

## IMPACTO DO HERPESVÍRUS BOVINO 1 E DO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA NA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

(*Bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus impact in the embryo transfer*)

RUFINO, F.A.<sup>1</sup>; SENEDA, M.M.<sup>2</sup>; ALFIERI, A.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de concentração: Sanidade Animal; Nível: Mestrado), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL);

<sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Depto. de Clínicas Veterinárias, CCA, UEL;

<sup>3</sup>Laboratório de Virologia Animal, Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, CCA, UEL (Bolsista CNPq).

**RESUMO** – A transferência de embriões bovinos é uma biotécnica da reprodução animal, amplamente difundida no Brasil, que tem possibilitado a produção de embriões com alto potencial genético. Considerando a difusão da técnica e o grande número de embriões gerados e distribuídos, no aspecto sanitário, devem ser avaliados os riscos da disseminação de agentes infecciosos da esfera reprodutiva. O herpesvírus bovino 1, responsável pela rinotraqueíte infecciosa bovina, e o vírus da diarreia viral bovina, causador da diarreia viral bovina, são dois vírus capazes de infectar embriões por meio das fêmeas doadoras e/ou do material biológico relacionado à técnica.

**Palavras-chave:** bovino, transferência de embriões, herpesvírus bovino 1, vírus da diarreia viral bovina.

**ABSTRACT** – The bovine embryo transfer is an animal reproduction biotechnology widely diffused in Brazil that has been allowing the production of embryos with high genetic potential. Considering the technique diffusion and the high number of produced and distributed embryos, in the sanitary aspect its use in wide scale can contribute with risks of infectious diseases dissemination. Bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhea virus, respectively, the etiological agents of the infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea are two potential viruses able to infect embryos through donator females and/or biological materials related to the technique.

**Key-words:** cattle, embryo transfer, bovine herpesvirus 1, bovine viral diarrhea virus.

### Introdução

Com um rebanho estimado em mais de 195 milhões de cabeças o Brasil possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo (MAPA, 2003). Nos últimos anos, com o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal, o país tem se destacado mundialmente pelo elevado número de embriões bovinos produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro* (THIBIER, 2002 e 2004).

Dentre as biotécnicas da reprodução animal utilizadas na bovinocultura destacam-se a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões. A TE tem sido utilizada com êxito há anos e caracteriza-se por ser um dos métodos mais econômicos e práticos para aumentar as taxas empregadas para avaliar a eficiência reprodutiva de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de bovinos de corte quanto de leite. O emprego comercial da TE tem aumentado consideravelmente. Esse aumento é consequência da demanda e também dos avanços teóricos e práticos introduzidos em todas as etapas de realização da técnica, que compreendem desde a coleta até a conservação dos embriões (REICHENBACH, 2003).

Aproximadamente 80-90% dos embriões bovinos transferidos mundialmente nos últimos anos foram obtidos por meio da TE. Essa técnica tem se caracterizado como a mais utilizada para produzir embriões viáveis, predominando sobre técnicas mais recentes como a punção folicular (PF) e a PIV, que compreendem os outros 10-20% dos embriões transferidos comercialmente (THIBIER, 2004).

A TE foi realizada pela primeira vez em 1891 em embriões de coelhos e, inicialmente, não despertou muita atenção. Em bovinos essa técnica foi realizada com sucesso em 1951, porém somente tornou-se comercialmente viável a partir de 1970. Para isso, contribuíram inúmeros fatores e vantagens como: i) a necessidade de melhoria genética; ii) a redução do intervalo entre gerações, com a produção de maior número de crias; iii) a realização de pesquisas em todas as espécies animais e iv) o controle de doenças infecciosas (VIANA, 1990).

### Transferência de Embriões e a Transmissão de Doenças

A cada ano e com maior frequência a TE tem se tornado uma ferramenta básica em programas de reprodução de bovinos. Como consequência natural desse desenvolvimento observa-se o crescente interesse na relação entre a TE e a transmissão de doenças infecciosas, bem como o estudo da interação

entre os embriões e os microrganismos patogênicos. Os agentes infecciosos presentes no trato reprodutivo dos bovinos podem reduzir o número e a qualidade dos embriões produzidos, resultando em doenças nas receptoras e nos animais nascidos, além de poderem alterar significativamente resultados de experimentos e pesquisas relacionados ao desempenho de novas tecnologias da reprodução animal (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a).

No processo de transferência, o embrião, relacionado com o estado de sanidade da doadora, o sêmen e a receptora são as três principais fontes de risco de transmissão de doenças. Cada uma dessas fontes contribui de forma diferenciada para a transmissão de agentes infecciosos pela TE (LAGE, 1999). Por isso, medidas sanitárias rigorosas, em todas as etapas, são vitais para assegurar o sucesso da técnica. O transporte de embriões é, sem dúvida, muito mais seguro que o transporte de animais ou sêmen e, por essa razão, o potencial de propagação de doenças infecciosas por meio dos embriões é de considerável interesse (WRATHALL e SUTMÖLLER, 1998).

Para que um microrganismo patogênico possa ser transmitido pela TE é necessário que ocorra uma seqüência ininterrupta de eventos incluindo: i) a exposição do embrião ao microrganismo; ii) a contínua associação do patógeno com o embrião; iii) a manutenção da infectividade do microrganismo mesmo nas condições de manipulação e processamento do embrião; iv) a dose infectante do patógeno e v) a susceptibilidade da receptora. Em 2004 o Sub-comitê de Pesquisa da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (*International Embryo Transfer Society* –IETS–) revisou os dados disponíveis de pesquisas e também de informações de campo sobre o potencial de risco de transmissão de doenças infecciosas via embriões produzidos *in vivo* (OIE, 2005). Para a categorização dos agentes infecciosos foram consideradas várias questões dentre as quais as mais relevantes foram:

i) Qual a natureza da doença? Por exemplo, o agente etiológico é um patógeno uterino? Ele também ocorre no sangue? Ele pode persistir no sangue? Animais assintomáticos eliminam o patógeno? Qual a dose infecciosa mínima?

ii) O agente patogênico tem sido encontrado no ovário, oviduto ou útero? Em caso positivo esse achado foi acidental ou como conseqüência da patogenia da doença?

iii) A presença do agente etiológico no ambiente reprodutivo é consistente com a obtenção de embriões viáveis?

iv) O agente etiológico tem sido encontrado em líquidos de lavagens e/ou aderido à zona pelúcida (ZP), ou tem a capacidade de atravessar a ZP intacta? Ele pode ser removido por meio de lavagens do embrião? Tratamentos especiais (ex. tripsina) têm a capacidade de removê-lo ou inativá-lo?

Com base nas respostas e considerando, em todas

as situações, que os embriões foram adequadamente manipulados, desde a coleta até a transferência, seguindo-se rigorosamente as normas constantes no manual da IETS para transferência de embriões, os agentes patogênicos foram distribuídos em quatro categorias:

i) *Categoria 1*: Estão incluídas aquelas doenças ou microrganismos para os quais há suficientes evidências de que o risco de transmissão é negligenciável. Para a espécie bovina nessa categoria estão incluídas as seguintes doenças: Língua Azul, Encefalopatia Espongiforme Bovina, Brucelose, Leucose Enzoótica Bovina, Febre Aftosa e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (desde que o embrião seja adequadamente tratado com tripsina).

ii) *Categoria 2*: Incluem-se nessa categoria aquelas doenças para as quais há evidências substanciais de que o risco de transmissão também é negligenciável. Entretanto, com o objetivo de ratificar os dados existentes ainda há necessidade de informações adicionais, que poderão ser obtidas por meio da avaliação de maior número de transferências. Nessa categoria não são listadas doenças características da espécie bovina.

iii) *Categoria 3*: São relacionadas aquelas doenças para as quais as evidências preliminares indicam que o risco de transmissão pode também ser negligenciável. Entretanto, há necessidade de dados experimentais obtidos tanto *in vivo* quanto *in vitro* que possam ratificar os achados preliminares. Em bovinos são citadas as seguintes doenças e/ou agentes patogênicos: vírus da imunodeficiência bovina, vírus da diarreia viral bovina, *Haemophilus somnus*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Neospora caninum* e Peste Bovina.

iv) *Categoria 4*: Incluem-se nessa categoria aquelas doenças para as quais ainda não são disponíveis dados suficientes para que haja uma conclusão sobre os riscos de transmissão ou ainda, aquelas doenças para as quais, em embriões manipulados de forma inadequada, os riscos de transmissão via transferência de embriões não podem ser negligenciados. Em bovinos estão incluídos nessa categoria agentes virais (vírus da estomatite vesicular, vírus akabane, herpesvírus bovino 4, enterovírus bovino, vírus parainfluenza 3), bacterianos (*Ureaplasma* / *Mycoplasma* spp, *Anaplasma* sp, *Chlamydia psittaci*, *Escherichia coli* O9;K99, *Leptospira borgpetersenii* sorovar *hardjobovis*, e *Mycobacterium bovis*) e um protozoário (*Trichomonas foetus*).

### A Transferência de Embriões e os Vírus

Desde o advento da comercialização da TE questiona-se sobre o risco da infecção e os possíveis efeitos patogênicos, particularmente dos vírus, em embriões de pré-implantação e a possibilidade de sua transmissão por meio dessa técnica (FRAY *et al.*, 2000).

O vírus da diarreia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus* –BVDV–) e o herpesvírus bovino 1 (*bovine herpesvirus 1* – BoHV-1–) causadores,

respectivamente, da diarreia viral bovina (BVD) e da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), estão entre os agentes infecciosos mais importantes devido aos transtornos reprodutivos ocasionados em bovinos. A BVD e a IBR são duas doenças infecciosas economicamente importantes, de grande disseminação e difícil controle, que estão amplamente disseminadas nos rebanhos bovinos de corte e de leite tanto do Brasil quanto da maioria dos países onde a pecuária bovina é uma importante atividade econômica (RICHTZENHAIN *et al.*, 1999; RUDAN *et al.*, 1999; MÉDICI *et al.*, 2000; TAKIUCHI *et al.*, 2001; FLORES *et al.*, 2005). Considerando a frequência de ocorrência, a epidemiologia e que ambas as infecções podem comprometer diretamente os desempenhos produtivo e reprodutivo dos animais infectados, causando perdas econômicas significativas à pecuária bovina, essas duas viroses são motivo de preocupação tanto de técnicos quanto de pecuaristas com relação ao seu impacto negativo na TE (HOUE, 1999; STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a; TAKIUCHI *et al.*, 2005).

*Vírus da diarreia viral bovina (BVDV):* O BVDV pertence à Família *Flaviridae*, Gênero *Pestivirus* e é constituído por ácido nucléico RNA fita simples de polaridade positiva. As características de replicação do BVDV em cultivo celular (*in vitro*) possibilitam a classificação das estirpes virais em biotipo citopático (CP), que ocasiona efeito citopático, e em biotipo não-citopático (NCP), que não induz lise celular. O biotipo NCP é o mais importante e o mais freqüente e deveria ser considerado o genuíno pestivirus. Esse biotipo possui a habilidade de atravessar a placenta em um período no qual o sistema imune fetal ainda não está completamente formado (40-110 dias de gestação) e, nesse período, o vírus é reconhecido como próprio (*self*) pelo hospedeiro. Nessa situação, desenvolve-se infecção persistente e os animais tornam-se imunotolerantes e persistentemente infectados (PI) pelo BVDV. Os animais PI são a principal fonte de disseminação e de infecção pelo BVDV nos rebanhos. O biotipo CP, que induz vacuolização e morte celular, é comumente associado ao quadro clínico conhecido como "Doença das Mucosas". Essa forma de apresentação clínica é grave e quase sempre fatal e somente ocorre em animais PI após uma re-infecção ou, mais comumente, após um processo de mutação da estirpe NCP em CP (NETTLETON e ENTRICAN, 1995).

O BVDV é responsável por inúmeras síndromes clínicas incluindo infecções entéricas e respiratórias agudas, assim como outros sinais clínicos associados aos efeitos imunodepressivos decorrentes da infecção viral. Com relação à esfera reprodutiva o BVDV é considerado o principal patógeno da reprodução em bovinos e os efeitos deletérios mais importantes da infecção ocorrem nos embriões. Com frequência, a primo-infecção de uma fêmea gestante, soro-negativa para o BVDV, pode ocasionar mortalidade embrionária

e/ou fetal, mumificação fetal, efeito teratogênico e o nascimento de bezerro fraco, com peso corporal abaixo da média da raça (NETTLETON e ENTRICAN, 1995; FRAY *et al.*, 2002; NISKANEN *et al.*, 2002).

*Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1):* O BoHV-1 pertence à Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus* e caracteriza-se pelo ciclo replicativo rápido (24-48 h), acompanhado de lise das células infectadas. A infecção caracteriza-se por diversas formas clínicas que comprometem os sistemas respiratório e reprodutivo. O BoHV-1 pode ocasionar repetição de cios a intervalos regulares/irregulares, abortamentos, natimortalidade, mortalidade perinatal, redução na fertilidade e infertilidade temporária devido à infecção uterina. O BoHV-1 pode também determinar lesões necrosantes nos ovários, principalmente se a infecção ocorrer no período da ovulação, afetando o corpo lúteo em formação, com conseqüente queda na concentração de progesterona, resultando em falha na prenhez (MILLER e VAN DER MAATEN, 1986).

Após a primo-infecção, a latência viral, que é a principal característica biológica dos herpesvírus, induz nos animais o estado de portadores e transmissores potenciais do vírus devido aos episódios de reexcreção viral. O vírus mantém-se em gânglios periféricos, persistindo assim durante toda a vida do animal. Sob condições de estresse ou de terapia com corticóide o BoHV-1 pode ser reativado, com conseqüente liberação de partículas virais infectantes (STRAUB, 1990).

*Infecção dos embriões pelo BVDV e BoHV-1:* Segundo WRATHALL e SUTMÖLLER (1998), para que uma doença infecciosa seja transmitida pela TE o agente etiológico deve estar presente nas células embrionárias (infecção embrionária verdadeira), em associação com a ZP e/ou nos diferentes fluidos que envolvem o embrião.

A infecção viral em células embrionárias é, ao menos, uma possibilidade muito importante a ser considerada. Uma das possíveis formas dessa infecção é por meio dos gametas, podendo comprometer o embrião, o feto ou, subseqüentemente, o animal recém-nascido. Nesse tipo de infecção o patógeno pode estar associado ao oócito, no momento da fertilização, ou ser carregado para o seu interior por meio da fusão com o espermatozóide. Desse modo, a infecção pode ocorrer antes ou durante a fertilização (WRATHALL e SUTMÖLLER, 1998).

Embora exista a evidência da presença do BVDV em oócitos e em células do *cumulus oophorus* dos folículos em desenvolvimento de vacas PI, poucos patógenos, entre eles os vírus, têm sido apontados como agentes causadores de infecção nos oócitos. Muitos microrganismos que podem ser encontrados no sêmen, na realidade não estão associados aos espermatozóides e sim, livres no fluido seminal ou em leucócitos. Portanto, em contraste com a real possibilidade de transmissão de doenças, o uso de

sêmen contaminado, quando adequadamente processado de acordo com as normas sanitárias internacionais, oferece risco sanitário mínimo para os embriões (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a).

Outra forma de infecção dos embriões é representada pelos vírus presentes no trato reprodutivo da fêmea, tanto como resultado da infecção do tecido ovariano, quanto dos fluidos que envolvem os embriões *in vivo* no ovário, oviduto ou útero. Devido ao contínuo contato com o embrião, desde o momento da coleta até a transferência, todos os fluidos utilizados *in vitro* para a lavagem, cultura e congelamento também podem ser fontes de contaminação viral, estabelecendo estreita proximidade com o embrião até o momento da transferência (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000b).

Com relação à infecção do embrião em seu ambiente *in vivo* ou *in vitro*, um dos principais pontos de resistência aos patógenos é a ZP. A ZP é uma matriz extracelular única que envolve o oócito e também o embrião em sua fase inicial, e que confere especificidade na fertilização, bloqueio à polispermia e proteção durante os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. A maioria dos patógenos é incapaz de penetrar a ZP intacta e infectar as células dos embriões coletados (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000c).

Na TE a doadora, a receptora e o embrião são todos hospedeiros potenciais de infecção. Os agentes etiológicos de doenças infecciosas podem ser intrínsecos ou extrínsecos ao hospedeiro. Sendo o embrião o principal hospedeiro a ser considerado, os fatores intrínsecos mais importantes são a resistência primária, conferida pela ZP, e a resistência secundária, promovida pela idade do embrião, que na coleta para a transferência em bovinos é de seis a oito dias, ou seja, antes da eclosão da ZP. O embrião com a ZP intacta, e livre de material aderente, é mais propenso a estar livre de microrganismos infecciosos (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000a).

ARCHBALD *et al.* (1979) avaliaram os embriões produzidos por vacas superovuladas e que foram inoculadas com o BVDV no lúmen dos cornos uterinos sete dias após a IA. Oito dos 12 embriões, colhidos três dias após a inoculação, apresentavam início de degeneração. A ZP, quando observada ao microscópio eletrônico, mostrava-se normal. Porém, aderidas à ZP foram observadas estruturas morfológicamente semelhantes ao vírus. Embora esse estudo tenha sido pioneiro na exposição *in vivo* de embriões ao BVDV, a degeneração do embrião não significou necessariamente a infecção e sim, foi o resultado do desenvolvimento de um ambiente uterino hostil, com conseqüente inibição do desenvolvimento embrionário normal.

Outro estudo demonstrou a ineficiência reprodutiva de sete doadoras PI, ocasionada pela não resposta a superestimulação, com conseqüentes falhas nas concepções (BROCK *et al.*, 1997).

Embriões com a ZP intacta, provenientes de doadoras natural ou artificialmente infectadas, foram

experimentalmente contaminados *in vitro* com BoHV-1, BVDV, vírus da língua azul ou com o vírus da febre aftosa, seguindo-se um período de cultivo que permitisse a replicação viral. Após a exposição os embriões foram lavados para a diluição dos agentes virais e tratados com tripsina, de acordo com as recomendações da IETS e nenhum desses embriões de pré-implantação apresentou infecção. Esse resultado sugere que, em embriões adequadamente manipulados, é altamente improvável que os vírus sejam capazes de atravessarem a ZP intacta e provocarem efeito deletério no desenvolvimento embrionário (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000c).

Um fator a ser considerado com relação às inoculações experimentais realizadas *in vitro* é a forma pela qual o vírus interage com o embrião, pois essa nunca será igual ao ambiente *in vivo*. O meio no qual o embrião fica exposto ao vírus pode conter diferentes concentrações de enzimas, provenientes dos fluidos oviductais e uterinos, alterando a interação entre os dois (BOOTH *et al.*, 1999).

Entretanto, enquanto está claro que a ZP intacta atua, antes da eclosão, como barreira mecânica que protege as células embrionárias da maioria dos patógenos, ela também pode agir como veículo passivo para os mesmos. Apesar da demonstração de que a maioria dos microrganismos patogênicos não atravessa a ZP intacta, alguns vírus (ex. BoHV-1) podem aderir-se a essa estrutura. Nessa situação, pode ocorrer a infecção da receptora quando o embrião, juntamente com o vírus aderido, for transferido, assim como também a infecção do próprio embrião quando ocorrer a sua eclosão. A natureza dessa aderência e como a ZP atrai e carrega o agente infeccioso é desconhecida e é uma área crucial para futuras investigações. No entanto, quando aderidos à superfície do embrião os vírus somente são vulneráveis a tratamentos realizados com os objetivos de removê-los ou inativá-los. Vários experimentos demonstraram que, em embriões bovinos, os tratamentos realizados com o objetivo profilático podem ser realizados com sucesso (WRATHALL e SUTMÖLLER, 1998; STRINGFELLOW, 1998; BOOTH *et al.*, 1999).

*Estratégias de controle da infecção viral em embriões transferidos:* Somente três vírus, o vírus da estomatite vesicular, o BoHV-1 e o BoHV-4 foram associados com a capacidade de aderência aos embriões bovinos (STRINGFELLOW *et al.*, 1991). A ZP possui receptores para esses vírus que só podem ser inativados ou removidos por tratamentos com soro hiperimune ou, preferencialmente, com a enzima proteolítica tripsina. Dois pontos importantes a serem considerados sobre o tratamento com essa enzima é que ela não é recomendada para o controle de patógenos que não se aderem à ZP e que o seu uso não deve substituir as precauções sanitárias, que devem ser rigorosamente observadas em todas as etapas da TE (GUERIN *et al.*, 1997; THIBIER, 2001).

Na lavagem dos embriões obtidos *in vivo* e com a ZP intacta, de acordo com as diretrizes descritas pela IETS, o processo de 10 a 12 trocas do meio de lavagem, em diluição de 1:100 entre elas, removerá a maioria dos microrganismos. Ressalta-se que tal procedimento somente deverá ser realizado em embriões com a ZP intacta e livre de material aderente (STRINGFELLOW, 1998).

Segundo a IETS, atualmente ainda não existem métodos não-letais disponíveis para avaliar a presença de agentes infecciosos nos embriões, anteriormente à transferência para as receptoras. As opções para a certificação do estado de sanidade embrionária incluem testes específicos no animal doador, lavagem ou tratamento dos embriões com tripsina e o teste de amostras relacionadas com a coleta, que também podem ser indicadoras da sanidade dos embriões (STRINGFELLOW, 1998).

Entre as amostras a serem testadas estão: i) o líquido da coleta ("lavagem uterina"), que fornece a indicação da presença de microrganismos patogênicos no útero da doadora que podem ocasionar a infecção dos embriões; ii) o meio de lavagem, que pode ser um indicador da possível exposição das fêmeas receptoras aos patógenos quando os embriões forem transferidos; e iii) os oócitos não-fecundados e embriões não-transferíveis da mesma coleta. A análise desse material visa a detecção dos patógenos aos quais os embriões transferíveis podem ter sido expostos e também avaliar a eficiência do processo de lavagem.

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de identificar a presença de microrganismos patogênicos em embriões bovinos com a ZP intacta, ou em óvulos e meio de lavagem uterina recuperados de doadoras infectadas ou soropositivas. Os resultados dessas análises têm demonstrado que agentes infecciosos podem ser freqüentemente encontrados no líquido de lavagem e/ou de tratamento com tripsina. Porém até o momento, esses microrganismos não foram isolados dos embriões ou óvulos, indicando assim a efetividade do processo de lavagem (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000b).

Várias técnicas têm sido empregadas para o diagnóstico das doenças virais que comprometem a eficiência da reprodução em bovinos. Entre elas observa-se grande variabilidade nas taxas de sensibilidade e especificidade, bem como de praticidade e rapidez de resultados. Os recentes avanços em métodos de biologia molecular têm proporcionado novas oportunidades para a realização do diagnóstico de uma gama de microrganismos de forma sensível, específica e rápida. A técnica mais utilizada com esse objetivo tem sido a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que possibilita a amplificação de segmentos do genoma viral a partir de diferentes tipos de material biológico. Mesmo os vírus que apresentam o estado de latência, como é o caso do BoHV-1, ou que tenham sido inativados, podem ser detectados pela PCR (TAKIUCHI *et al.*, 2003 e 2005; PILZ *et al.*, 2005).

A PCR vem sendo adotada em todo o mundo para o diagnóstico e também para a realização de análises moleculares de microrganismos patogênicos particularmente devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez de resultados, que podem ser obtidos em até 24 h. A PCR é também uma alternativa prática capaz de detectar a presença de vírus nos mais variados tipos de amostras biológicas. A PCR apresenta vantagens adicionais quando comparada ao isolamento viral em cultivo celular, pois essa técnica além de laboriosa exige a presença de partículas virais viáveis, ou seja, infectantes (MEYER *et al.*, 2003; TAKIUCHI *et al.*, 2005). A PCR possibilita ainda a detecção de baixos títulos virais em embriões, fluidos uterinos e líquidos de lavagem, nem sempre detectados por uma série de métodos de diagnóstico, tornando-se dessa forma uma ferramenta indispensável para a avaliação da sanidade dos embriões produzidos pela técnica de TE (GIVENS *et al.*, 2001).

De acordo com a IETS, um amplo programa de TE preconiza que os rebanhos de doadoras e receptoras sejam avaliados quanto à possibilidade da ocorrência de algumas doenças infecciosas. É recomendável que tanto as doadoras quanto as receptoras, apresentando ciclos normais, sejam examinadas com relação à saúde geral e reprodutiva. Todas as drogas utilizadas devem estar de acordo com as regulamentações nacionais e locais. O sêmen a ser utilizado deve atender a todas as recomendações técnicas vigentes no país ou estarem de acordo com as normas de comercialização internacional (MAPLETOF e STOOKEY, 1998).

A coleta dos embriões deve ser realizada em condições de assepsia. Na coleta não-cirúrgica, o períneo e a vulva devem ser higienizados antes da introdução do cateter. Os líquidos, recipientes e instrumentos utilizados na irrigação do útero e coleta dos embriões devem estar estéreis.

Em resumo, existem riscos teóricos para a transmissão de doenças infecciosas por meio da TE. Entretanto, apesar do número considerável de embriões transferidos anualmente em todo o mundo, com as recomendações da IETS constantes no Código da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), casos comprovados de agentes infecciosos transmitidos por meio de embriões *in vivo* ainda não foram relatados (THIBIER, 2001).

O uso de embriões processados (lavados e/ou tratados com tripsina) justifica-se pelo: i) custo relativamente baixo; ii) a facilidade de incorporação no esquema de produção de embriões e iii) a efetividade demonstrada após a exposição a uma gama de diferentes patógenos de bovinos (STRINGFELLOW e GIVENS, 2000c).

Portanto, é de grande importância a ética e a excelência técnica dos responsáveis por esses procedimentos. Não somente as condutas técnicas devem ser realizadas de acordo com as recomendações. Também se faz necessária a certificação de que os meios, os reagentes e os

equipamentos, assim como o ambiente de trabalho, estejam livres de microrganismos infecciosos.

### Agradecimentos

Os recursos financeiros utilizados para a realização desse trabalho foram obtidos nas seguintes agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e Fundação Araucária (FAP/PR).

### Referências

- ARCHBALD, L.F.; FULTON, R.W.; SEGER, C.L.; ALBAGDADI, F.; GODKE, R. Effect of the bovine viral diarrhoea (BVD) virus on preimplantation bovine embryos: a preliminary study. **Theriogenology**, v.11, p.81-88, 1979.
- BOOTH, P.J.; COLLINS, M.E.; JENNER, L. Association of non-cytopathogenic BVDV with bovine blastocysts: effects of washing, duration of viral exposure and degree of blastocyst expansion. **Veterinary Record**, v.144, p.150-152, 1999.
- BROCK, K.V.; LAPIN, D.R.; SKRADE, D.R. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **Theriogenology**, v.47, p.837-844, 1997.
- FLORES, E.F.; WEINBLER, R.; VOGEL, F.G.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.25, n.3, p.125-134, 2005.
- FRAY, M.D.; PATON, D.J.; ALENIUS, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.615-627, 2000.
- FRAY, M.D.; MANN, M.E.; BLEACH, E.C.; KNIGHT, P.G.; CLARKE, M.C.; CHARLESTON, B. Modulation of sex hormone secretions in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. **Reproduction**, v.123, n.2, p.281-289, 2002.
- GIVENS, M.D.; GALIK, P.K.; RIDELL, K.P.; STRINGFELLOW, D.A. Validation of a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) to detect bovine virus diarrhoea virus (BVDV) associated with in vitro-derived bovine embryos and co-cultured cells. **Theriogenology**, v.56, p.787-799, 2001.
- GUERIN, B.; NIBART, M.; MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. **Theriogenology**, v.47, p.33-42, 1997.
- HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, v.64, p.89-107, 1999.
- LAGE, A.P. Aspectos sanitários em doadoras e receptoras de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.4, p.539-549, 1999.
- MAPLETOF, R.J.; STOOKEY, J.M. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção in vivo de embriões. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed., Savoy IL: IETS, 1998. p.57-70.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Estatística. Agricultura Brasileira em Números – Anuário 2003. Rebanho Bovino Brasileiro. www.agricultura.gov.br. Acesso em 03.09.05
- MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. **Ciência Rural**, v.30, n.2, p.347-350, 2000.
- MEYER, A.D.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; PITUCO, M.E.; OKUDA, L.; CASTRO, A.M.M.G.; RICHTZEINHAIN, L.J. Comparação das técnicas de isolamento viral e Nested PCR na detecção do BHV-1 em sêmen bovino experimentalmente e naturalmente contaminado. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.2, p.143-146, 2003.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.2, p.223-228, 1986.
- NETTLETON, P.F.; ENTRICAN, G. Ruminant pestiviruses. **British Veterinary Journal**, v.151, p.615-642, 1995.
- NISKANEN, R.; ALENIUS, K.; BELÁK, K.; BAULE, S.; BELÁK, S.; VOGES, H.; GUSTAFSSON, H. Insemination of susceptible heifers with semen from a non-viraemic bull with persistent bovine viral diarrhoea virus infection localized in the testes. **Reproduction of Domestic Animals**, v.37, p.171-175, 2002.
- OIE, World Organization of Animal Health. Report of the Meeting of the OIE Terrestrial Animal Health Standards Commission. **Categorization of Diseases and Pathogenic Agents by the International Embryo Transfer Society**, Paris, 17-28 January 2005.
- PILZ, D.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina Ciências Agrárias**, v.26, n.2, p.211-220, 2005.
- REICHENBACH, H.D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. **Acta Scientiarum Veterinariae**, supl.31, p.15-27, 2003.
- RICHTZEINHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A.; LEITE, R.C.; WEIBLER, R.; MORO, E.; UMEHARA, O. Pesquisa de anticorpos séricos contra o herpesvírus bovino tipo 1 em fêmeas bovinas de propriedades com histórico de problemas reprodutivos, localizadas em 21 estados brasileiros. **Arquivos de Instituto Biológico**, v.66 (supl.) p.127, 1999.

- RUDAN, N.B; CVETNIC, S; MADIC, J; RUDAN, D. Prevalence of antibodies to IBR and BVD viruses in dairy cows with reproductive disorders. **Theriogenology**, v.51, n.5, p.875-881, 1999.
- STRAUB, O.C. Infectious bovine rhinotracheitis virus. In: DINTER, Z. e MORUN, B. **Virus Infectious of Ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1990. p.71-108.
- STRINGFELLOW, D.A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos *in vivo*. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Savoy IL: IETS, 1998. p.83-88.
- STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. **Theriogenology**, v.53, p.85-94, 2000a.
- STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Preventing disease transmission through the transfer of *in-vivo*-derived bovine embryos. **Livestock Production Science**, v.62, p.237-251, 2000b.
- STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. Epidemiologic concerns relative to *in vivo* and *in vitro* production of livestock embryos. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.629-642, 2000c.
- STRINGFELLOW, D.A.; RIDELL, K.P.; ZUROVAC, O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. **New Zealand Veterinary Journal**, v.39, p.8-17, 1991.
- TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, p.203-209, 2001.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (*semi-nested* PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, P.43-56, 2003.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, v.79, n.1, p.85-88, 2005.
- THIBIER, M. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. **Theriogenology**, v.56, p.1465-1481, 2001.
- THIBIER, M. A contrasted year for the world activity of the animal transfer industry: a report from the IETS data retrieval committee. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v.20, n.4, p.13-19, 2002.
- THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. Data Retrieval Committee Annual Report. [www.iets.org/pdf/data\\_retrieval/december2004.pdf](http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2004.pdf). Acesso em 03.09.05
- VIANA, F.C. Transferência de embriões: I- Principais aspectos epidemiológicos da interação agentes infecciosos/embriões bovinos. II- Normas internacionais de importação/exportação de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, n.4, p.263-277, 1990.
- WRATHALL, A.E.; SUTMÖLLER, P. Potencial da transferência de embriões para controlar a transmissão de doenças. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed., Savoy IL: IETS, 1998. p.17-46.

Recebido para publicação: 05/01/2006  
 Aprovado: 20/06/2006