiperêmica e com pústulas. Essa sintomatologia dura aproximadamente duas a três semanas. Nos machos pode

ocorrer, inflamação do prepúcio com produção de secreções, e o pênis pode conter pústulas. Quadros mais severos, restritos ao aparelho reprodutor podem levar para orquite no touro e endometrite na vaca (LEMAIRE *et al.*, 1994).

Segundo Riet-Correa, (1996), o abortamento é consequência da infecção por BoHV-1, por via respiratória, em vacas soronegativas. Ele ocorre comumente entre o quarto e oitavo mês de gestação, porém a inoculação parenteral de vírus pode induzir morte do embrião com três meses. Através da viremia, o agente infeccioso consegue ultrapassar a barreira materno-fetal e produzir infecção letal no feto. Bezerros neonatos podem desenvolver infecção sistêmica após se infectarem congenitamente antes do nascimento ou logo no pós-parto. Animais privados de colostro apresentam grande risco de infecção. Salivação excessiva e diarreia são consequências da replicação viral no epitélio do sistema digestivo. Graves lesões são observadas no trato digestivo, como glossite, esofagite e necrose ruminal aguda. A morte acontece após 4 a 5 dias.

Chirstianson (1992), afirma que o estresse gerado no animal devido ao pico febril poderia levar, indiretamente, à perda embrionária pela elevação da concentração de esteróides, causando a supressão da resposta imune. Wyler *et al*. (1990) relatam que vacas prenhes soronegativas, quando infectadas com o BoHV-1 podem abortar após o período de incubação de três a seis semanas, principalmente durante o 5º ao 8º mês de gestação.

O aborto pode ocorrer após a exposição natural à doença, o vírus se replica no trato respiratório superior e começa a disseminar-se pela via sanguínea podendo migrar para o útero de vacas gestantes. No útero, o feto pode ser infectado em qualquer estágio da gestação. O feto morre de um a três dias após ter início a replicação viral, e o aborto ocorre dois a sete dias após a morte fetal. Um estudo avaliou o possível efeito em um rebanho com perfil sorológico de alta

taxa de infecção para o BoHV-1 e demonstrou índices reprodutivos baixos durante a estação de monta, e índice de abortamento de 16% (35/208) (JUNQUEIRA *et al*., 2006). Já Norton *et al*. (1989) em sete rebanhos com perfil sorológico de baixa taxa de infecção para o BoHV-1, demonstraram taxas anuais de aborto que variaram de 3 a 21%.

2.2.5 Diagnóstico

Nandi *et al*. (2009) retrataram que o diagnóstico clínico é praticamente impossível, visto que os sintomas apresentados pela infecção por BoHV-1 cursarem com a sintomatologia clínica de outros agentes, devendo inclusive proceder com diagnóstico diferencial, principalmente no caso da forma respiratória que deve ser diferenciada das pneumonias causadas pelo vírus sincicial bovino e parainfluenza-3, assim como das broncopneumonias bacterianas secundárias. A conjuntivite deve ser diferenciada de infeções oculares por *Moraxella bovis*. Já a forma reprodutiva deve ser diferenciada de abortamentos por *Leptospira* spp. e *Brucella* spp., e vírus da diarreia viral bovina. Sendo assim, o histórico da propriedade, os sinais clínicos e as lesões dos animais permitem apenas o diagnóstico presuntivo da enfermidade. A confirmação da suspeita clínico-patológica deve ser firmada com base em exames laboratoriais (OBANDO *et al.*, 1999).

Segundo a OIE, (Manual Terrestre - 2010) o diagnóstico pode ter como base a etiologia (virológico ou molecular) ou sorológico. Durante a fase aguda das infecções, devem ser realizados testes para detecção viral, antígenos ou DNA do agente em amostras clínicas. Estas amostras são: *swabs* nasais ou oculares, vaginais, prepuciais ou de áreas que apresentam lesões, tecidos (traquéia, pulmões) e fetos inteiros abortados ou tecidos fetais (pulmões, fígado e rins). As amostras devem ser remetidas em caixas de isopor contendo gelo, com a maior rapidez possível. Não é recomendado congelar, pois a

temperatura de congelamento (aproximadamente menos 20ºC) pode inativar o vírus (ALFIERI *et al.*, 1998).

O diagnóstico virológico é realizado com base na identificação do vírus sobre secreções ou tecidos contaminados via testes como imuno-histoquímica, ou Imunoflorescência direta (IFD), que é uma técnica rápida, realizada com anticorpos específicos, em cortes, impressões de tecidos ou esfregaços de secreções. O resultado pode ser obtido dentro de uma a duas horas, sendo o fator limitante do sucesso destes testes, o número de partículas virais presentes nos tecidos avaliados (ROEHE *et al.*, 1997).

O isolamento em cultivo celular é considerado a prova ouro (g*olden standard*) no diagnóstico do BoHV-1, sendo utilizada para avaliar outros métodos de diagnóstico, porém é um método muito moroso, levando de 14 a 28 dias para conclusão de um diagnóstico. Para sua realização, são utilizadas células de rim, pulmão ou testículo bovino, células de pulmão fetal bovino, traquéia ou células de linhagens estabelecidas, como a Madin-Darby Bovine kidney (MDBK) que são células permissíveis ao vírus (TAKIUCHI et. al., 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Suspensões de tecidos ou secreções de animais clinicamente infectados podem ser preparadas e inoculadas em culturas celulares com o intuito de isolar o vírus, todavia, as partículas virais devem estar viáveis. BoHV-1 produz ECP em diversos tipos de culturas celulares. ECP pode ser observado entre 24-72 horas após a inoculação. O material só é considerado negativo após duas ou três passagens sem o aparecimento de alterações nas células. Se houver ECP compatível com herpesvírus, a confirmação do agente será dada com o uso de IFD ou imunoperoxidase (IPX), utilizando-se anticorpos monoclonais ou conjugados apropriados (ROEHE *et al.*, 1997).

O diagnóstico sorológico pode ser feito após duas coletas de soro, uma na fase aguda e a segunda duas a três semanas após. Segundo o manual da OIE, um aumento de quatro vezes

no título de anticorpos entre as duas coletas é indicativo da infeção e pode confirmar o diagnóstico. Em fêmeas prenhes, é conveniente fazer uma coleta de soro antes da gestação e mantê-la congelada. Caso haja o aparecimento de problemas reprodutivos, uma nova coleta após o aparecimento de sinais clínicos deverá ser realizada, e ambas as amostras deverão ser submetidas ao laboratório devidamente identificadas. As técnicas sorológicas mais utilizadas são o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a soroneutralização (SN). Deve-se ressaltar que esses testes não diferenciam infeções por BoHV-1 e HoVH-5. O diagnóstico sorológico dá suporte à investigação clínica e também aos inquéritos epidemiológicos, certificação de rebanhos e triagem de reprodutores destinados a coleta e comercialização de sêmen. A detecção de anticorpos anti-BoHV-1 indica a condição de portador, com exceção de anticorpos vacinais (WYLER *et al.,* 1990; ALFIERI *et al.,* 1998; TEIXEIRA *et al.,* 2001).

A PCR, técnica que tem por objetivo à amplificação de uma região específica do DNA viral, é o mais sensível teste disponível, e consiste numa prática alternativa para a detecção rápida do vírus (MOORE *et al*., 2000). O resultado fica disponível no prazo de 12h, em comparação com o isolamento do vírus via cultivo celular, onde requer vários dias. O vírus pode ser detectado em amostras coletadas na região nasal 14 dias após a infecção experimental. Através da PCR também é possível fazer a detecção do vírus em amostras de sangue, sêmen, fetos e entre outros meios (FUCHS *et al*., 1999). Logo, a PCR detecta DNA viral em amostras clínicas de forma rápida, específica e sensível. Possuindo assim aplicação importante na detecção do DNA viral nos sítios de latência, podendo ser indicativos mais seguro da infecção nestes casos. No entanto, essa técnica é restrita para a detecção viral em sua fase aguda.

2.2.6 Controle E Profilaxia

Duas principais estratégias podem ser adotadas de acordo com a situação epidemiológica e o histórico clínico dos rebanhos: controle com vacinação e sem vacinação. Rebanhos com histórico comprovado da infeção devem implementar a vacinação, com finalidade de redução da circulação viral e da ocorrência de doença clínica, o que, consequentemente, reduz perdas econômicas. Como exemplo de controle fazendo-se o uso da vacinação pode-se observar os dados descritos no Manual Terrestre da OIE (2010), onde a prevalência de BOHV-1 foi reduzida pela adoção de um programa de vacinação, realizado em países europeus, como a Dinamarca, Finlândia, Suécia, Áustria, Suíça e partes da França e Alemanha. As vacinas para BoHV-1 normalmente são formuladas em associação com outros antígenos: vírus da diarreia viral bovina, vírus respiratório sincicial bovino e/ou vírus da parainfluenza tipo-3. Podem estar em uma das quatro classificações existentes: vivo modificada, inativada, de subunidade ou DNA com vacina baseada em vetor. A vacinação vem sendo exaustivamente revisada e existe tendência na adoção de estratégia DIVA (diferenciar animais infectados de animais vacinados). Pois, o uso de vacinas com marcador (estratégia DIVA - Differentiating Infected from Vaccinated Animals) é defendida para que ofereça a possibilidade de diferenciação de animais vacinados dos naturalmente infectados (XIAO *et al*., 2004).

Rebanhos com baixo risco, sem histórico da enfermidade ou sem sorologia positiva devem implementar medidas de biossegurança para prevenir a introdução do agente infeccioso (NOORDEGRAAF *et al*, 2004). O simples teste sorológico de todos os animais que serão introduzidos no rebanho e o descarte de animais positivos são métodos efetivos. Rebanhos com sorologia alta, sem histórico clínico de doença respiratória ou genital e sem problemas reprodutivos podem ser

mantidos sem vacinação, porém com monitoramento contínuo. As boas práticas de gestão na exploração pecuária, devem ser adotadas em acordo com as diretrizes recomendas pela OIE, entre as quais, a tradicional quarentena para animais recentemente introduzidos no rebanho, com a condição de possuírem teste de soronegativo para BoHV-1 e permanecerem nesta por um período mínimo de 2 e 3 semanas. Pois é retratado pela literatura que a introdução de animais no rebanho, sem o conhecimento da origem ou da região e até mesmo propriedade que não seguem programas de vacinação é o principal fator que contribui para a difusão do BoHV-1 (SILVA *et al*., 2002).

Por esta doença se manifestar por infecção latente, todos os animais soropositivos devem ser considerados potenciais fontes de infecção (ACKERMANN *et al*., 1982). Em casos de surtos a vacinação é recomendada, pois pode diminuir o número de novos casos uma vez que diminui a excreção viral. Os surtos ocorrem frequentemente, em rebanhos não vacinados, após situações de estresse. Isto acontece geralmente quando o vírus origina-se de uma infecção latente e é disseminado aos animais suscetíveis (ACKERMANN *et al*., 1982).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar a presença de Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) em líquido folicular de doadoras utilizadas em sistemas comerciais de produção de embriões *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Identificar a presença do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) em líquido folicular de doadoras utilizadas em sistemas comerciais de produção de embriões *in vitro*.

Relacionar a presença dos vírus com a produção média de oócitos e embriões por doadora aspirada.

Relacionar a presença dos vírus com a taxa de concepção das vacas receptoras de embriões utilizadas a campo.

*Obs.: Nenhuma amostra analisada mostrou-se positiva para BVDV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Boca do Acre (Amazonas, Brasil), durante o período de abril de 2013 a abril de 2014, caracterizado por período quente e úmido, com alta disponibilidade de forragens.

Doadoras e Embriões

Foram utilizados 1329 embriões (produzidos *in vitro*), originados de oócitos provindos de aspirações foliculares (OPU) de 150 doadoras da raça Nelore fecundados com sêmen de um único touro da mesma raça (com finalidade de suprimir o efeito de coleta foi utilizado doses de mesma partida). A produção *in vitro* dos embriões foi realizada conforme descrito por Lane e Gardner, (2004). Os embriões apresentavam-se nas fases de desenvolvimento de blastocisto inicial (BI; n = 235), blastocisto (BL; n = 918) e blastocisto expandido (BX; n =176), todos apresentavam grau 1 de qualidade (alta qualidade). Para a classificação dos embriões conforme o estágio de desenvolvimento embrionário e a qualidade do embrião foram utilizados os padrões determinados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Receptoras

Foram utilizadas como receptoras de embriões 1329 novilhas cruzadas *Bos taurus indicus x Bos taurus taurus* (Nelore x Caracu), com média de 28 meses de idade, peso vivo médio de 397 ± 22 Kg, com escore de condição corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5) e cíclicas. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizantha* cv. Piatã, tendo

acesso à água e suplementação mineral (Reprodução®, Tortuga Companhia Zootécnica Agrária, Pecém/CE, Brasil) *ad libitum*, durante todo o período experimental.

Os animais passaram por uma triagem antes de entrarem no experimento onde foram avaliados os sinais clínicos, além de serem testadas sorologicamente para BVDV e BoHV-1, incluindo nesta avaliação a amostra da partida de sêmen utilizada para produção dos embriões.

Delineamento experimental

O ensaio a campo foi delineado de forma inteiramente ao acaso, sendo que tanto as doadoras quanto as receptoras foram aleatoriamente escolhidas sem distinção de grupos: pois, no momento da aspiração e da transferência dos embriões, não tinha-se conhecimento do resultado das análises de PCR.

Preparo de receptoras

No dia zero (D_0) as receptoras receberam um implante intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer®, 1,9 g) e uma dose de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet®,2 mg/animal, IM). No dia sete (D_7) foi aplicada uma dose de prostaglandina ($PGF_2{}^{\alpha}$, Lutalyse®, Pfizer®, 10 mg/animal, IM). No dia nove (D_9) foram retirados os implantes de progesterona e administradas uma dose de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer®, 0,6 mg/anima,l IM) e uma dose de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina - Folligon®, Intervet®, 400 UI, IM). Os animais que apresentaram estro no décimo primeiro dia (D_{11}) foram submetidos à inovulação sete dias depois (D_{18}).

Transferência de embriões em tempo fixo

A técnica de eleição para a transferência foi a não cirúrgica, que consistiu na aplicação de anestesia epidural

utilizando cloridrato de lidocaína (Dorfin®, Hertape®, 100 mg/animal), palpação uterina, identificação e classificação de um CL, inovulação através da cérvix, e deposição do embrião no terço final do corno uterino ipsilateral ao CL previamente identificado.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação dos animais foi realizado 30 dias após a inovulação dos embriões (D_{48}) utilizando um equipamento de ultrassom (ALOKA SSD-500, Aloka®, transdutor de 5,0 MHz transretal, em modo B).

O desempenho reprodutivo foi avaliado por meio da taxa de concepção, ou seja, quantidade de receptoras prenhes em relação ao número de receptoras inovuladas.

Obtenção das amostras

Após a aspiração folicular de cada doadora foi coletado amostra de 1 mililitro de líquido folicular já separado dos oócitos, que foi utilizado para detecção de BoHV-1 através da técnica de PCR, até o momento de manipulação laboratorial as amostras foram acondicionadas em criotubos e armazenadas a -80°C.

Extração de DNA

A extração do DNA foi feita através de um kit comercial, a saber, HiPurA™Multi-Sample DNA Purification Kit®, (HIMEDIA LABORATORIES) conforme recomendação do fabricante. Após a extração as amostras foram armazenadas a menos 20ºC até o momento da realização da amplificação genômica.

Reação em Cadeia da Polimerase

Do líquido folicular em que foi submetido ao processo de extração de DNA foram realizados os PCR para identificação do BoHV-1. A técnica de PCR utilizada foi a descrita por Faria *et al*. (2010) com algumas modificações.

Para todas as reações da PCR foram utilizados 5 µL da amostra de DNA obtida a partir do líquido folicular. Para a reação foram utilizados 20 µL Mix (Invitrogen®), para uma reação com volume final de 25 µL. As reações de PCR ocorreram no termociclador MJ96+ (Biocycler®, Biosystems, São José dos Pinhais, Brasil).

Foram utilizados primers que amplificam uma região de 175 pb do gene Gb (sense 5' CCTCTGTGAACTGCATCGTGGA 3'; antissense 5' TAGCCCTCGATCTGCTGGAGGC 3'), as condições da reação de PCR foram 30 ciclos de desnaturação a 95ºC por um minuto, anelamento a 57ºC por um minuto, extensão a 72ºC por um minuto e meio sendo no final da reação acrescido um período de extensão de 72ºC por 10 minutos. Nesta etapa foram utilizados um controle negativo (água) e um controle positivo (amostra BoHV-1 Cooper)

Os produtos da amplificação foram então analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e corados com 1 µL de Gel Red (Biotium®). Por fim, realizou-se a leitura do gel em transluminador UV (DNR Bio- Imaging Systems Mini Bis Pro, Jesusalém, Israel), com o software de captura de imagem Gel Capture. Foi utilizado marcador de peso molecular padrão de 100 pares de base (Invitrogen®). Foram adotados todos os cuidados para não ocorrer contaminação das reações com amplicons.

Análise estatística

Utilizou-se para avaliação da prevalência de doadoras portadoras do vírus da IBR, o teste de Qui-quadrado (χ^2). Para

avaliar a produção média de oócitos, e de embriões entre as doadoras, optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis Test (*k*). E para avaliar a taxa de concepção entre as receptoras nas quais foram transferidos embriões oriundos de doadoras positivas ou não, para IBR novamente fez-se o uso do teste de Qui-quadrado utilizando o nível de significância (α=0,05). Todas as análises foram realizadas pelo programa Statistical Analysis System (SAS, 1996).

5 RESULTADOS

Neste trabalho foram analisadas amostras de líquido folicular de 150 doadoras de embriões da raça nelore, através de ensaio molecular (PCR). Analisando os dados, observou-se uma prevalência de 14% (χ^2=77,76; p<0,001) de vacas doadoras de embriões portadoras do Herpesvírus Bovino Tipo 1 em ralação as vacas avaliadas (21/150), como demonstrado na Tabela -1, ou seja, por meio da análise estatística pelo teste chi-quadrado (χ^2), observou-se que há diferença significativa entre os animais portadores do BoHV-1 em relação ao total de animais avaliados.

Tabela 1 – Comparação de doadoras da raça nelores portadoras do Herpesvírus Bovino Tipo 1(HoVB-1), em relação à produção de oócitos e embriões, Boca do Acre – AM, 2014.

Animais	n/N[1]	Porcentagem	Oócitos		Embriões	
		Prevalência	Número	Média[2]	Número	Média[3]
Positivos	21/150	14	430	20,48	161	7,67
Negativos	129/150	86	2500	19,38	1168	9,05

(1-χ^2=77,76; P<0,001); (Kruskal-Wallis Test; 2- k=0,0214, p=0,8837; 3- k=1,5238, p=0,217)

Fonte: Produção do próprio autor.

Como pode-se observar também na Tabela -1, não foi encontrado diferença significativa corroborada por meio de análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, na produção média de oócitos, e de embriões, entre as doadoras portadoras ou não do BoHV-1.

Avaliando a taxa de concepção das receptoras (N=1329) utilizadas neste estudo, onde após o conhecimento

das doadoras portadoras do BoHV-1, os embriões oriundos da FIV dos oócitos provenientes destas foram separados em dois grupos, a saber, positivos e negativos, onde em sequência as receptoras também foram aleatoriamente designadas em dois grupos, G1, nas quais foram transferidos embriões (n=161) oriundos de doadoras positivas e G2, nas quais foram transferidos embriões (n=1168) oriundos de doadoras negativas, para BoHV-1.

As receptoras que receberam embriões das vacas positivas tiveram uma taxa de prenhes de 39,13% (63/161), já as que receberam embriões de doadoras negativas, apresentaram uma taxa de 44,95% (525/1168), não diferindo significativamente entre si, (χ^2=1,9417, p=0,1635), como demostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Taxa de concepção de vacas utilizadas como receptoras de embriões oriundos de doadoras portadoras de Herpesvírus Bovino Tipo 1(HoVB-1), Boca do Acre – AM, 2014

Grupos	Taxa de concepção (%)[1]
Grupo 1	39,13 (63/161)
Grupo 2	44,95 (525/1168)
Total	44,24 (588/1329)

(1-χ^2=77,76; P<0,001).
Fonte: Produção da próprio autor.

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento reforçam a hipótese proposta por trabalhos anteriores, de que é possível a presença de agentes virais no ambiente folicular (GERIN *et al*., 1989; BIELANSKI *et al*., 1993; VANROOSE *et al*., 2000). Os resultados demonstram que nem sempre o líquido folicular está livre de BoHV-1, e o risco potencial de sua presença pode ser remoto, mas deve ser considerado em programas comerciais de produção *in vitro* de embriões.

Nós encontramos uma prevalência de 14% (21/150), e o mais relevante consiste no fato de que os animais portadores apresentavam-se com ótimo estado clínico, não demonstrando os sinais clínicos compatíveis com a presença deste agente. O que reforça a necessidade de desenvolvermos uma rotina de triagem para verificar o status sanitário dos animais a serem selecionados como doadoras.

Este estudo é inédito em termos de delineamento experimental quando comparado com outros estudos conduzidos com a mesma metodologia de avaliação (PCR de amostras de líquido folicular), pois, neste foram utilizados animais de programas comerciais de produção *in vitro*, diferindo dos demais onde foram utilizadas amostras de líquido folicular de ovários provenientes de abatedouro, onde não se conhece a procedência, idade, condição clínica e taxa de concepção das receptoras quando da inovulação dos embriões nestas.

Weber *et al*. (2013), ao avaliar amostras de líquido folicular de 7336 ovários oriundos de abatedouro comercial, sendo que para otimizar as atividades estes foram aleatoriamente designados em 84 grupos (pools), descreveram uma prevalência de 1,2% (1/84), quando comparada aos nossos dados observa-se uma grande discrepância de valores, acreditamos que isto se dê principalmente pela diferença na localização de coleta das amostras entre estes trabalhos, pois,

Weber *et al*., (2013) utilizou um abatedouro localizado na região sul do Brasil, enquanto nós coletamos amostras de vacas doadoras criadas na região norte do Brasil, onde nesta tem-se uma criação de animais principalmente em sistemas extensivos, e em associação com as condições climáticas de altas temperatura e umidade tona-se muito mais propícia ao desenvolvimento de agentes infecciosos, Cavalcante (1997) ao avaliar prevalência do BoHV-1 na mesma região onde nosso trabalho foi realizado, descreveu uma prevalência de 44,73% de animais soropositivos, sendo que nestes animais nunca tinha sido realizado manejo de vacinação.

O que coloca em contraprova nossa hipótese de que a região tenha exercido influência na diferença entre estes trabalhos, é o resultado descrito por um levantamento sorológico conduzido por Dias *el al*. (2013) específico para o BoHV-1 realizado também na região sul, onde avaliaram mais de 14 mil animais dispostos em sete regiões no estado do Paraná e encontram uma prevalência de 71,3% (95% CI: 69,3–73,3).

Todavia, Ferreira *et al*. (2005), também trabalhando com amostras oriundas de ovários de abatedouro no estado de São Paulo, onde de um total de 276 ovários, encontraram prevalência de 8,33% utilizando o mesmo método de diagnóstico (PCR). Marley *et al*. (2008) ao proceder com ensaio de idêntica metodologia de diagnóstico, identificou prevalência nula (zero) para BoHV-1, entretanto, estes avaliaram apenas 10 ovários oriundos também de um abatedouro comercial, ou seja, o fator número amostral, os animais serem de abatedouro e possivelmente poderiam então não estarem em fase aguda da infecção provavelmente comprometeram este resultado.

Utilizando outra metodologia de diagnóstico (isolamento viral por cultivo celular), não obstante, também avaliando líquido folicular oriundo de abatedouro, Bielanski *et al.* (1993), em um total de 85 amostras, relataram uma

prevalência de 11,8% para BoHV-1. Este grupo foi pioneiro no estudo deste agente fazendo uso deste meio biológico e naquele ano propuseram que na produção de embriões *in vitro*, o BoHV-1 tem efeito direto no sêmen, por ter capacidade de aderir nas células espermáticas, devido a composição química do receptor de sulfato de heparina difundido na superfície celular espermática que favorece a ligação do vírus (BIELANSKI *et al*., 1993), todavia este efeito foi suprimido no nosso estudo, visto termos utilizado somente uma partida de um único touro já avaliado previamente como livre do agente.

Esse mesmo grupo em um experimento que avaliou a exposição (*in vitro*) de embriões (n=103) ao BoHV-1, demonstraram baixa sobrevivência dos embriões (47%) após a exposição destes ao BoHV-1. Um ano após Putney *et al.* (1988), propôs que a mortalidade poderia estar ocorrendo, em tese, por atividade citotóxica nas células ou por alterações fisiopatológicas no ambiente uterino, como já abordado por nosso grupo ao estudar os efeitos do processo inflamatório no período de estabelecimento inicial da gestação em receptoras de embriões (AGUIAR *et al.*, 2013).

Ao avaliarmos a taxa de concepção das vacas utilizadas como receptoras (N=1329), não notamos diferença entre ambas, ou seja, nas quais foram transferidos embriões (n=161) oriundos de doadoras positivas e nas que foram transferidos embriões (n=1168) oriundos de doadoras negativas, para BoHV-1 ((39,13% (63/161); 44,95% (525/1168); (χ^2=1,9417, p=0,1635), respectivamente). A literatura é deficiente quanto a este tipo de estudo em receptoras de embriões, portanto, os resultados do presente trabalho servem como base para futuros estudos.

Mas após discussão dos resultados, concluímos que não notamos influência na taxa de prenhez neste momento, porque o aborto causado por este agente ocorre como referenciado por Wyler *et al*. (1990), principalmente durante o 5º ao 8º mês de gestação. Teoria confirmada no trabalho conduzido por Aono

et al., (2013), avaliando a influência do BoHV-1, BVDV e *Leptospira* spp. na eficiência reprodutiva de rebanhos de corte no mesmo local do nosso estudo, diferindo apenas no enfoque do estudo, concluíram que estes agentes influenciaram nas perdas de prenhez dos 30 aos 120 dias de gestação em vacas submetidas a IATF, onde a vacinação contra estes agentes melhorou desempenho reprodutivo dos rebanhos avaliados. No rebanho vacinado as perdas foram de 1,5% (20/599), já no rebanho controle esse valor foi de 5,5% (34/726). Quando da avaliação sorológica dos animais específica para BoHV-1, encontraram uma prevalência de soropositivos de 94% num total de 2793 vacas de corte, ou seja, em animais que nunca tinham sido imunizados contra estes agente.

Para garantir embriões livres de agentes patogênicos, a IETS recomenda, como requisito para o comércio internacional de embriões, a lavagem e tratamento dos embriões com tripsina. No entanto, estudos têm mostrado que estes processos não são eficazes na remoção de BoHV-1 (D'ANGELO *et al*., 2009).

Como o Brasil é referência mundial na aplicação das biotécnicas da reprodução animal, em especial a produção *in vitro* de embriões, temos que realizar mais estudos para elucidar os fatores relacionados ao impacto sanitário desse agente, como forma de prevenção da integridade da saúde dos animais envolvidos e como ferramenta para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, pois, já é corriqueiro o uso da transferência de embriões para produção em larga escala de animais de produção. E como estudos com essa metodologia são inexistentes, este estudo fornece uma base para o planejamento de futuros trabalhos.

7 CONCLUSÃO

A técnica de PCR demonstrou ser eficiente para identificar a presença de Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) em líquido folicular de doadoras utilizadas em sistemas comerciais de produção de embriões *in vitro*.

A produção média de oócitos e embriões não sofreu influência do BoVH1-1.

A presença dos vírus no ambiente folicular não influenciou a taxa de concepção das vacas utilizadas como receptoras de embriões, quando avaliadas 30 dias após a transferência do embriões.

Não foi detectada a presença de BVDV em liquido folicular através da técnica de PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. **Veterinary Microbiology**, v.31, n.113(3-4), p. 293-302, 2006.

ACKERMANN M.; PETERHANS, E.; WYLER, R. DNA of Bovine Herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.36-40, 1982.

AGUIAR, T.S.; ARAÚJO, C.V.; TIRLONI, R.R.; MARTINS, L.R. Effect of meloxicam on pregnancy rate of recipient heifers following transfer of *in vitro* produced embryos. **Reproduction Domestic Animals**, v.48, n.6, p.984-8, 2013.

ALFIERI A. A.; ALFIERI, A. F.; MEDICI, K. C. Consequências da infecção pelo herpesvirus bovino tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 19, n. 1, 1998.

ALICE, F J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v.38, p.919-920, 1978.

ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Informa Economics FNP, p. 357, 2013.

AONO, F. H.; COOKE, R.F.; ALFIERI, A. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. **Theriogenology,** v.79, p.242–248, 2013.

ASSUMPÇÃO, M. E.; HAIPECK, O. D.; LIMA, K. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.3, p.149-156, 2002.

BABIUK, L. A.; et al.. Protection of cattle from bovine herpesvirus type I (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. **Virology**, v.159, p.57–66, 1987.

BIELANSKI, A.; et al. Isolation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhea virus (BVDV) from embryos produced by in vitro fertilization. **Theriogenolgy**, v.40, p.531-538, 1993.

BOTELHO, R. G. A. **Desenvolvimento de testes de PCR para BoHV-5 e sua aplicação no diagnóstico de casos clínicos**. 38f. Dissertação (mestrado), Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

BRACKETT, B.G.; et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, supl.1, p.147-158, 1982.

BERG, D.K.; VAN LEEUWEN, J,; BEAUMONT, S,; BERG, M,; PFEFFER, P.L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v.73, n.2, p.250-260, 2010.

BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A, C.; ESTES, D. M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.63, p.45–55, 1998.

BIELANSKI, A; DUBUC, C. In-vitro fertilization and culture of ova from heifers infected whith bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v.41, p.1211-1217, 1994.

CAVALCANTE, F. A. Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), no estado do Acre. Rio Branco: Embrapa-CPAF/AC, 1997. 3p. **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. ISSN 0101-6075, v.102, p.1-3, 1997.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v.8, n.184, s.7, p.466-7, 1959.

CHISTIANSON, W.T. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. **Veterinary Clinics of North America**, v.8, p.623-639, 1992.

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; GONÇALVES, R.F. Evaluation of Trypsin Treatment on the Inactivation of Bovine Herpesvirus Type 1 on In Vitro Produced Pre-implantation Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**. n.44, p.536–539, 2009.

DEJUCQ, N.; JEGOU, B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.65, p.208–31, 2001.

DENIS, M.; et al. A. Infectious bovine rhinotracheitis (bovine herpesvirus 1): helper T cells, cytotoxicity T cells and NK cells. In: Goddeeris B, Morrison I, editors. **Cell mediated immunity in ruminants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, P.157–172. 1994.

DIAS, J. A.; et al. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná , Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p.39–47, 2013.

DIAS, J. A.; et al. Fatores de risco associados a infecção pelo herpesvirus bovino 1 em rebanhos bovinos da região Oeste do estado do Parana. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.161-168, 2008.

DISPAS, M.; et al. Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. **Veterinary Record,** v.153, p.209–212, 2003.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of he predominant genotypes of bovid herpervirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology, v.**22, p.213-23, 1990.

ENGELS M, ACKERMANN M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.3–15, 1996.

FENNER, F.J.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. Herpesviridae. **Veterinary virology**, 335-68, 1993.

FERREIRA, C. Y. M. R.; et al. Ocorrência do herpesvirus bovino 1 (bohv-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivo Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.309-311, 2005.

FLORES, E. F. Vírus da diarréia viral bovina. **Arquivo Instituto Biológico**, v.65, p.3-9,
2003.

FLORES, E. F.; et al. Infection with bovine viral diarrhea virus (BVDV) in Brazil, history, current situation and prospects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, p.125–34, 2005.

FUCHS, M.; HÜBERT, P.; DETTERER, J.; RZIHA, H. J. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2498-507, 1999.

GERIN, B.; et al. Contamination des ovocytes et des embryons fecondes in vitroapres infection experimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BHV-1). **Record Medicine Veteterinary**, v.165, p.827-833, 1989.

GIBBS, E.P.J.; RWEYEMAMU, M. M. Bovine herpesviruses. Part I. **Vetennary Bulletin Weybride**, v.47, n.5, p.317– 43, 1977.

GRAHAM, D. A. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle–a review with emphasis on reproductive impacts and the emergenceb of infection in Ireland and the United Kingdom. **Irish Veterinary Journal**, v. 66, n.1, p.2-11, 2013.

GUSTAFSON, D. P. Herpesvirus disease of mammals and birds: compararive aspects
and diagnosis. In: **Comparative diagnosis of viral disease**. Academic Press, New
York. p..76-97, 1981.

International Embryo Transfer Society. **Manual os the international embryo transfer society**: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer thecnology, emphasasizing sanitary procedures, 4ª ed, 2009.

JONES, C.; DA SILVA, L.F.; SINANI, D. Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. **Journal of NeuroVirology**, v.17, n.6, p.535-45, 2011.

JUNQUEIRA, J. R. C.; et al. Reproductive performance evaluation of a beef cattle herd naturally infected with the BoHV-1, BVDV and Leptospira hardjo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p.471–80, 2006.

KELLING, C. L. Viral Diseases of the Fetus. **Virology**, p.399–408, 2007.

KHODAKARAM-TAFI, A.; IKEDE, B. O. A retrospective study of sporadic bovine abortions, stillbirths, and neonatal abnormalities in Atlantic Canada, from 1990 to 2001. Canadian **Veterinary Journal, v.**46, p.635–7, 2005.

KOZASA, T.; AOKI, H.; NAKAJIMA, N.; FUKUSHO, A.; ISHIMARU, M.; NAKAMURA, S. Methods to select suitable fetal bovine serum for use in quality control assays for the detection of adventitious viruses from biological products. **Biologicals**, v.39, p.242–8, 2011.

LANE, M.; GARDNER D. K. Preparation of gametas, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, and embryo recovery and transfer. In: Gardner DK, Lane M, Watson AJ (eds), **A laboratory Guide to the Mammalian Embryo**. Oxford University Press, NY, p. 24-40, 2004.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P.P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. **Animal Medicine Veterinary**, v.138, n.3, p.167-180, 1994.

LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; MCGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. **Veterinary Record**, v.12, n.121, s.11, p.259-60, 1987.

MACLACHLAN, N.J.; DUBOVI, E.J.; HERPESVIRALES. In: MACLACHLAN, N. J.;DUBOVI, E. J.; (edi.). **Fenner's veterinary virology**. 4th ed. London: Academic Press, p.179–201, 2011.

MARS, M. H.; BRUSCHKE C. J. M.; VAN OIRSCHOT J. T. Air borne transmission of BHV-1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 66, p.197-207, 1999.

MCEWAN B, CARMAN S. Animal health laboratory reports–cattle. Bovine abortion update, 1998-2004. **The Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.46, 2005.

METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine herpesvirus 1: a comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives Virology**, v.85, p.57–69, 1985.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M. J. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. **American journal of veterinary research**, v.47, p.223–8, 1986.

MOORE, S.; GUNN, M.; WALLS, D. A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. **Veterinary Microbioly**, v.75, p.145–153, 2000.

MSOLLA, P. M.; WISEMAN, A.; SELMAN, I. E. The prevalence of serum neutralized antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus in Scotland. **The Journal of Hygiene**, v.86, p.209–215, 1981.

MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v.38, n.2, p.181-209, 2007.

NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R. S. Bovine herpes vírus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v.10, n.1, p.85-98, 2009.

NORTON, J. H.; TRANTER, W. P.; CAMPBELL, R. S.; SHEPHERD, R. K. A farming systems study of abortion in dairy cattle on the Atherton Tableland: 3 Metabolic Fators. **Australian Veterinary Journal**, v.66, p.167-170, 1989.

OBANDO, R. C.; et al. Seroprevalence to bovine virus diarrhoea virus and other viruses of the bovine respiratory complex in Venezuela (Apure State). **Preventive Veterinary Medicine**, v.41, p.271–278, 1999.

OLIVEIRA, M.T.; et al. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. **Theriogenology**, v.75, p.1139-1145, 2011.

OWEN, N. V.; CHOW, T. L.; MOLELLO, J. A. Bovine Fetal Lesions Experimentally Produced By Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus. **American Journal Of Veterinary Research**, v.25, p.1617-26, 1964.

PALMA, G. A.; BREM, G. **Transferencia de Embriones y Biotecnología de la Reproducción en la Especie Bovina**. Editora Hemisferio Sur, p.243-266, 1993.

PASTORET, P.; THIRY, E.; BROCHIER, B.; DERBOVER, B. Bovid herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annals of veterinary research**, v.13, p.221–235, 1982.

PETERSON A. J.; LEE R. S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.687-97, 2003.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, T. A.; TAVERNE, M. A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, n.4, p.751-62, 1988.

PONTES, J. H.; et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.690-7, 2009.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposure to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, p.195-209, 1988.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa. **Ciência Rural**, v. 26, p. 323-332. 1996.

ROCHA, M. A.; et al. A high sensitivity-nested PCR assay for BOHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v.63, p.1-11, 1998.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, v.28, p.186-187, 2000.

ROEHE, P. M.; et al. Atualização no diagnóstico e controle de infecções por herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 59, n. 2, p. 27-32, 1997.

ROEHE, P. M.; EDWARDS, S. Comparison of pestivirus multiplication in cells of different species. **Research in Veterinary Science,** v.57, n.2, p.210-4, 1994.

SCHWYZER, M.; ACKERMANN, M. Molecular virology of ruminant herpesviruses. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.17-29, 1996.

SILVA, T. C.; et al. Caracterização de herpesvírus bovinos tipos 1 (BHV-1) e 5 (BHV-5) com anticorpos monoclonais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.1, p.13-18, 2002.

SIQUEIRA, L. G.; et al. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v.72, n.7, p.949-58, 2009.

STRAUB, O. C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.14, n.2, p.175-86, 1991.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Infectious agentes in bovine embryo production: harzards and solutions. **Theriogenology**, v.53, p.85-94, 2000.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo-derived bovine embryos. **Livestock Production, v.**62, n.3, p.237-251, 2000.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D.; WALDROP, J. G. Biosecurity issues associated with current and emerging technologies. **Reproduction, Fertility and Development,** v.16, p.1-10, 2004.

SANTOS, J. E.; CERRI, R. L.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology,** v.69, n.1, p.88-97, 2008.

STROUD, B. IETS statistics and data retrieval committee report. The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. IETS Newsletter December 2010, **International Embryo Transfer Society**, v.28, n.4, p.11-21, 2010.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine herpesvirus type 1: infection and diagnosis methods. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.203–9, 2001.

TEIXEIRA, M. F.B.; et al. ELISA de bloqueio monoclonal para o diagnóstico sorológico de infecções pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1)1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.1, p.33-37, 2001.

Terrestial Manual. Infectious bovine rhinotracheitis. **World Organisation for Animal Health**. Chapter 2.4.13, 2010.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. La sécurité sanitaire dans le transfert d'embryons bovins collectés in vivo, fécondés in vitro ou clones. **Bulletin de l'Academie Veterinaire de France**, v.70, p.183-184, 1993.

TURIN, L.; RUSSO, S.; POLI, G. BoHV-1: New molecular approaches to control a common and widespread infection. **Molecular Medicine,** v.5, p.261– 84, 1999.

VAN DE VELDE, H.; et al. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. **Prenatal diagnosis**, v.20, n13, p.1030-7, 2000.

VAN OIRSCHOT, J. T.; KAASHOEK, M. J.; RIJSEWIJK, F. A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.53, p.43-54, 1996.

VAN SCHAIK, G.; DIJKHUIZEN A. A.; HUIRNE, R. B.; BENEDICTUS, G. Adaptive conjoint analysis to determine perceived risk factors of farmers, veterinarians and AI technicians for introduction of BHV1 to dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine,** v.1, n.37, p.101-12, 1998.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VANROOSE, G.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.131-143, 2000.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.3, p.915-924, 2007.

VAN NOORDEGRAAF, A.; et al. Simulated hazards of loosing infection-free status in a Dutch BHV1 model. **Preventive Veterinary Medicine**, v.62, p.51–58, 2004.

WEBER, M. N.; et al.. Evaluation of prenucleic acid extraction for increasing sensitivity of detection of virus in bovine follicular fluidpools. **Theriogenology**, v.1, n.79, s.6, p.980-5, 2013.

WEIBLEN, R.; KREUTZ, L. C.; CANABARRO, T. F.; FLORES, I. E. Balanoposthitis in bulls due to bovine herpesvirus in south Brazil. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v.24, n.8, p.773-5, 1991.

WINKLER, M.T.; DOSTER, A.; JONES, C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. **Journal of Virology,** v.74, p.5337–5346, 2000.

WRATHALL, A. E. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. **Theriogenology,** v.43, p.81-88, 1995.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZER, M. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Vulvovaginitis (BHV-1). In: Wittman, G. (ed.). **Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs**. Kluwer Academic Publishers, Norwell, p.1-71, 1990.

XIAO, D. H.; LI, L. H.; JIANG, H. X.; WANG, L. Y. Research in Prevention and Cure of Infectious Bovine Rhinotracdeitis. **China Dairy Cattle,** v.4, p.43–45, 2004.

YATES, W.D. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, n.3, p.225-263, 1982.