



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RISCO DE TRANSMISSÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO PELO SÊMEN NO BRASIL

DANIELA PACHECO DE LACERDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/2013**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RISCO DE TRANSMISSÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO PELO SÊMEN NO BRASIL

DANIELA PACHECO DE LACERDA

**ORIENTADOR: PROF. DR. VÍTOR SALVADOR PICÃO
GONÇALVES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 064/2013

**BRASÍLIA-DF
FEVEREIRO/2013**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

LACERDA, D. P. **Risco de transmissão de herpesvírus bovino pelo sêmen no Brasil**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 22p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado, empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lacerda, Daniela Pacheco

Risco de transmissão de herpesvírus bovino pelo sêmen no Brasil /

Daniela Pacheco de Lacerda orientação de Vítor Salvador Picão

Gonçalves - Brasília, 2013. 22p.

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013

1. Herpesvírus bovino tipo 1. 2. Sêmen. 3. Risco de transmissão. 4. Reprodução. I. LACERDA, D.P. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

RISCO DE TRANSMISSÃO DE HERPESVÍRUS BOVINO PELO SÊMEN NO BRASIL

DANIELA PACHECO DE LACERDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
ANIMAL COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADO POR:

VÍTOR SALVADOR PICÃO GONÇALVES, Prof. Dr. (UnB)
(ORIENTADOR)

JORGE CAETANO JÚNIOR, Dr. (MAPA)
(EXAMINADOR EXTERNO)

KARINA LEITE MIRANDA GUIMARÃES, Dra (EMATER-DF)
(EXAMINADORA EXTERNA)

Brasília-DF, 07 de Fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus passos e me proporcionar constantes oportunidades de crescimento.

A minha família, pelo carinho e alicerce.

A meu marido, pelo companheirismo, estímulo e compreensão.

Às amigas da Vet, Larissa, Patrícia, Bruna e Ana Lourdes, pelas sugestões e risadas.

A meu orientador, pelo exemplo e, sobretudo, pela paciência!!!

Aos colegas do MAPA, em especial à Beronete, pelo incentivo e colaboração nessa trajetória.

À Dra Maristela e ao Randy, do Instituto Biológico, pelo apoio à execução deste trabalho.

Aos pesquisadores e aos representantes do setor privado consultados, pelos dados fornecidos.

Aos professores e servidores do Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, pela atenção e conhecimentos transmitidos.

" O voo do homem através da vida é sustentado
pela força dos seus conhecimentos."

Santos Dumont

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	VIII
Lista de Figuras	VIII
Capítulo I	01
Introdução	01
Objetivos	02
Referências	02
Capítulo II	03
Resumo	03
Abstract	03
Introdução	04
Metodologia	05
Resultados	13
Discussão e conclusões	15
Referências	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Interpretação dos resultados das variáveis qualitativas que compõem o modelo de avaliação de risco	8
TABELA 2	Combinação de probabilidades obtidas das variáveis qualitativas que compõem o modelo de avaliação de risco	8

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Árvore de cenários referente à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da IA	6
FIGURA 2	Árvore de cenários referente à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da TE	7
FIGURA 3	Árvore de cenários referente à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da PIV	7
FIGURA 4	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da IA, para a Situação 1	13
FIGURA 5	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da IA, para a Situação 2	14
FIGURA 6	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da TE, para a Situação 1	14
FIGURA 7	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da TE, para a Situação 2	15
FIGURA 8	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da PIV, para a Situação 1	15
FIGURA 9	Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da PIV, para a Situação 2	16

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) é uma das doenças da esfera reprodutiva mais importantes economicamente e está amplamente disseminada em muitos países, inclusive no Brasil. As altas prevalências associadas aos efeitos negativos na reprodução e no estado de saúde geral dos animais infectados resultam em significativas perdas econômicas para a indústria pecuária mundial (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

O Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), causador da IBR/IPV, pode ser encontrado no sêmen de animais infectados e ser transmitido através da inseminação artificial, por esse motivo está entre os patógenos para os quais os reprodutores bovinos devem ser testados a fim de ingressarem e se manterem em centros de coleta e processamento de sêmen, segundo recomendações do Código Sanitário para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (OIE, 2012b).

Para garantir a segurança do sêmen destinado à inseminação artificial e demais biotécnicas da reprodução, a utilização de testes rápidos e sensíveis para a detecção deste vírus são cruciais. Dentre os testes preconizados pela OIE para detecção do BoHV-1 no sêmen estão o isolamento viral e a PCR (OIE, 2012a). Relatos têm demonstrado que o sêmen apresenta limitação para isolamento viral em cultura celular devido a suas propriedades citotóxicas, além do isolamento viral ser um método laborioso, demorado e pouco sensível. Logo, a incorporação de testes de PCR no sêmen processado contribui para a melhoria da sensibilidade de detecção do agente e maior agilidade no diagnóstico (WANG et al., 2007).

Tendo em vista que a legislação brasileira atual não estabelece requisitos sanitários em relação ao BoHV-1 para o processamento e comercialização de sêmen bovino e, portanto, mesmo centros que cumprem plenamente as exigências oficiais podem estar contribuindo para a disseminação deste importante agente nos rebanhos nacionais, propôs-se um levantamento da situação atual visando à avaliação da presença deste

agente nas doses de sêmen processadas em estabelecimentos registrados junto ao MAPA. Buscou-se ainda avaliar a probabilidade de transmissão do vírus a um rebanho, considerando as principais etapas de três biotécnicas da reprodução – inseminação artificial convencional, transferência de embriões produzidos *in vivo* e produção *in vitro* de embriões –, no contexto atual e em cenário no qual se adota a PCR como teste de detecção do vírus nas doses de sêmen a serem comercializadas.

OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivos principais:

- Avaliar a probabilidade de transmissão do vírus, a partir de doses de sêmen, a fêmeas bovinas de um rebanho zebuino de corte hipotético, dependendo da biotécnica reprodutiva adotada – inseminação artificial, transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*;
- Comparar as probabilidades de transmissão do vírus com e sem a adoção de teste para detecção do BoHV-1 nas doses de sêmen a serem comercializadas.

REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p.293–302, 2006.
- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012a. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em ago. 2012.
- OIE. Terrestrial Animal Health Code. 2012b. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em ago. 2012.
- WANG, J.; O'KEEFE, J.; ORR, D.; LOTH, L.; BANKS, M.; WAKELEY, P.; WEST, D.; CARD, R.; IBATA, G.; MAANENC, K.V.; THOREN, P.; ISAKSSON, M.; KERKHOF, P. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *Journal of Virological Methods*, v. 144, p.103–108, 2007.

CAPÍTULO II

Risco de transmissão de herpesvírus bovino pelo sêmen no Brasil

Risk of bovine herpesvirus transmission by semen in Brazil

Resumo

A transmissão do herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV), de forma direta ou indireta pelo sêmen, é um risco a ser avaliado e mitigado, tendo em vista os prejuízos sanitários e econômicos provocados por esta doença no rebanho bovino nacional. Apesar do BoHV-1 ser um dos agentes infecciosos para os quais os reprodutores bovinos devem ser testados a fim de ingressarem e se manterem em centros de coleta e processamento de sêmen, segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a legislação brasileira não estabelece requisitos em relação a este agente para coleta, processamento e comercialização de sêmen no país. Foi realizada avaliação qualitativa do risco de transmissão do agente a partir de sêmen contaminado, considerando-se diferentes técnicas de reprodução – inseminação artificial (IA), transferência de embriões produzidos *in vivo* (TE) ou *in vitro* (PIV) – e o atendimento à legislação nacional vigente e às recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Verificou-se risco insignificante de transmissão para receptoras de embriões produzidos *in vivo*, sobretudo devido à segurança conferida pelos procedimentos de manipulação recomendados pela IETS. Na PIV, a probabilidade de transmissão do BoHV-1 para receptoras foi avaliada como extremamente baixa. Já na IA, a probabilidade de transmissão do BoHV-1 à fêmea inseminada é baixa ou moderada, dependendo da adoção ou não de teste laboratorial para detecção do agente nas doses de sêmen a serem comercializadas. Diante do exposto, destaca-se a importância da adequação da legislação nacional de forma a exigir a adoção de método diagnóstico rápido e sensível, como a PCR, como condicionante para a comercialização de sêmen bovino no país.

Palavras-chave: herpesvirus bovino, sêmen, risco

Abstract

The transmission of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1), the causative agent of Infectious Bovine Rhinotracheitis /Infectious Pustular Vulvovaginitis (IBR / IPV), directly or indirectly by semen, is a risk that must be assessed and mitigated, due to the economic and health impact of this disease to the national cattle herd. Despite the fact that BoHV-1 is one of

the infectious agents for which bulls must be tested in order to enter and remain in artificial insemination centers, according to the recommendations of the World Organization for Animal Health (OIE), the Brazilian regulation for collection, processing and distribution of semen in the country does not establish requirements for this pathogen. We undertook a qualitative assessment of risk of transmission of the agent by semen, considering different reproductive biotechnologies – artificial insemination (AI), embryo transfer (ET) or *in vitro* production of embryos (IVP) – and compliance with national regulations as well as with the recommendations of the International Embryo Transfer Society (IETS). The risk of transmission to recipients of embryos produced *in vivo* was negligible, given the security of the manipulation procedures recommended by IETS. With regard to IVP, the probability of transmission of BoHV-1 to recipients was extremely low. The likelihood of transmission of BoHV-1 to female inseminated via AI was low or moderate, depending on whether the semen is PCR tested. There is a case for the adoption of a rapid and sensitive diagnostic method, such as PCR, as a condition for the marketing of bovine semen doses in Brazil.

Key words: bovine herpesvirus, semen, risk

Introdução

O Herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) é o agente causador da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV), doença endêmica na população bovina em muitos países, inclusive no Brasil. As altas prevalências associadas aos efeitos negativos na reprodução e no estado de saúde geral dos animais infectados resultam em significativas perdas econômicas para a indústria pecuária mundial (ACKERMANN; ENGELS, 2006).

Em virtude do caráter latente da infecção em touros, o estresse pode induzir a reativação e a excreção intermitente do vírus no sêmen, permitindo que o agente seja transmitido através da inseminação artificial. Sabe-se que a infecção provocada pela IA com sêmen contaminado por BoHV-1 pode provocar danos diretamente no útero, nos ovários e oviduto, endometrites, redução da taxa de gestação, encurtamento do ciclo estral, infertilidade, reabsorção embrionária e nascimento de bezerras fracas. (MILLER et al., 1986; VAN OIRSCHOT, 1995; VANROOSE; KRUIF; VAN SOOM, 2000).

O BoHV-1 está entre os agentes infecciosos para os quais os reprodutores bovinos devem ser testados a fim de ingressarem e se manterem em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS), de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (2012b), entidade da qual o Brasil é signatário. Segundo Eaglosome e Garcia (1997), dever-se-ia buscar a utilização apenas de touros soronegativos em CCPS. No entanto,

tal medida seria inviável na realidade brasileira, já que o BoHV-1 encontra-se disseminado nos rebanhos e nos CCPS, tendo-se verificado valores superiores ou muito próximos a 40% de prevalência de animais soropositivos em rebanhos brasileiros (VIDOR et al., 1995; RICHTZENHAIN et al., 1999; MÉDICI; ALFIERI; ALFIERI, 2000; BARBOSA; BRITO; ALFAIA, 2005; CAMPOS et al., 2009; DIAS et al., 2013) e acima de 60% de touros soropositivos em CCPS no país (PITUCO, 1988; ROCHA et al., 1994). Ademais, o agente não está necessariamente presente em todos os ejaculados de touros infectados.

Uma vez que não se pode prever quando haverá soroconversão ou reativação e consequente eliminação do BoHV-1 no sêmen de animais residentes nos CCPS, e que tais eventos não são necessariamente acompanhados da presença de sinais clínicos, o diagnóstico direto no sêmen assume importante papel na prevenção da disseminação do vírus pelo sêmen (VAN OIRSCHOT, 1995). A detecção do BoHV-1 no sêmen e o descarte de todas as amostras contaminadas é considerado o procedimento mais importante de controle de sua transmissão, sendo o isolamento viral em cultivo celular o padrão ouro utilizado para detecção do BoHV-1 no sêmen. No entanto, em comparação com o isolamento viral, a PCR é mais sensível e rápida, tendo como desvantagem apenas o fato de que as análises por PCR estão mais sujeitas a resultados falso-positivos decorrentes de contaminação, requerendo, portanto, precaução. O risco de contaminação, no entanto, é mais reduzido quando empregadas novas técnicas de PCR, tais como PCR em tempo real (OIE, 2012a).

Os requisitos sanitários para intercâmbio de sêmen bovino no âmbito do Mercosul já prevêm a adoção da PCR para diagnóstico do BoHV-1 diretamente no sêmen processado, devendo-se submeter à prova, 0,5 ml de cada ejaculado (BRASIL, 2006). No entanto, não se faz nenhuma exigência em relação ao BoHV-1 na legislação que estabelece os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino no país (BRASIL, 2003).

Tendo em vista que a legislação brasileira vigente não exige a realização de exames de diagnóstico para IBR/IPV com vistas à comercialização nacional de sêmen bovino (BRASIL, 2003), que movimenta anualmente quase 7 milhões de doses (ASBIA, 2011), a avaliação da presença deste agente no sêmen processado é um importante subsídio para a discussão dos requisitos sanitários regulamentados no país para a coleta e processamento de sêmen bovino. O presente trabalho teve como objetivo avaliar qualitativamente o risco de transmissão do BoHV-1 por meio do sêmen processado em CCPS, a fêmeas bovinas inseminadas com doses de sêmen contaminadas, ou inovuladas com embriões produzidos, *in vivo* ou *in vitro*, a partir do uso de doses de sêmen igualmente contaminadas.

Metodologia

1. Desenvolvimento de Cenários

Inicialmente, foram identificadas as variáveis associadas ao risco de transmissão do BoHV-1 desde a produção de doses de sêmen até a sua utilização, dependendo da biotécnica de reprodução adotada no rebanho do comprador das doses de sêmen – inseminação artificial convencional (IA), transferência de embriões produzidos *in vivo* (TE) ou produção *in vitro* de embriões (PIV) – baseando-se em dados de detecção do agente no Instituto Biológico de São Paulo - IB, informações do setor produtivo e revisão bibliográfica.

Tais variáveis foram representadas em árvores de cenários (Figuras 1, 2 e 3), para duas possíveis situações. Na Situação 1, considerou-se a não adoção de testes para detecção do agente em doses de sêmen a serem comercializadas. Na Situação 2, considerou-se a adoção da PCR como teste de diagnóstico, sendo permitida apenas a comercialização de doses de sêmen com resultado negativo no teste. As árvores de cenários adotadas neste modelo para avaliação dos riscos baseiam-se nas principais etapas das biotécnicas de reprodução IA, TE e PIV, assumindo-se o atendimento à legislação vigente para coleta e processamento de sêmen no país e às recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (BRASIL, 2003, 2006; IETS, 2009).

Figura 1. Árvore de cenários referente à aquisição de sêmen e às principais etapas da IA.

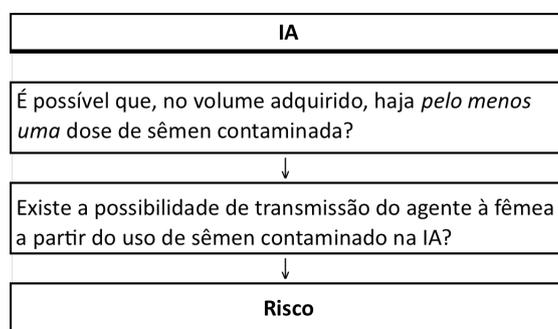


Figura 2. Árvore de cenários referente à aquisição de sêmen e às principais etapas da TE.

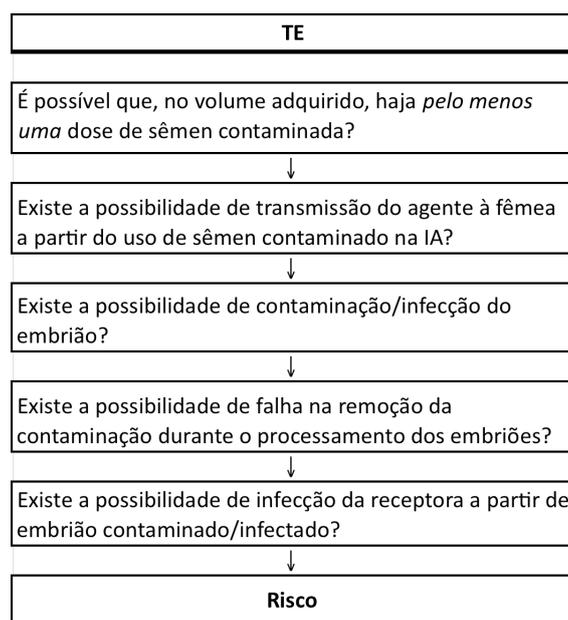
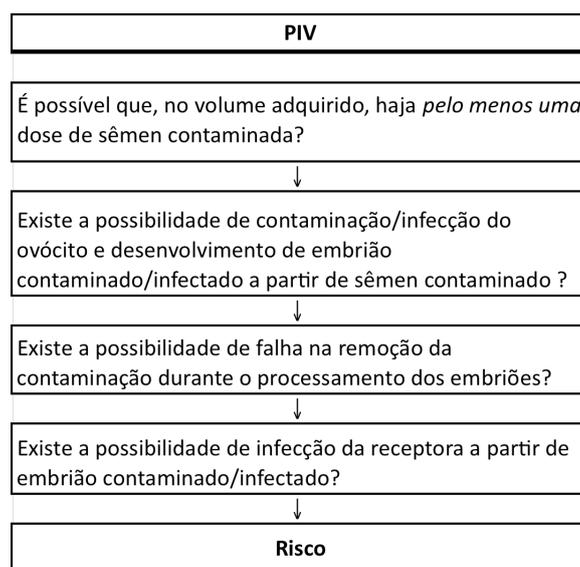


Figura 3. Árvore de cenários referente à aquisição de sêmen e às principais etapas da PIV.



Segundo o método empregado, uma vez que o perigo potencial é identificado, a apreciação qualitativa de riscos é realizada mediante combinação das probabilidades de ocorrência dos eventos representados na árvore de cenários (DUFOUR; MOUTOU; HATTENBERGER, 2003). Para a análise qualitativa dos dados, foi utilizada, neste estudo, a matriz para combinação de probabilidades proposta por EFSA (2007) (Tabelas 1 e 2). Desta forma, cada um dos parâmetros é analisado com base em toda a informação disponível, sendo a probabilidade de ocorrência de cada item avaliada separadamente, para categorização da probabilidade final obtida (insignificante, extremamente baixa, muito baixa, baixa, moderada

e alta). Chegando-se a uma probabilidade resultante na categoria “insignificante”, a avaliação é concluída, não sendo necessária a avaliação dos eventos seguintes.

Tabela 1. Interpretação dos resultados das variáveis qualitativas que compõem o modelo de avaliação de risco (modificado – EFSA, 2007).

Categoria	Definição
Insignificante (I)	Probabilidade de ocorrência do evento tão pequena a ponto de poder ser ignorada.
Extremamente Baixa (EB)	Ocorrência muito rara.
Muito baixa (MB)	Ocorrência rara.
Baixa (B)	Ocorrência improvável.
Moderada (M)	Ocorrência possível.
Alta (A)	Ocorrência esperada.

Tabela 2. Combinação de probabilidades obtidas das variáveis qualitativas que compõem o modelo de avaliação de risco (modificado – EFSA, 2007).

		Resultado da avaliação da variável 1					
		Insignificante	Extremamente Baixa	Muito baixa	Baixa	Moderada	Alta
Resultado da avaliação da variável 2	Insignificante	I	I	I	I	I	I
	Extremamente Baixa	I	I	I-EB	EB	EB	EB
	Muito baixa	I	I-EB	EB	EB-MB*	MB	MB
	Baixa	I	EB	EB-MB*	MB	MB	B
	Moderada	I	EB	MB	MB	B	M
	Alta	I	EB	MB	B	M	A

* A categoria EB-MB combinada com B resulta em EB, enquanto EB-MB combinada com MB ou EB resulta em I-EB.

2. Parâmetros do modelo

2.1. Probabilidade de contaminação das doses de sêmen pelo agente (P)

Foram utilizados dados de detecção por PCR do BoHV-1 em amostras de partidas de sêmen oriundas de CCPS analisadas na rotina do Instituto Biológico no período de 2007 a 2011. Das 10.636 amostras analisadas, com nested PCR (nPCR), 12 foram positivas, proporção esta utilizada como prevalência aparente (PA). Para a estimativa da prevalência

real (P), considerou-se a especificidade (ESP) como 100%, uma vez que todas as amostras positivas no PCR foram confirmadas com isolamento viral, e adotou-se o resultado de sensibilidade (SEN) encontrado por Wang et al. (2008) para PCR em tempo real (qPCR) - 82,7%. Aplicou-se a seguinte fórmula (DOHOO; MARTIN; STRYHN, 2003):

$$P=(PA+ESP-1)/(SEN+ESP-1)$$

Embora os dados de detecção do agente no sêmen do banco do Instituto Biológico, refiram-se a outra técnica, nPCR, Borges (2012) encontrou correlação de 100% entre as técnicas de nPCR e qPCR, em relação à sensibilidade dos testes, ao analisar 75 amostras de sêmen provenientes de CCPS recebidas na rotina de exames do IB, de 2010 a 2011.

2.2. Probabilidade de que, no volume adquirido pelo produtor, pelo menos uma dose de sêmen estivesse contaminada no Cenário 1 (P1)

No Cenário 1, como não se aplica teste de diagnóstico, esta probabilidade foi calculada considerando-se apenas a condição sanitária da amostra (contaminada ou não) e o número de amostras adquiridas. O cálculo, portanto, foi dado por:

$$P1 = 1-(1-P)^{n^{\circ} \text{ de doses adquiridas}}$$

Assumiu-se rebanho hipotético composto por 100 fêmeas zebuínas, não vacinadas contra IBR/IPV, em idade reprodutiva e ciclando. Considerou-se a aquisição, e consequente uso, anual de 2 doses de sêmen por fêmea, o que é compatível com os índices de serviço em rebanho de corte verificados no país, totalizando-se 200 doses de sêmen adquiridas por ano para IA e TE.

No caso da PIV, em função das peculiaridades e eficiência da técnica, adotou-se a aquisição e uso de um número menor de doses de sêmen para tal rebanho. Com o objetivo de quantificar esta diferença de doses a ser adquirida pelo produtor para uso de PIV, formulou-se consulta a Centros de Produção *in vitro* de Embriões registrados no país junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Como resultado obteve-se a informação de que uma dose de sêmen poderia ser o suficiente para fecundar os oócitos provenientes de até 8 fêmeas zebuínas. Tendo em vista a grande variação possível nesta quantidade, considerou-se, no modelo, uma dose de sêmen para cada 5 fêmeas submetidas à técnica.

2.3. Probabilidade de que, no volume adquirido pelo produtor, pelo menos uma dose de sêmen estivesse contaminada no Cenário 2 (P2)

Tendo em vista que não se sabe se as amostras de sêmen estão de fato contaminadas ou não, conhecendo-se apenas o resultado do teste aplicado, faz-se necessário saber a

proporção de amostras com resultado positivo que realmente estão contaminadas - valor preditivo positivo (VPP), e a proporção de amostras com resultado negativo que não estão contaminadas - valor preditivo negativo (VPN). Os valores preditivos não são exclusivamente propriedades do teste de diagnóstico, sendo determinados não apenas pela SEN e pela ESP, mas também pela prevalência da doença na população testada (DOHOO; MARTIN; STRYHN, 2003).

Neste modelo, não foi dada atenção ao VPP, uma vez que, detectada pelo menos 1 amostra de sêmen contaminada, a partida da qual ela é oriunda não será comercializada no Cenário 2. Já o VPN é importante para informar a confiança no resultado negativo do teste de diagnóstico aplicado. Para o cálculo do VPN, considerou-se a probabilidade de que as amostras de sêmen estejam contaminadas (P), a sensibilidade adotada para o cálculo dos parâmetros anteriores do modelo (SEN), e como especificidade mínima da PCR (ESP), assumiu-se 1-PA (99.89%). Optou-se por não se utilizar o valor de especificidade encontrado por Wang et al. (2008) - 93.6% (IC 95% 85.9%–95.7%) - e em outras referências na literatura, para BoHV-1, pelo fato de os valores serem incompatíveis com a proporção de amostras com resultado positivo detectada na análise do IB para BoHV-1. Empregou-se então a seguinte fórmula (DOHOO; MARTIN; STRYHN, 2003):

$$\text{VPN} = (\text{ESP}(1-\text{P})) / (\text{ESP}(1-\text{P}) + (1-\text{SEN})\text{P})$$

Após encontrar o VPN, o cálculo da probabilidade de que, no volume total de doses de sêmen adquirida por um produtor, pelo menos uma dose estivesse contaminada, foi dado por:

$$\text{P2} = 1 - \text{VPN}^{\text{n}^\circ \text{ de doses adquiridas}}$$

2.4. Probabilidade de transmissão do agente à fêmea a partir do uso de sêmen contaminado – IA e TE

A probabilidade de transmissão do BoHV-1 à fêmea por IA depende da quantidade de vírus por palheta e de propriedades da cepa viral (VAN OIRSCHOT, 1995), mas diversos autores sugerem uma fácil transmissão, apontando para uma probabilidade moderada a alta (VAN OIRSCHOT, 1995; EAGLESOME; GARCIA, 1997; BIELANSKI; LALONDE; ALGIRE, 2008).

2.5. Probabilidade de infecção ou contaminação do embrião na TE

Considerou-se infecção ou contaminação do embrião a presença do agente nas células embrionárias (infecção embrionária verdadeira), em associação com a zona pelúcida (ZP) e/ou nos diferentes fluidos que envolvem o embrião (IETS, 2009).

Mertens et al. (2007), Vanroose et al. (1999) e Vanroose, Kruif e van Soom (2000) encontraram evidências de que o diâmetro do BoHV-1 é maior que o tamanho dos poros internos da zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro*, os quais já são maiores do que os poros encontrados nos embriões produzidos *in vivo*, o que indica que é improvável a passagem passiva destes agentes pela ZP e a infecção de células embrionárias por este vírus. No entanto, embora controverso, em teoria, vírus aderido à ZP ou ao espermatozoide poderia ser carregado pelo espermatozoide para dentro do oócito no momento da fertilização (VANROOSE; KRUIF; VAN SOOM, 2000). Segundo Wrathall, Simmons e Van Soom (2006), a penetração de vírus em oócitos bovinos, através da ZP, carregado por espermatozoide no momento da fertilização nunca foi descrita, sendo considerado mais provável que quando o BoHV-1 está associado ao espermatozóiide, a ligação deste com a ZP é inibida, de modo que a fertilização tenderia a ser por um espermatozóiide não infectado, em vez de um por um infectado (VANROOSE et al., 1999; VANROOSE, KRUIF, VAN SOOM, 2000). Outro possível momento de infecção dos embriões pelo BoHV-1 se dá após a eclosão, caso o agente esteja presente nos fluidos que envolvem o embrião ou associado externamente à ZP, entretanto, diversos estudos relatam morte embrionária nestes casos (MILLER, 1991; BOWEN et al., 1985; BIELANSKI et al., 1987; WRATHALL; SUTMOLLER, 1998).

Em estudo citado por Wrathall, Simmons e van Soom (2006) como o único em que se coletou embriões especificamente de vacas que haviam sido inseminadas com sêmen contendo BoHV-1, das duas doadoras, uma não produziu embriões e a outra produziu dois embriões, que não se desenvolveram, mas estavam livres do vírus.

Ainda que mais pesquisas sobre as interações entre o vírus e espermatozóiides em bovinos sejam necessárias, tendo em vista que o BoHV-1 já foi encontrado nos ovários, líquido folicular, células uterinas/lavados, células do cumulus-oócito e oócitos de fêmeas infectadas, natural ou artificialmente (BIELANSKI; DUBUC, 1994; GUERIN et al., 1989), considerou-se possível a infecção ou contaminação dos embriões – categoria moderada.

2.6. Probabilidade de contaminação ou infecção do ovócito e desenvolvimento de embrião contaminado ou infectado a partir de sêmen contaminado – PIV

Numerosos experimentos *in vitro-in vitro* – nos quais oócitos colhidos de uma doadora não infectada são expostos ao agente infeccioso *in vitro* e então avaliados *in vitro* – têm sido conduzidos para prover dados sobre a interação de oócitos e embriões com o BoHV-1 e outros agentes virais. Em muitos casos, esses dados foram gerados com base no pior cenário criado experimentalmente pela exposição dos oócitos e embriões PIV a agentes infecciosos, frequentemente com títulos excedendo aqueles que ocorrem em animais naturalmente infectados (IETS, 2009). Expondo oócitos e embriões PIV a altas concentrações de BoHV-1 (10^{4-10} TCID₅₀/ml – dose infectante em cultura de tecido 50%), foi permitida a

fixação desse vírus à ZP intacta (BIELANSKI; DUBUC, 1994; BIELANSKI; DUBUC, 1993; GUERIN et al.,1990; VANROOSE et al.,1999).

Entretanto, a utilização no sistema PIV de sêmen contendo BoHV-1, compromete claramente as taxas de fecundação e o desenvolvimento de embriões, impedindo os espermatozoides de se fixarem à ZP ou alterando as organelas celulares dos embriões, apresentando efeito citopático e tornando-os inviáveis, levando-os a serem descartados (GUERIN et al., 1989; GUERIN et al., 1992; BIELANSKI; DUBUC, 1993; BIELANSKI; DUBUC, 1994; ALLIETA et al., 1995; BOOTH et al., 1998; VANROOSE et al.,1999; TANGHE et al., 2005; MAKAREVICH et al., 2007).

Diante dos relatos na literatura, apesar de alta a probabilidade de contaminação ou infecção do ovócito ou embrião produzido *in vitro*, considerou-se improvável o desenvolvimento de embrião contaminado ou infectado a partir de sêmen contaminado com vistas a ser transferido para uma receptora, classificando-se a probabilidade deste evento como baixa.

2.7. Probabilidade de falha na remoção da contaminação durante o processamento dos embriões – TE e PIV

Mesmo com um volume expressivo de 600.000 embriões produzidos *in vivo* transferidos anualmente no mundo (STROUD; CALLESEN, 2012), não há na literatura, relatos de transmissão do agente por TE, sobretudo devido à probabilidade insignificante de falha na remoção de eventual contaminação durante o processamento de embriões produzidos *in vivo*. Com base nas conclusões da IETS, o BoHV-1 está listado na categoria de doenças ou agentes patogênicos para as quais há evidência suficiente de que o risco de transmissão é insignificante, desde que os embriões produzidos *in vivo* sejam manuseados adequadamente entre a colheita e a transferência, isto é, manipulados de acordo com as recomendações contidas no Manual da IETS (OIE, 2012b) as quais incluem banhos e tratamento com tripsina.

Esta classificação, no entanto, não se aplica aos embriões produzidos *in vitro*, nos quais a ZP difere estruturalmente daqueles produzidos *in vivo*, além de diferenças nas propriedades de aderência de patógenos (MERTENS, 2007; IETS, 2009). Utilizando-se altas concentrações virais, também superiores aos títulos que ocorrem em animais naturalmente infectados, mesmo após lavagem com tripsina, detectou-se associação do BoHV-1 a embriões produzidos *in vitro* (EDENS et al., 2003; MAKAREVICH et al., 2007; D'ANGELO et al., 2009). Diante disso, classificou-se como baixa a probabilidade de falha na remoção da contaminação de embriões fertilizados *in vitro* com sêmen naturalmente contaminado.

2.8. Probabilidade de infecção da receptora a partir de embrião contaminado ou infectado – TE e PIV

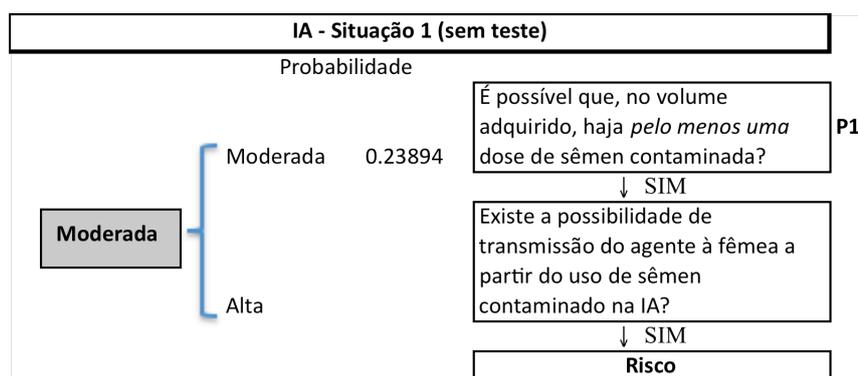
Para embriões produzidos *in vivo*, esta probabilidade é insignificante, conforme mencionado anteriormente.

Já para PIV, há que se considerar que dos 450.000 embriões produzidos *in vitro* transferidos anualmente no mundo (STROUD; CALLESEN, 2012), não há relato de transmissão de qualquer doença resultante da PIV com sêmen contaminado (WRATHALL et al., 2006). Apesar de evidências da presença de patógenos em certa proporção de embriões, lavados e submetidos a procedimentos de desinfecção, a transmissão de doenças por embriões produzidos *in vitro* para receptoras permanece aguardando comprovação, com exceção do BVDV tipo 2 (BIELANSKI et al., 2009). Embora se tenha detectado BoHV-1 associado a grupos de embriões PIV lavados e tratados com tripsina, a quantidade de vírus não foi suficiente para infectar células das tubas uterinas quando aquelas foram expostas ao embrião (EDENS et al., 2003). Assim, com base nas referências consultadas, considerou-se improvável a infecção de receptora de embrião produzido *in vitro*, classificando-se a probabilidade de ocorrência deste evento como baixa.

Resultados

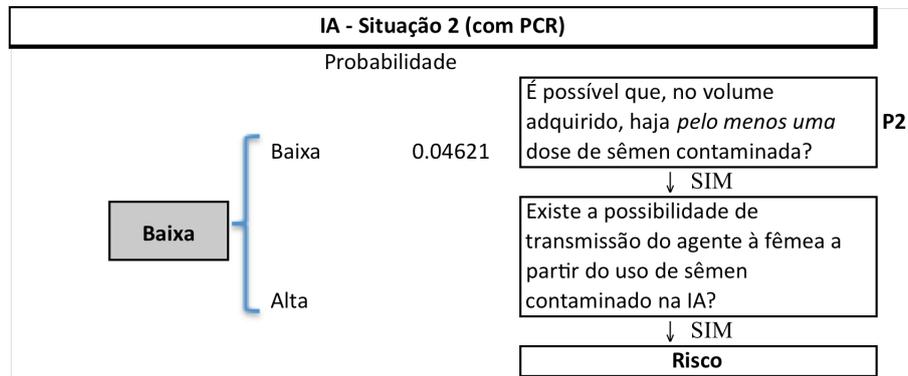
As probabilidades de transmissão do BoHV-1 nas diferentes biotécnicas estão apresentadas nas Figuras 4 a 9, em ambas as situações definidas.

Figura 4. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da IA, para a Situação 1.



Onde, $P1 = 1 - (1 - P)^{n^{\circ} \text{ de doses adquiridas}} = 1 - (1 - 0,00136)^{200}$

Figura 5. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da IA, para a Situação 2.



Onde, $P2 = 1 - VPn^{\text{o de doses adquiridas}} = 1 - 0.99976^{200}$

Figura 6. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da TE, para a Situação 1.

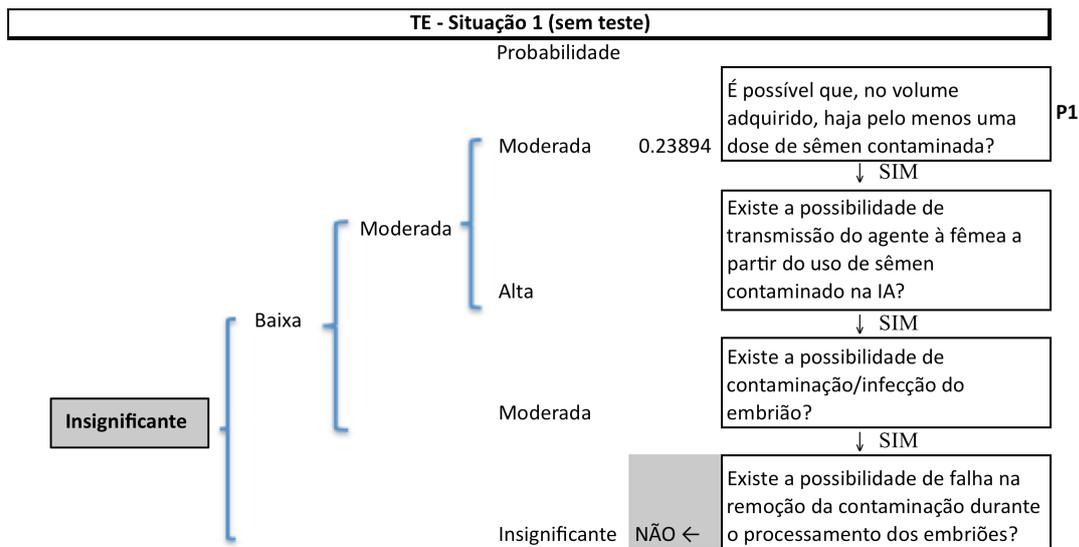


Figura 7. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da TE, para a Situação 2.

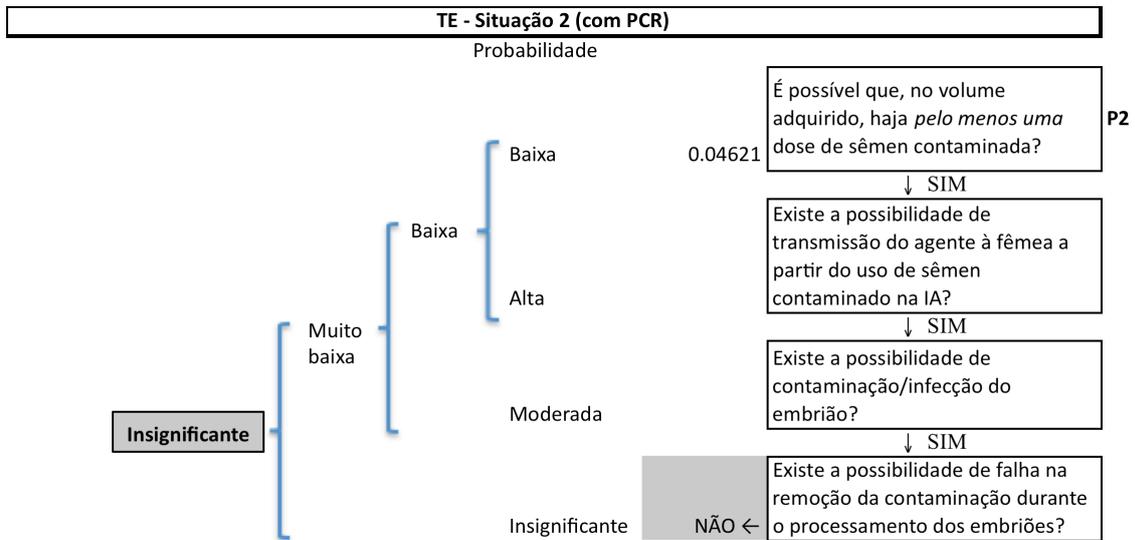
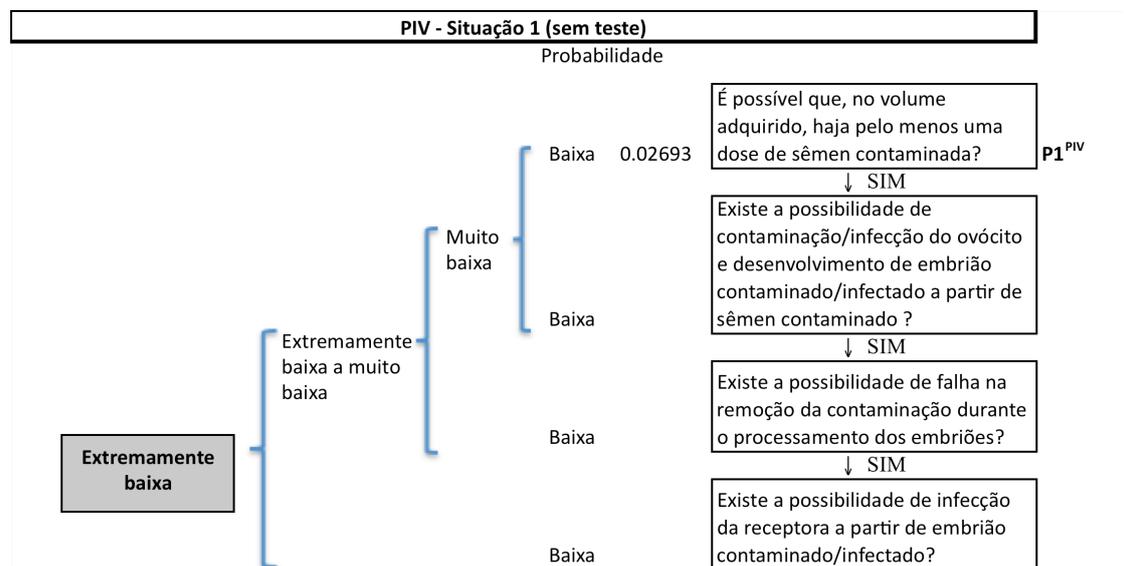
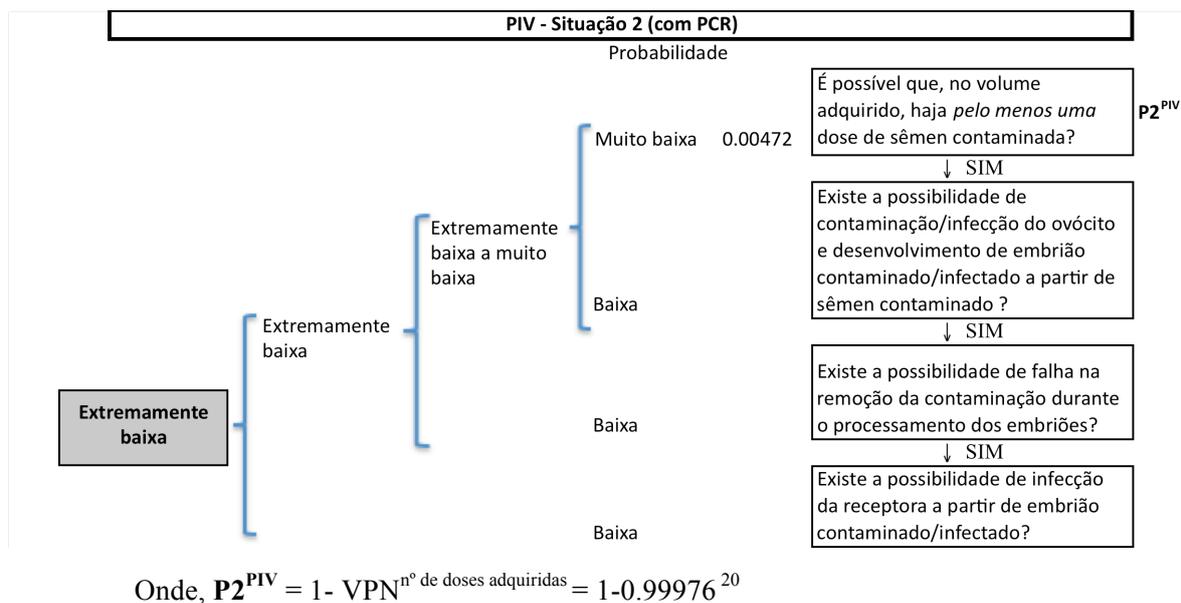


Figura 8. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da PIV, para a Situação 1.



Onde, $P1^{PIV} = 1 - (1 - P1)^{n^{\circ} \text{ de doses adquiridas}} = 1 - (1 - 0,00136)^{20}$

Figura 9. Árvore de cenários com probabilidades referentes à aquisição de doses de sêmen e às principais etapas da PIV, para a Situação 2.



Discussão e conclusões

A combinação de probabilidades em uma avaliação qualitativa é muito variável. A matriz sugerida por EFSA (2007) foi adotada tendo em vista que o número de categorias permite uma melhor discriminação entre as probabilidades baixas, aplicando-se bem ao presente estudo. Além disso, a estrutura desta matriz considera o fato de que as probabilidades variam sempre de 0 a 1. Sendo assim, o resultado da combinação de duas probabilidades é, no máximo, igual à probabilidade mais baixa. Outras matrizes foram avaliadas, no entanto, elas não consideravam este fato (MOUTOU; DUFOUR; IVANOV, 2001) ou o número de categorias era insuficiente para discriminar as probabilidades baixas (GALE et al., 2010).

Na definição quanto à categoria de probabilidade a ser atribuída a cada parâmetro, considerando-se as informações existentes na literatura – mais disponíveis para alguns eventos do que para outros –, buscou-se adotar um perfil conservador e apresentar claramente os critérios adotados e a documentação que embasou cada estimativa. No entanto, não é possível isentar-se de certo grau de subjetividade.

Na IA, verificou-se probabilidade moderada de transmissão do BoHV-1 à fêmea inseminada na Situação 1 (Figura 4) e baixa na Situação 2 (Figura 5), uma vez que a adoção da PCR como condicionante para a liberação das doses de sêmen para comercialização reduz a probabilidade de falha na detecção do agente no sêmen e, conseqüentemente, a

probabilidade de que haja alguma dose de sêmen contaminada no volume de doses a ser adquirido. Para TE, a probabilidade de transmissão do agente às fêmeas receptoras se mostrou insignificante, em ambas as situações (Figuras 6 e 7). No caso da PIV, verificou-se probabilidade extremamente baixa, em ambas as situações (Figuras 8 e 9).

Tais resultados condizem com as conclusões de Wrathall, Simmons e Van Soom (2006), de que o risco sanitário associado à produção de embriões a partir de sêmen de touros infectados é muito inferior do que do que o risco de utilização do sêmen diretamente para inseminação artificial. Além disso, os riscos potenciais de transmissão de doença associados aos embriões bovinos produzidos *in vitro* são apontados por estes autores como mais difíceis de serem evitados, em relação aos embriões produzidos *in vivo*, uma vez que na PIV a infecção ou contaminação ocorre com maior facilidade em qualquer estágio do processo de produção dos embriões.

No caso da IA, a probabilidade inicial de presença do agente nas doses de sêmen, as propriedades do teste de diagnóstico adotado e o volume de doses a ser adquirido exercem maior influência no resultado da avaliação do que na PIV. Ainda que a probabilidade de que, no volume adquirido pelo produtor, pelo menos uma dose de sêmen estivesse contaminada fosse alta na PIV, a probabilidade final variaria de extremamente baixa a muito baixa. Já na TE, em virtude do processamento em concordância com as recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, a situação epidemiológica e a adoção de teste de diagnóstico não influenciam o risco de transmissão do BoHV-1 às receptoras, confirmando que esta biotécnica pode promover uma grande difusão de material genético de alta qualidade de forma bastante segura do ponto de vista sanitário.

Na PIV, a probabilidade de transmissão estimada neste estudo foi extremamente baixa, no entanto, verifica-se um sério comprometimento da eficiência da técnica, o que é particularmente significativo no Brasil, por ser o maior produtor de embriões *in vitro* do mundo (STROUD; CALLESEN, 2012). Essa tecnologia se mostra importante principalmente nos rebanhos brasileiros de corte, onde existe a disponibilidade de receptoras, terra e os produtos obtidos, tanto machos quanto fêmeas, têm valor no mercado.

Em uma análise de risco completa, seguindo a metodologia proposta pela OIE, a probabilidade de transmissão do patógeno avaliada neste trabalho corresponderia à associação das probabilidades de difusão e exposição do patógeno, e seria acompanhada de avaliação das consequências. Tal etapa não foi realizada neste estudo, uma vez que a literatura especializada carece de informações a respeito de índices reprodutivos e produtivos em rebanhos de corte infectados, dificultando que se relacione o efeito do BoHV-1 sobre características de desempenho produtivo de bovinos de corte. No entanto, sabe-se que a

rentabilidade da exploração pecuária de corte está diretamente relacionada ao número de animais nascidos por ano, fator este dependente da performance reprodutiva (DEL FAVA, 2001).

Das 12 amostras de partidas positivas detectadas ao se analisar 10.636 no IB, 11 amostras foram obtidas de 3 animais de um mesmo CCPS, em um período de sete dias, indicando alguma situação de estresse à qual estes animais foram submetidos temporariamente, possivelmente estresse térmico, tendo em vista a época do ano em que estas partidas foram coletadas e o fato dos animais serem de raças europeias. Tal proporção de amostras de partidas com resultado positivo é bem inferior à encontrada por Rocha et al. (1998) – 31,68% –, ao analisarem, por PCR, 101 amostras de partidas de sêmen oriundas de 61 animais de um CCPS brasileiro, com intervalo de 60 dias quando foram coletadas amostras de duas partidas de um mesmo animal. Oliveira et al. (2011), analisando 23 amostras de sêmen, oriundas de 11 animais de um CCPS do Rio Grande do Sul, encontraram proporção também elevada - 21,74% - de amostras com resultado positivo na PCR.

Tendo em vista o caráter intermitente de eliminação do BoHV-1 no sêmen e o fato de que as amostras analisadas no IB com resultado positivo concentraram-se no período de uma semana, oriundas de apenas um CCPS, seria possível encontrar dados semelhantes aos de Rocha et al. (1998) e Oliveira et al. (2011) caso tivesse sido realizado estudo com partidas de sêmen coletadas apenas neste período naquele CCPS, dependendo da amostragem adotada. Entretanto, considerando cinco anos de análises no IB, de partidas de sêmen provenientes de diversos CCPS brasileiros, verificou-se que esta não é a situação esperada ao longo de período mais extenso para um número maior de estabelecimentos.

A maioria das amostras de sêmen analisadas pelo IB no período de 2007-11 é oriunda de CCPS que adotam, por iniciativa própria, testes de diagnóstico direto e indireto de rotina, a fim de acompanhar a situação epidemiológica de seu rebanho residente e condicionar a comercialização a resultados negativos de detecção do agente no sêmen. Medida esta particularmente importante nos CCPS brasileiros, devido às altas prevalências de animais sororreagentes encontradas. Considerando-se que cada partida de sêmen gera, em média, 300 doses de sêmen, tem-se um grande potencial de disseminação do agente nos rebanhos do país em caso de liberação de partidas contaminadas para comercialização.

Os dados de detecção do agente em amostras de sêmen verificados neste estudo não permitem atribuir grau de relevância à inseminação artificial com doses de sêmen processadas em CCPS brasileiros para a manutenção dos índices de prevalência de BoHV-1 encontrados nos rebanhos brasileiros. No entanto, verifica-se a partir da literatura e da avaliação dos programas de controle da IBR/IPV adotados em outros países, importante papel atribuído ao

controle do vírus nos CCPS, dada a participação do touro e, sobretudo, do sêmen na disseminação do agente nos rebanhos. Diante disso, sugere-se a realização de estudos específicos para se avaliar a prevalência de amostras de sêmen contaminadas nos CCPS a fim de se avaliar a real influência da inseminação artificial na prevalência de IBR/IPV no Brasil.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo e a necessidade de se adequar a legislação nacional vigente às recomendações da OIE, recomenda-se a exigência de testes de detecção sensíveis e rápidos para o BoHV-1, tais como a PCR, na rotina de avaliação das doses de sêmen processadas em CCPS no Brasil. Desta forma, espera-se evitar que o produto comercializado contenha um patógeno em condições de produzir infecção, mitigando-se assim o risco de transmissão do BoHV-1 por meio da inseminação artificial e as perdas resultantes do comprometimento da produção de embriões, sobretudo *in vitro*.

Referências

ACKERMANN, M.; ENGELS, M. Pro and contra IBR-eradication. *Veterinary Microbiology*, v. 113, p.293–302, 2006.

ALLIETA, M., GUERIN, B., MARQUANT-LE GUIENNE, B., THIBIER, M. The effect of neutralization of BVD/MD virus present in bovine semen on the IVF and development of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 43, p.156, 1995.

ASBIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen. 18p. 2011. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em jul.2012.

BARBOSA, A.C.V.C.; BRITO, W.M.E.D.; ALFAIA, B.T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, v. 35, p. 1368-1373, 2005.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, J.; LALONDE, A.; NADIN-DAVIS, S. Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, v. 71, p. 499-508, 2009.

BIELANSKI, A.; DUBUC, C. *In vitro* fertilization of bovine oocytes exposed to bovine herpesvirus-1 (BHV-1). *Reproduction of Domestic Animals*, v. 28, p. 285-288, 1993.

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

BIELANSKI, A.; LALONDE, A.; ALGIRE, J. Risk of transmission of bovine herpesvirus (BHV-1) by infected semen to recipients and embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, p. 173, 2008.

BIELANSKI, A.; SINGH, E.L.; HARE, W.C.D. The in vitro exposure to bovine rhinotracheitis virus of zona pellucida-micromanipulated bovine embryos with zona pellucida damaged or removed. *Theriogenology*, v. 28, p. 495 – 501, 1987.

BOOTH, P.J.; COLLINS, M.E.; JENNER, L.; PRENTICE, H.; ROSS, J.; BADSBERG, J.H.; BROWNLIE, J. Noncytopathogenic bovine viral diarrhoea virus BVDV reduced cleavage but

increases blastocyst yield of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v. 50, p. 769 – 777, 1998.

BORGES, S.E.S. *Avaliação da PCR em tempo real e da nested PCR para o diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina*. 2012. 58f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo. 2012.

BOWEN, R.A., ELSDEN, R.P., SEIDEL, G.E. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, p.1095 – 1097, 1985.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 48, de 20 de junho de 2003. Regulamenta os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 10 de março de 2006. Incorpora ao ordenamento jurídico nacional os requisitos zoossanitários para intercâmbio de sêmen bovino e bubalino entre os Estados Partes. [*Diário Oficial da União*], Brasília, DF, 2006.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T; SILVA, A.D; ESTEVES, P.A; ROEHE, P.M; RIJSEWIJK, F.A.M. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 139, p. 67–73, 2009.

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*, v. 44, p. 536-539, 2009.

DEL FAVA, C. *Índices reprodutivos e características de desempenho em bovinos de corte, infectados e não infectados pelo herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1)*. 2001. 127f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

DIAS, J.A.; ALFIERI, A.A.; FERREIRA-NETO, J.S.; GONÇALVES, V.S.P.; MULLER, E.E. Seroprevalence and Risk Factors of Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Parana, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.60, p. 39-47, 2013.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. Charlottetown, Canada: Atlantic Veterinary College. 2003

DUFOUR, B.; MOUTOU, F.; HATTENBERGER A. Qualitative and collegial risk analysis method: an example : bat rabies transmission to man in France. Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 2003. Disponível em: www.sciquest.org.nz. Acesso em ago. 2012.

EAGLESOME, M.D; GARCIA, M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (1), p. 215-225. 1997.

EDENS, M.S.D.; GALIK, P.K.; RIDDELL, K.P.; GIVENS, M.D.; STRINGFELLOW, D.A.; LOSKUTOFF, N.M. Bovine herpesvirus-1 associated with single, trypsin-treated embryos was not infective for uterine tubal cells. *Theriogenology*, v.60, p. 1495–1504, 2003.

GALE, P.; BROUWER, A.; RAMNIAL, V.; KELLY, L.; KOSMIDER, R.; FOOKS, A.R.; SNARY, E.L. Assessing the impact of climate change on vector-borne viruses in the EU through the elicitation of expert opinion. *Epidemiology & Infection*, v. 138, p. 214–225, 2010.

GUERIN, B.; CHAFFAUX, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. IVF and IVC of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. *Theriogenology*, v. 37, p. 217, 1992.

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; ALLIETTA, M.; HARLAY, T.H.; THIBIER, M. Effets de la contamination par le BHV-1 sur la maturation et fécondation in vitro des ovocytes des bovines. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v.66, p. 911–917, 1990.

GUERIN, B.; LE GUIENNE, B.; CHAFFAUX, S.; HARLAY, T.H.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryons fécondés in vitro après infection expérimentale de vaches donneuses par le virus herpès bovin de type 1 (BHV-1). *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 165, p. 827-833, 1989.

IETS. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 4ª Edição. Illinois: IETS, 2009. 175p.

MAKAREVICH, A.V.; PIVKO, J.; KUBOVICOVA, E.; CHRENEK, P.; SLEZAKOV, M.; LOUDA, F. Development and viability of bovine preimplantation embryos after the in vitro infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, v. 15, p. 307–315, 2007.

MEDICI, 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*, vol.30, n.2, p. 347-350, 2000.

MERTENS, E.; BESENFELDER, U.; GILLES, M.; HÖLKER, M.; RINGS, F.; HAVLICEK, V.; SCHELLANDER, K.; HERRLER, A. Influence of *in vitro* culture of bovine embryos on the structure of the zona pellucida. *Reproduction, Fertility and Development*, v.19, p. 211 – 212, 2007.

MILLER, J.M. The effects of IBR virus infections on reproductive function of cattle. *Vet. Med.*, v. 86, p. 790–794, 1991.

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, n. 2, p. 223-228, 1986.

MOUTOU, F.; DUFOUR, B.; IVANOV, Y. A qualitative assessment of the risk of introducing foot and mouth disease into Russia and Europe from Georgia, Armenia and Azerbaijan. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, v.20, p 723–730, 2001.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012a. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em ago. 2012.

OIE. Terrestrial Animal Health Code. 2012b. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em ago. 2012.

OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DIAS, M.M.; VELHO, F.A.; FRENEAU, G.E.; BRITO, W.M.E.D.; RIJSEWIJK, F.A.M.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*, v.75, p. 1139 –1145, 2011.

PITUCO, E. M. *Ocorrência da Rinotraqueíte Infecçiosa dos Bovinos/Vulvovaginite Pustular*

Infecçiosa (IBR/IPV) em rebanhos bovinos criados nos Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. Utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemaglutinação passiva e da Imunofluorescência Indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus Bovino 1. 1988. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1988.

RICHTZENHAIN, L.J.; BARBARINI, O.; UMEHARA, O.; DE GARCIA, A.S.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; FERREIRA, F. Rinotraqueíte infecciosa bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.66, p.83-88, 1999.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos anti-IBR em soro de touros de Central de Inseminação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda. *Resumos...* Olinda: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p. 213.

ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUIMARAES, S.E.F.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M.G. A high sensitivity nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Veterinary Microbiology*, v. 63, n. 1, p. 1-11, 1998.

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. *Animal Reproduction*, v.9, n.3, p.210-216, 2012.

TANGHE, S.; VANROOSE, G.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; YSEBAERT, MT.; KERKHOFS, P.; THIRY, E.; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S.; VAN OOSTVELDT, P.; NAUWYNCK, H. Inhibition of bovine sperm-zona binding by bovine herpesvirus-1. *Reproduction*, v.130, p. 251-259, 2005.

VAN OIRSCHOT, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmission: a brief review. *Veterinary Quarterly*, v. 17, p. 29-33.1995.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; VANOPDENBOSCH, E.; DE KRUIF, A. Effect of bovine herpesvirus-1 or bovine viral diarrhea virus on development of in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 54, p. 255-63, 1999.

VANROOSE, G.; de KRUIF, A; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 131-143, 2000.

VIDOR, T.; HALFEN, D.C.; LEITE, T.E.; COSWIG, L.T. Herpes bovino tipo 1 (BHV 1): Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural*, v.25, p.421-424, 1995.

WANG, J.; O'KEEFE, J.; ORR, D.; ORR, L.; BANKS, M.; WAKELEY, P.; WEST, D.; CARD, R.; IBATA, G.; VAN MAANEN, K.; THOREN, P., ISAKSSON, M., KERKHOFS, P. An international inter-laboratory ring trial to evaluate a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in extended bovine semen. *Veterinary Microbiology*, v.126, p.11-19, 2008.

WRATHALL, A.E.; SIMMONS, H.A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. *Theriogenology*, v. 65, p. 247-274, 2006.

WRATHALL, A.E., SUTMOLLER, P. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Illinois: IETS, 1998. p. 17 - 44.