

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA RESPOSTA VACINAL CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) NOS PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE VACAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO**

Lucimara Antonio Borges

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DA RESPOSTA VACINAL CONTRA O
HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) NOS PARÂMETROS
REPRODUTIVOS DE VACAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO**

Lucimara Antonio Borges

Orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Fevereiro - 2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIMARA ANTONIO BORGES – nascida em 13 de agosto de 1975, no município de São Paulo – SP, filha de Nilton Martins Borges e Teresinha Antonio Borges. Ingressou em fevereiro de 1995 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAV – UNESP – Jaboticabal), concluindo-o em dezembro de 1999. Atuou profissionalmente como Médica Veterinária em clínica de pequenos animais de janeiro a setembro de 2001 e como autônoma na empresa Discopra - distribuidora autorizada Nestlé, realizando atividades de representação comercial e de informação veterinária de setembro de 2001 a setembro de 2003. Posteriormente, foi contratada pela empresa Nestlé Brasil Ltda. atuando como assistente de serviço ao consumidor Nestlé Purina de outubro de 2003 a dezembro de 2005 e como analista de serviço ao consumidor Nestlé Purina de janeiro de 2006 a abril de 2008. Em março de 2009 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na FCAV – UNESP – Jaboticabal.

"O Senhor é o meu Pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos,
guia-me mansamente às águas tranquilas.

Refrigera a minha alma,
guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte
não temeria mal algum, porque tu estás comigo,
a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,
unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia
me seguirão todos os dias de minha vida,
e habitarei na casa do Senhor por longos dias."

Dedico

Aos meus amados pais Nilton e Terezinha por todo amor, carinho e por sempre acreditarem que posso ir mais longe. Amo vocês para sempre!

"...como é grande o meu amor por você!"

Às amadas e inesquecíveis avós Luiza (*in memoriam*) e Gerusa (*in memoriam*), mulheres fortes que me educaram e a quem devo também tudo o que sou. Meu amor por vocês é eterno. Jamais as esquecerei!

Agradeço

A Deus, por sempre estar comigo, por encorajar-me sempre colocar pessoas maravilhosas no meu caminho. Vem comigo sempre!

Aos meus pais, Nilton e Teresinha, que mesmo longe, sempre estiveram presentes me incentivando, aconselhando, emanando seu amor por mim e não permitindo que me sentisse só. Amo vocês!

Ao meu irmão Lúcio por ser minha referência desde minha infância.

Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara por ter aceitado me orientar, pela confiança e por ser tão paciente comigo. Sou eternamente grata.

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado e à Profa. Dra. Adolorata Aparecida Bianco de Carvalho pelos conselhos, amparo, atenção e por serem pessoas tão prestativas com quem quer que bata às suas portas. Muito obrigada!

Ao Prof Dr. Paulo Henrique Franceschini, à Profa. Dra. Sandra Possebon Gatti e ao Dr. Walt Yamasaki por aceitarem participar da banca de qualificação e de defesa e pelas contribuições que fizeram.

Ao médico veterinário Eduardo Muniz de Lima por toda atenção e por disponibilizar toda a ajuda na execução desse projeto, além da amizade dos tempos de graduação, ao médico veterinário Bruno Lima Muniz pela dedicação, paciência e por sempre estar à disposição para me ajudar e ao Sr. Eire Enio de Freitas por permitir a realização desse estudo em suas propriedades. Sem vocês esse trabalho não aconteceria. Serei sempre grata!

À Andrea Souza Medeiros, por tudo o que me ensinou no laboratório, sua paciência e por sempre acreditar em mim. Mais que uma amiga, uma irmã, um alicerce nessa jornada. Você sempre estará no meu coração!

À Heloísa Cristina Silva por ser minha amiga inseparável nos momentos de alegria e tristeza. Saiba que a tenho como minha irmã. Tenho certeza que Deus te pôs no meu caminho. Obrigada por tudo!

À minha amiga-irmã Sany Spínola Aleixo por ser extremamente responsável pela minha volta aos estudos, sempre me incentivando, acreditando em mim e por me acolher quando voltei.

À Kalina por me ajudar na colheita das amostras de sangue e pela amizade.

À Juliana Cristina Baldin pela amizade sincera e inseparável desde o início do mestrado. Mais uma enviada por Deus para me apoiar. Jamais te esquecerei!

Aos bons amigos Marcos Valério, José Roberto, Gian e Maurício pela amizade, companheirismo e pelas boas conversas. Obrigada!

Às irmãs de laboratório Bruna e Ingrid pelos inúmeros ensinamentos, companheirismo e pela amizade e à Mônica Oliveira, mais que uma irmã de laboratório, uma grande amiga que sempre me incentivou e acreditou em mim.

À Carolina Buzzulini pela ajuda desde o início do projeto e por se tornar uma grande amiga. Muito obrigada, Carol!

À Fernanda Senter Magajevski pela amizade e orientação durante todo o mestrado. Obrigada, Fer!

Aos bons amigos Ana Carolina Fávero e Daniel pela ajuda no projeto, pela amizade sincera e pelos bons papos acompanhados de um bom copo de vinho.

Às amigas eternas, amadas e de longa data Cristiana, Roberta e Glaúcia por, mesmo longe, continuarem minhas amigas. Nossa amizade é eterna!

Às amigas Lucimar, Valéria e Andrea por irem ao meu encontro quando regressava a São Paulo, por me ampararem e nunca se esquecerem de mim.

À Luciana Terra e Eliana Gambarato por serem minhas irmãs de faculdade juntamente com Ana Carolina e pelos laços de amizade que nunca se desfazem. Mesmo longe estaremos sempre juntas. Amo vocês, manezadas!

À minha amada afilhada Gabriela pelos beijos e abraços carinhosos e saudosos que recebia quando ia visitá-la o que permitiu não esquecer que sou uma madrinha amada. Te amo, filha!

Aos funcionários da biblioteca, em especial à Tiekó e à Núbia, pela atenção e amizade.

Aos demais professores e funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva pelo convívio.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa e ao Prof. Dr. Gener Tadeu pela realização das análises estatísticas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 OBJETIVOS	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Animais e local de experimentação	13
4.2 Manejo sanitário, reprodutivo e primeira colheita de amostras	13
4.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	14
4.4 Transferência de embriões ou inovulação.....	15
4.5 Exame gestacional, de distúrbios reprodutivos e segunda colheita de amostras.....	15
4.6 Procedimentos laboratoriais	16
4.6.1 Manutenção das culturas celulares	16
4.6.2 Multiplicação do BoHV-1	17
4.6.3 Titulação do BoHV-1	17
4.6.4 Teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1.....	18
4.6.5 Controle das TCID ₅₀	20
4.7 Análise Estatística	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação	24
5.2 Animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e positivos depois da vacinação.....	25

5.3 Animais positivos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação	27
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	36
8 REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Reatividade sorológica dos animais, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, antes e depois da vacinação em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas (A, B e C) localizadas no município de Prata (MG)	22
Tabela 2 Parâmetros reprodutivos dos animais negativos antes e depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).....	24
Tabela 3 Parâmetros reprodutivos dos animais negativos antes e que apresentaram depois da vacinação título baixo (< 16), intermediário (≥ 16 e ≤ 256) ou alto (> 256), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).....	26
Tabela 4 Taxas de prenhez dos animais negativos antes e com os diferentes títulos positivos induzidos depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).....	27
Tabela 5 Animais positivos antes da vacinação, agrupados conforme o título médio geométrico (TMG) entre baixo a intermediário (< 128)	

	e alto (≥ 128), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas localizadas no município de Prata (MG).	27
Tabela 6	Parâmetros reprodutivos dos animais positivos antes e que apresentaram depois da vacinação título baixo (< 16), intermediário (≥ 16 e ≤ 256) ou alto (> 256), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).	29
Tabela 7	Taxas de prenhez dos animais positivos antes e com os diferentes títulos induzidos depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).	30

LISTA DE FIGURA

	Página
Figura 1 Representação da reatividade sorológica dos animais, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, antes e depois da vacinação, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas localizadas no município de Prata (MG)....	23

LISTA DE ABREVIATURAS

- BoHV-1 – Herpesvirus bovino tipo 1
- CL – Corpo lúteo
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- EC – Efeito citopático
- ELISA – Enzyme Linked Inmunosorbent Assay
- IA – Inseminação artificial
- IBR – Rinotraqueíte infecciosa bovina
- IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
- IPV – Vulvovaginite pustular infecciosa
- IPB – Balanopostite pustular infecciosa
- kbp – Kilopares de bases
- MDBK – Madin & Darby bovine kidney
- MEM - Minimum Essential Medium
- mL – Mililitro
- nm - Nanômetro
- OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
- PIV – Produção *in vitro*
- PNCEBT – Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e da Tuberculose Animal
- rpm – Rotação por minuto
- SFB – Soro fetal bovino
- TCID₅₀ – Doses infectantes para 50,0% dos cultivos celulares
- TE – Transferência de embriões
- TMG – Título médio geométrico
- VN – Virusneutralização
- X² - Qui-quadrado
- µL - Microlitro

INFLUÊNCIA DA RESPOSTA VACINAL CONTRA O HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE VACAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO

RESUMO – O herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR)/Vulvovaginite Pustular Bovina (IPV), tem grande importância como agente causador de problemas reprodutivos em vacas por determinar baixas taxas de concepção ou parição, acarretando consideráveis perdas econômicas para o produtor. Assim, o presente estudo conduzido em rebanhos de três fazendas (A, B e C) onde se processa a transferência de embriões (TE) no município de Prata no Estado de Minas Gerais teve como objetivo verificar as condições sorológicas de 209 animais antes do processamento biotécnico, determinar a resposta imune de esquema vacinal pré-definido e analisar a relação entre títulos médios geométricos (TMG) de anticorpos antes e depois da vacinação com os parâmetros reprodutivos de fêmeas receptoras de embriões vacinadas contra o BoHV-1. O título dos anticorpos para BoHV-1 foi determinado por meio do teste de virusneutralização (VN), conforme protocolo definido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e o quadro reprodutivo foi caracterizado por meio do exame de ultrassonografia transretal. Com isso, verificou-se que as prevalências de 39,7% (27/68) na fazenda A, 27,5% (11/40) na fazenda B e 36,6% (37/101) na fazenda C não foram estatisticamente diferentes; essa situação epidemiológica definiu o aumento de títulos de anticorpos para o BoHV-1 em 72,7% (152/209) dos animais pela vacinação com dose única; o maior sucesso de prenhez (75%) na 1ª TE foi observada nos animais que eram positivos e atingiram títulos acima de 256 após a vacinação; mesmo assim, no contexto estatístico, os índices gerais de gestação não tiveram influência significativa em decorrência da vacinação com dose única.

Palavras-chave: Herpesvírus Bovino tipo 1, titulação de anticorpos, transferência de embriões.

INFLUENCE OF THE VACCINATION RESPONSE AGAINST BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) IN REPRODUCTIVE PARAMETERS OF EMBRYO RECIPIENT HEIFERS

SUMMARY – The bovine herpesvirus type 1 (BoVH-1), which causes infectious bovine rhinotracheitis (IBR) / infectious pustular vulvovaginitis (IPV), has major importance as an agent that causes reproductive problems by determining low conception or calving rates causing significant economical losses for the producer. The present study, was carried out in the cattle of three farms (A, B and C), where the embryos transfer is processed (ET), at Prata municipality in Minas Gerais State, aiming to verify the serological conditions of 209 animals before biotechnical processing, to determine immune response to a pre defined vaccination schedule and to analyze the relationship between geometric mean titers (TMG) of antibodies before and after vaccination with the reproductive parameters in embryo recipient heifers vaccinated against BoHV-1. The antibodies titers of BoHV-1 were determined by the virusneutralization test (VN), according to the protocol established by the World Organization for Animal Health (OIE) and the reproductive performance was characterized by transrectal ultrasonography examination. Thus, it was verified that the prevalence rates of 39.7% (27/68) in farm A, 27.5% (11/40) in farm B and 36.6% (37/101) in farm C had no statistical difference; this epidemiological situation defined the increase of antibody titers for BoHV-1 in 72.7% (152/209) of the animals by vaccination with a single dose; the greater success of pregnancy (75%) in the first ET was observed in animals that were positive and reached titers higher than 256 after vaccination; in the statistical context, the single dose vaccination had no significative influence in the overall rates of pregnancy.

Key-words: Bovine herpesvirus tipe 1, antibody titers, embryo transfer.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população brasileira e mundial gera a necessidade de aumento na produção de produtos de origem animal destinados à alimentação, forçando a pecuária a ter uma melhor produtividade e, conseqüentemente, cuidar do desempenho reprodutivo dos animais.

Na pecuária bovina de corte, principalmente na fase especializada na criação de bezerros, o manejo reprodutivo das vacas é um dos principais aspectos responsáveis pelo desempenho econômico da atividade. Por isto, o desenvolvimento de biotécnicas avançadas de reprodução animal nos últimos anos tem alavancado o Brasil no cenário mundial pelo elevado número de embriões bovinos produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

No entanto, as alterações na sanidade do rebanho, em particular as infecções que comprometem direta ou indiretamente o trato reprodutivo de fêmeas e machos, pode exercer um impacto negativo sobre a lucratividade da pecuária de corte.

Nesse contexto está inserido o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), que é considerado um dos principais patógenos que altera a eficiência reprodutiva de bovinos, acarretando grandes prejuízos econômicos à pecuária nacional. Clinicamente, as infecções pelo BoHV-1 manifestam-se sob distintas síndromes, entre as quais se observa a respiratória, caracterizada pela rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a genital, pela vulvovaginite/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), além da sistêmica, nervosa e reprodutiva, essa última por provocar baixas taxas de concepção, abortamento, infertilidade temporária e repetição de estro.

Apesar de não impedir a infecção viral e a latência, a vacinação tem sido indicada como medida de controle da enfermidade para evitar o desenvolvimento de sinais da doença e reduzir a eliminação de partículas virais, desse modo acreditando possibilitar a diminuição do impacto econômico das infecções pelo BoHV-1.

Por isso, o conhecimento da resposta imunológica em vacas receptoras de embriões vacinadas contra a IBR frente ao sucesso de prenhez se tornou um anseio que precisa ser investigado. Só assim é possível justificar a utilização ou não da vacina

como ferramenta entre as medidas preventivas para o controle de alterações reprodutivas causadas pela enfermidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na metade do século passado, SCHROEDER & MOYS (1954) relataram uma doença aparentemente nova que acometia o sistema respiratório de animais num rebanho leiteiro na Califórnia, Estados Unidos da América (EUA), mas não conseguiram identificar sua causa. Um ano depois, MILLER (1955) descreveu uma doença que já ocorria desde o outono de 1950 no Estado do Colorado (EUA), em rebanhos confinados, tanto de aptidão leiteira quanto de corte e, ocasionalmente, em gado criado a pasto, fato que foi relacionado aos casos ocorridos na Califórnia. Neste tempo, a causa também não foi determinada, porém presumia-se que era de etiologia viral.

Esta enfermidade recebeu o nome de 'red nose', 'dust pneumonia' e 'rinotraqueite infecciosa necrótica', sendo no mesmo ano caracterizada como IBR, como é conhecida até hoje (DINTER & MOREIN, 1990). MCKERCHER et al. (1955) concluíram, por meio de estudos imunológicos, que todas eram uma mesma doença, sendo MADIN et al. (1956) os primeiros a isolarem o vírus responsável pela enfermidade. Porém, KENDRICK et al. (1958) isolaram o mesmo vírus em exsudato vaginal de vacas acometidas pela IPV. No Brasil, o primeiro isolamento do BoHV-1 aconteceu em 1978 na Bahia a partir de casos de vulvovaginite (ALICE, 1978).

O BoHV-1 está presente em rebanhos de praticamente todo o mundo (FLORES, 2007). Segundo PITUCO et al. (1999), no Brasil encontra-se distribuído em todas as regiões apresentando altos percentuais de infecção em fêmeas bovinas com idade reprodutiva. Mesmo não apresentando sinais clínicos evidentes, entre 40,0% e 60,0% dos bovinos já entraram em contato com o vírus e possuem anticorpos (PITUCO, 2010). Então, a infecção possui caráter endêmico, tanto em plantéis destinados à produção de leite quanto de carne, situação epidemiológica que inviabiliza, pelo menos a curto prazo, a adoção de uma política nacional de erradicação (ALFIERI et al., 1998).

ALEXANDRINO (2008) determinou a prevalência de 54,7% para o BoHV-1 em rebanhos de bovinos no Estado de Minas Gerais e São Paulo, sendo que 44,7% em rebanhos bovinos de corte e 81,3% em rebanhos de aptidão leiteira, observando que os animais adultos foram mais acometidos pelo BoHV-1 do que os jovens. ROCHA et al.

(2001) encontraram 58,2% de prevalência para o exame em amostras de soro bovino provenientes de propriedades particulares localizadas em 335 municípios do Estado de Minas Gerais. Já KONRAD et al. (2003) e MENDES et al. (2009) observaram 29,1% e 80,2%, respectivamente, em fêmeas de aptidão leiteira no mesmo Estado. No entanto, JUNQUEIRA et al. (2006) encontraram 68,3% de prevalência na região oeste do Estado de São Paulo em rebanhos de bovinos de corte em regime de criação extensivo, sendo que 36,7% desses animais eram novilhas, mostrando a necessidade da adoção de manejo diferenciado para novilhas com a finalidade de reduzir a possibilidade de transmissão do agente pelos animais mais velhos.

O BoHV-1 é um membro da família *Hesperiviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, (ROIZMAN et al, 1992), gênero *Varicellovirus* (BROWN, 1989). Possui DNA linear de fita dupla com aproximadamente 137kbp (quilopares de bases) envolto por um capsídeo icosaédrico com 100 a 110 nm de diâmetro, constituído por 162 capsômeros (ARMSTRONG et al., 1961; CRUICK-SHANK & BERRY, 1965) e que, por sua vez, é recoberto por uma camada protéica amorfa chamada tegumento e um envelope de dupla camada lipoprotéica contendo espículas de glicoproteínas na sua superfície (ARMSTRONG et al., 1961).

O BoHV-1 é subdividido em três categorias, baseadas em características genômicas e antigênicas: o genótipo 1 (BoHV-1.1), isolado de animais com problemas respiratórios (IBR), assim como em abortos; o genótipo 2a (BoHV-1.2a), associado a doenças do trato genital (IPV e IPB), abortos e também infecções do trato respiratório; e o genótipo 2b (BoHV-1.2b), isolado de animais com IPV, IPB, doença respiratória leve, mas, até o momento, não associado aos casos de aborto (METZLER et al., 1985; WYLER et al., 1989; EDWARDS et al.,1990).

Após a infecção do animal, o BoHV-1 se liga aos receptores das células hospedeiras por meio de glicoproteínas específicas do envelope, conseguindo desta forma penetrar, iniciando sua replicação massivamente nas células epiteliais da porta de entrada, onde causa arredondamento das mesmas, aparecimento de inclusões intracelulares e efeito citopático (EC), levando-as à apoptose, necrose e à presença dos primeiros sinais clínicos da infecção como congestão local, presença de secreções,

lesões vesiculares ou erosivas, além de excreção de elevados títulos virais que podem chegar até a 10^7 TCID₅₀/mL (doses infectantes para 50,0% dos cultivos celulares) por até 15-16 dias, fato responsável pela rápida disseminação da infecção no rebanho (ENGELS & ACKERMANN, 1996; FLORES, 2007).

Além disso, as partículas virais conseguem passar diretamente para uma célula vizinha por meio de pontes de contato celular, evitando a ação dos anticorpos virusneutralizantes presentes no sangue ou nos fluidos intersticiais. Após a infecção primária, o vírus pode realizar viremia, provavelmente associado a monócitos e linfócitos, por meio dos quais se dissemina no organismo animal (ENGELS & ACKERMANN, 1996; MUYLKENS et al., 2007).

Depois da replicação viral primária nas células da membrana mucosa, o vírus penetra nas terminações nervosas periféricas locais de neurônios sensoriais e é transportado por via axonal retrógrada até os corpos neuronais nos gânglios regionais, principalmente dos gânglios trigêmeo e sacral, estabelecendo infecção latente, durante a qual não há expressão de antígenos virais ou replicação, o que leva os animais a tornarem-se portadores inaparentes e potenciais transmissores do vírus (LEMAIRE et al., 1994; TIKOO et al., 1995).

Caso haja influência de fatores externos, como estresse por parição, transporte ou outras enfermidades e tratamento com corticóides, pode ocorrer a reativação da infecção que estava latente, levando à produção de partículas virais infecciosas que voltam ao sítio primário de infecção, onde o vírus se replica e será excretado em secreções, com potencialização da transmissão para outros animais (PASTORET et al., 1982). Os títulos virais máximos, nessa ocasião, não alcançam os mesmos níveis da infecção primária, mas ainda assim são altos (DINTER & MOREIN, 1990).

A IBR possui na primo infecção morbidade de até 100,0%, com mortalidade geralmente ausente ou baixa, menor que 5,0% (FLORES, 2007). O período de incubação é de até quatro dias tanto na IBR quanto na IPV/IPB e a gravidade dos sinais clínicos depende da presença ou não de infecção bacteriana secundária (DINTER & MOREIN, 1990).

A espécie bovina é a principal fonte de infecção do BoHV-1 com eliminação do vírus por meio de secreções respiratórias, oculares e genitais (muco vaginal e prepucial) (KAHRS, 1977). A porta de entrada mais importante do agente é a membrana mucosa, tanto do sistema respiratório superior quanto do trato genital (MARS et al., 2000) e a transmissão pode ser horizontal direta, pelo contato focinho-focinho entre os animais e também pela cópula; horizontal indireta, por meio de aerossóis, fômites e inseminação artificial, quando se utiliza sêmen de animais infectados; ou ainda de forma vertical, na qual o vírus atravessa a placenta infectando embriões e fetos (LEMAIRE et al., 1994).

A IBR pode se apresentar de forma subclínica, leve ou severa. As manifestações clínicas incluem febre, secreções nasais serosas, que podem tornar-se mucopurulentas, devido à infecção bacteriana secundária, mucosa nasal hiperêmica ("red nose"), com lesões vesiculares ou erosivas, conjuntivite uni ou bilateral, secreção lacrimal, além de poder haver o bloqueio das vias respiratórias superiores que levam os animais à dificuldade respiratória e à respiração pela boca, resultando em sialorréia. Se não houver infecção bacteriana secundária ou outras infecções virais associadas, os animais se recuperam em até dez dias (QUINN et al., 2005; FLORES, 2007).

A IPV aguda inicia-se de um a três dias após a cobertura, inseminação artificial ou até mesmo o contato da mucosa com secreções contaminadas com o vírus. Inicialmente se observa a presença de pequenas pústulas na vulva que podem coalescer, ulcerar e se espalhar por todo o epitélio. Há febre, anorexia, edemaciação e hiperemia vulvar e os animais sentem dor ao urinar. Não havendo infecção bacteriana secundária os animais podem se restabelecer após 14 dias do início da infecção (DINTER & MOREIN, 1990; FLORES, 2007).

A IPB também tem início de um a três dias após o contato de machos reprodutores com fêmeas infectadas ou com material contaminado em centrais de inseminação artificial. A enfermidade acomete o prepúcio, pênis e, algumas vezes, a porção distal da mucosa uretral com uma evolução de sinais clínicos parecida com a IPV, porém requer mais tempo para cura das lesões epiteliais. É possível encontrar nódulos hiperêmicos visíveis na mucosa peniana quatro semanas após o início da

infecção e, em casos graves, os machos infectados podem apresentar hemorragias da mucosa peniana (DINTER & MOREIN, 1990; FLORES, 2007).

Além disso, podem acontecer infecções pelo BoHV-1 no aparelho reprodutivo como consequência da infecção por viremia, contribuindo com reduções nos índices reprodutivos dos plantéis infectados (KAHRS, 1977).

As evidentes perdas reprodutivas podem ser observadas por falhas na concepção, baixas taxas de fecundação e elevadas taxas de serviço por concepção (WHITE & SNOWDON, 1973). Até o 15º dia de gestação, a mortalidade de embriões pode acarretar o retorno ao estro a intervalos irregulares. Vale ressaltar que, segundo HAFEZ & HAFEZ (2004), a vaca repetidora de estro exibe sinais normais de estro a cada período de 18 a 24 dias e requer mais de três serviços para ficar prenhe. No período fetal, a morte é acompanhada de aborto, mais facilmente identificado a partir do quarto mês de gestação (KASTELIC, 1994).

Nas vacas prenhes que se infectam durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, há intensa replicação viral nos fetos, que resultará em morte fetal e consequente aborto (MILLER & VAN DER MATTEN, 1985). Todavia, quando os bezerros são infectados na fase final da gestação ou logo após o nascimento é mais comum ocorrer a forma sistêmica do recém-nascido. Esta forma se caracteriza por infecção aguda com surgimento de lesões necróticas nas mucosas dos tratos respiratório e digestivo. Neste caso, os bezerros nascem mortos ou bastante debilitados, podendo vir a morrer em poucas horas (ROCHA, 1999).

Nos ovários, a replicação viral determina o desenvolvimento de um quadro de ooforite com necrose e hemorragias por todo o ovário, principalmente no corpo lúteo, com consequente queda na concentração de progesterona e falha na prenhez (MILLER & VAN DER MAATEN, 1986). No útero, a replicação do vírus induz a formação de um processo de endometrite necrosante com tendência à resolução de uma a duas semanas, resultando em infertilidade temporária (MILLER, 1991).

O BoHV-1 é capaz de infectar embriões por meio de material biológico relacionado à técnica de TE (RUFINO et al, 2006), por isso, no processo de transferência, a qualidade do embrião depende do estado de sanidade da doadora, do

sêmen e da receptora, as três principais causas de risco de transmissão de doenças (LAGE, 1999). A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) preconiza um amplo programa de TE no qual os rebanhos de doadoras e receptoras devem ser avaliados quanto à possibilidade da ocorrência de alguma doença infecciosa, com a recomendação de que ambas têm que apresentar ciclos normais, bom estado de saúde e perfeita anatomia reprodutiva (MAPLETOF & STOOKEY, 1998).

Para diagnosticar a enfermidade, aplicam-se métodos laboratoriais diretos, que caracterizam o BoHV-1, ou indiretos a partir de provas sorológicas (ALFIERI et al., 1998). O isolamento do BoHV-1 em cultivo celular é considerado o método padrão de diagnóstico direto, porém testes sorológicos são mais práticos e detectam anticorpos específicos por meio da VN ou ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (TAKIUCHI et al., 2001).

No caso da enfermidade instalada, o tratamento dos doentes é indicado com a finalidade de amenizar os sinais clínicos e, principalmente, evitar o risco de complicações causadas por infecções secundárias (MOREIRA, 2004); contudo a prevenção é a melhor maneira de impedir os problemas com a disseminação do vírus (DEL FAVA, 1996).

A vacinação contra o BoHV-1 tem sido amplamente utilizada para minimizar as manifestações clínicas e a circulação viral em áreas endêmicas, porém não impede a latência e a transmissão do vírus (LEMAIRE et al., 1994; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006), pois para ser efetiva, a vacinação contra o BoHV-1 deve atuar nos dois aspectos da resposta imunológica: humoral e celular.

Recomendavam ainda ALFIERI et al. (1998) que a vacina fosse administrada no período que antecede a cobertura ou inseminação artificial, objetivando melhorar o desempenho reprodutivo.

A vacina inativada mostrou maior eficácia na redução da excreção viral na reativação do estado de latência do que a vacina atenuada (BOSCH et al., 1997), só que essa última, por sua vez, quando administrada duas vezes em animais negativos induziu melhor proteção contra o vírus (BOSCH et al., 1996).

No entanto, POSPISIL et al. (1996) observaram que num rebanho naturalmente infectado com 54,1% dos animais negativos para o BoHV-1 antes da vacinação, houve soroconversão três semanas após receberem uma dose de vacina inativada, mas 12,7% deles ainda continuaram negativos, sendo que entre os positivos os títulos de anticorpos variaram de 2 a 128. Após a segunda dose de vacina, três semanas mais tarde, nenhum animal encontrava-se negativo para o BoHV-1 e os títulos de anticorpos continuaram entre 2 e 128. Já num outro rebanho, livre para o BoHV-1, os títulos de anticorpos após a primeira vacinação variaram de 2 a 16 e, após a segunda vacinação, três semanas depois, os títulos apresentaram-se até quatro vezes mais altos, entre 16 e 128.

Contudo, a resposta imune humoral serve como indicador da infecção e do estado imunológico frente ao BoHV-1, normalmente medida por VN (KARHS, 1977). Muitas vacinas disponíveis no mercado induzem títulos de anticorpos virusneutralizantes de magnitude elevada, porém não está estabelecida a relação entre proteção frente ao BoHV-1 e títulos determinados (PATEL, 2005).

Segundo POSPISIL et al. (1996), os títulos de anticorpos abaixo de 16, induzidos por vacina inativada, não induzem resposta imunológica celular por linfócitos T CD8+, sendo assim, títulos maiores ou iguais a 16 ou 32 têm sido apontados como os mínimos necessários para proteger os animais frente a uma exposição ao agente. Além disso, títulos entre 32 e 128 conferem proteção contra a infecção respiratória e intra-uterina causada pelo BoHV-1.

Por outro lado, existem estudos que mostram que títulos semelhantes ou superiores podem variar na capacidade de proteção (BOSCH et al., 1996; PATEL, 2005). SILVA (2006) demonstrou que o título de 256 é o máximo conseguido por indução com vacinas comerciais inativadas.

Além disso, a vacina pode causar como resposta imunológica um efeito 'booster', que se caracteriza por elevação dos títulos de anticorpos específicos, em animais que encontram-se latentemente infectados ou previamente vacinados, podendo prevenir a ativação da infecção e reexcreção viral (PASTORET & THIRY, 1985).

Estudos caracterizando infecções recentes, quando os animais apresentavam títulos de anticorpos acima de 128, foram realizados por JUNQUEIRA et al. (2006) que encontraram 11,0% e por KONRAD et al. (2003) que determinaram 47,6% dos animais com esse perfil sorológico.

Um modelo de controle da enfermidade sugere a vacinação de animais positivos em rebanhos com prevalência da enfermidade entre 20,0% e 50,0%, descartando gradualmente os animais positivos; rebanhos com prevalência superior à 50,0% ou que haja necessidade premente de evitar sinais clínicos para reduzir perdas da produção, a vacinação de todo o rebanho é recomendada (DEL FAVA, 1996). Por outro lado, a orientação em rebanhos com prevalência de infecção abaixo de 20,0% é o descarte dos animais positivos (STRAUB, 1991).

No que tange a biotécnica da reprodução animal, a TE em bovinos tem sido utilizada com êxito há anos no Brasil por ser considerada um dos métodos mais econômicos e práticos para aumentar a eficiência reprodutiva de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de bovinos de corte quanto de leite (REICHENBACH, 2003).

Atualmente o Brasil ocupa posição de destaque porque produz aproximadamente 50,0% dos embriões *in vitro* no cenário mundial (VARAGO et al., 2008), só que as taxas de gestação são bastante variáveis, pois estão associadas à qualidade do embrião e às condições intrínsecas de produção dos laboratórios, bem como ao estado reprodutivo e nutricional das receptoras.

Então, para GARCIA et al. (2005), os índices de gestação aos 60 dias para produção *in vitro* (PIV) estão entre 20,0 e 60,0%, variando de acordo com o sistema de produção usado pelos diferentes laboratórios. Já para PONTES et al. (2011 e 2009), as taxas de prenhez aos 60 dias para PIV em receptoras novilhas mestiças submetidas à TE foram de 33,5% e 33,12%.

Uma vez estabelecida a gestação, frequentemente há perdas durante o primeiro trimestre por morte embrionária/fetal que chegam a 10,5% (PONTES et al., 2009), 19% (FARIN et al., 2001) e para GALLI et al. (2001) podem variar de 10,0 a 12,0%. A qualidade dos embriões, bem como sua deficiência em iniciar os mecanismos

essenciais para o reconhecimento materno da prenhez são apontados como as principais razões para que ocorram essas perdas.

Vale ressaltar que o período embrionário de desenvolvimento vai até o 45º dia de gestação e o período fetal começa no 46º dia e continua até o nascimento. O abortamento, por sua vez, é definido como o término da gestação com a expulsão do feto antes que seja viável, ou seja, do 46º dia até o nascimento aos 260 dias (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

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. Isso se deve tanto à infecção do tecido ovariano, quanto aos fluidos que envolvem os embriões *in vivo* no ovário, oviduto ou útero (STRINGFELLOW & GIVENS, 2000).

GUERIN et al. (1989) descreveram a presença do vírus em embriões colhidos durante a fase aguda da enfermidade, inclusive mostrando que esses embriões infectados apresentavam uma taxa de desenvolvimento menor quando comparados ao grupo controle. FERREIRA et al. (2005) estudaram a presença do BoHV-1 em material do aparelho reprodutor colhidos de vacas em abatedouros e verificaram 8,3% de positividade no líquido folicular analisados pela técnica da reação em cadeia da polimerase. No entanto, BIELANSKI et al. (1993) utilizando a técnica de isolamento viral, já haviam constatado 11,8% e 6,2% de positividade para o líquido folicular e as células epiteliais de oviduto bovino, respectivamente.

Está comprovado que a zona pelúcida, por ser formada de tecido que impede as células embrionárias de sofrer infecções por microrganismos, também para o BoHV-1 funciona como uma barreira protetora desde que o embrião seja lavado com tripsina (VANROOSE et al., 1999). Mesmo assim, vale ressaltar que o advento das biotécnicas da reprodução animal, como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões para transferência, sem os devidos cuidados sanitários, pode possibilitar a infecção de animais em rebanhos que nunca tiveram contato com o vírus (LEMAIRE et al, 1994; REICHENBACH, 2003).

3 OBJETIVOS

Considerando os distúrbios reprodutivos que o BoHV-1 pode ocasionar em bovinos, esta pesquisa em rebanho de fêmeas receptoras de embriões teve como propósito:

- verificar as condições sorológicas dos animais antes de serem submetidos ao processamento biotécnico;
- determinar a resposta imune de esquema vacinal pré-definido;
- analisar a relação entre títulos médios geométricos (TMG) de anticorpos antes e depois da vacinação com os parâmetros reprodutivos observados durante o estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e local de experimentação

O presente estudo foi conduzido em três fazendas (A, B e C), todas localizadas no município de Prata, região do Triângulo Mineiro no Estado de Minas Gerais (MG), cuja atividade econômica principal era destinada à transferência de embriões.

Nesse experimento foram utilizadas novilhas não vacinadas contra o BoHV-1, provenientes ou não de cruzamento industrial, selecionadas de acordo com a avaliação de escore corporal do rebanho *Bos indicus* baseada na classificação de NICHOLSON & BUTTERWORTH (1986) que preconiza que o plano nutricional de um animal exposto ao longo de um período de tempo razoável tem reflexo no armazenamento de gordura ou na perda de massa muscular, que podem ser avaliados visualmente. Portanto, os animais podem receber uma pontuação que vai do valor mínimo de um, quando estiver extremamente emaciado, ao valor máximo de nove, quando no estado extremamente obeso. As fêmeas selecionadas para esse trabalho foram classificadas entre os valores intermediários de quatro a seis. As novilhas utilizadas foram mantidas durante todo o experimento com os demais animais do rebanho em pastagens de *Brachiaria brizanta*, capim Mombaça (*Panicum maximum* - variedade Mombaça) e capim Tanzânia (*Panicum maximum* - variedade tanzânia) e receberam premix mineral *ad libitum* formulados para animais em fase reprodutiva.

4.2 Manejo Sanitário, reprodutivo e primeira colheita de amostras

O manejo sanitário e reprodutivo foi realizado pelo mesmo médico veterinário que submeteu todas as novilhas do rebanho, inicialmente, ao exame ginecológico por meio de palpação transretal para avaliação da condição ovariana e uterina e aos testes oficiais para diagnóstico da brucelose e da tuberculose, por meio do teste do antígeno acidificado tamponado e tuberculinização, respectivamente, segundo metodologia padronizada pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e da

Tuberculose Animal (PNCEBT) (BRASIL, 2006). Os animais que se mostraram sem alterações reprodutivas à palpação e negativas para as duas enfermidades citadas continuaram no rebanho. Depois desse procedimento, foram selecionados aleatoriamente 209 animais para o desenvolvimento do estudo, sendo 68 novilhas na fazenda A, 40 na fazenda B e 101 na fazenda C.

Inicialmente as 209 novilhas foram identificadas por brincos numerados e colhidas amostras de sangue, por punção da veia caudal mediana ou jugular com agulhas descartáveis, em frascos do tipo 'vacutainer' esterilizados, sem coagulante, que permaneciam por algumas horas em temperatura ambiente, até a retração do coágulo para a liberação parcial de soro sanguíneo. Separada, cada amostra de soro foi acondicionada em frasco tipo 'eppendorf' e estocada à temperatura de aproximadamente -20°C até a execução dos testes sorológicos.

Todos os animais do rebanho foram então vacinados uma única vez, utilizando vacina comercial polivalente com suspensão antigênica inativada de BoHV-1.

Mantidas no pasto, as novilhas foram observadas diariamente quanto à apresentação de estro, levando-se em conta mudanças de comportamento como a aceitação da monta de outras novilhas ou de um rufião. Todas que estavam em estro foram inovuladas, processo que teve início em janeiro e seguiu até setembro de 2010.

4.3 Produção *in vitro* de embriões

Nas fazendas, a atividade realizada com as novilhas foi a transferência de embriões produzidos *in vitro* por laboratórios especializados em biotecnologia da reprodução bovina, cuja metodologia laboratorial não era de domínio público. No estudo foram utilizados embriões procedentes de entidades, todas localizadas no município de Uberaba (MG), que foram contratadas pelos donos das doadoras interessados nos (as) bezerros (as) advindos (as) de TE.

4.4 Transferência de embriões ou inovulação

O processo de TE foi iniciado por palpação transretal da receptora para verificar em qual dos ovários o corpo lúteo (CL) estava localizado. Em seguida, o animal foi anestesiado com a aplicação de 3,5mL de cloridrato de lidocaína 2,0%, via epidural prosseguindo com a higienização por meio de lavagem e posterior secagem da vulva e parte do vestíbulo vaginal.

Posteriormente, a TE foi feita com a passagem de um aplicador pela cérvix, sendo que sua extremidade era direcionada para o corno uterino ipsilateral ao ovário que contivesse o CL.

As TE foram realizadas pelo mesmo médico veterinário responsável pelos exames gestacionais e de distúrbios reprodutivos.

4.5 Exame gestacional, de distúrbios reprodutivos e segunda colheita de amostras

Conforme consta na literatura pertinente (GONSALVES et al., 2002), o diagnóstico gestacional por ultra-sonografia permite o monitoramento de desenvolvimento desde o período embrionário. A partir do 23º dia de vida, o embrião pode ser detectado como uma estrutura de ecogenicidade média no interior da vesícula embrionária anecóica, sendo possível visualizar o coração caracterizado como uma estrutura ora não ecogênica, ora com pouca ecogenicidade. Com cerca de 50 dias de gestação, o sexo do feto é determinado por meio da observação do tubérculo genital, prática muito utilizada em receptoras de embriões.

Então, por meio da ultra-sonografia transretal com a utilização de um ultra-som modelo Aloka SSD-500, o exame gestacional foi realizado em dois momentos: aos 26 dias, com 33 dias de vida do embrião, para verificar se o animal estava gestante ou não; e no período de 41 a 55 dias após a TE, para confirmar a prenhez e fazer a sexagem fetal. A prenhez só foi confirmada quando o feto com batimentos cardíacos

era visualizado. Caso, não houvesse o feto ou os batimentos cardíacos estivessem ausentes no segundo exame, considerava que houve a morte embrionária/fetal.

Além da morte embrionária/fetal foi considerado distúrbio reprodutivo qualquer anormalidade que pudesse ocorrer desde o início do experimento até a segunda confirmação de prenhez, quais sejam, repetições de estro sem sucesso de prenhez, alterações de vulva ou vagina, abortamento, infecções do trato reprodutivo interno, entre outras mais esporádicas.

Foram realizadas até seis TE em cada animal. Nos casos em que não se confirmavam a prenhez, os animais eram descartados do rebanho. Quando houve confirmação de prenhez foi colhida uma amostra de sangue desse animal por punção da veia caudal mediana ou jugular em frascos tipo 'vacutainer' esterilizados, sem anticoagulante, com agulhas descartáveis. O soro separado foi encaminhado ao laboratório e estocado à temperatura de aproximadamente -20°C até a realização dos testes sorológicos.

4.6 Procedimentos laboratoriais

4.6.1 Manutenção das culturas celulares

A linhagem celular Madin & Darby bovine kidney (MDBK) foi utilizada para o teste de VN em placas e para a multiplicação das estirpes virais em garrafas de poliestireno descartáveis para cultivo celular TPP®. O Minimum Essential Medium (Eagle – MEM) Gibco® foi utilizado como meio de manutenção das monocamadas celulares, filtrado, sem adição de antibióticos, acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio e de 10,0% de soro fetal bovino (SFB) Cultilab®.

As garrafas de culturas celulares foram mantidas em estufa a 37°C por 72 horas e então feitos os subcultivos. Para tanto, o meio de cultura contido no interior da garrafa era desprezado e se adicionava a solução de tripsina-versene Difco®, inicialmente para retirada de resíduos de meio e de soro fetal bovino e, posteriormente, para promover a desagregação do tapete celular e individualização das células. A solução de tripsina foi

então descartada e as células desprendidas da garrafa. Adicionando-se meio de manutenção, as células foram ressuspensas e uma alíquota retirada para a contagem em câmara de Neubauer. Feitos os cálculos, a suspensão foi preparada com 300.000 células/mL para uso nas reações de vírus neutralização e com 200.000 células/mL para a manutenção dos subcultivos de células em garrafas acrescentando meio de cultura e 10,0% de soro fetal bovino.

4.6.2 Multiplicação do BoHV-1

A amostra do BoHV-1 biotipo citopatogênico (estirpe Nebraska) foi amplificada em células MDBK, cultivadas em monocamada, conforme descrito no item 4.6.1.

Para a amplificação viral, o meio de manutenção da garrafa contendo monocamada celular preparada 24 horas antes com uma concentração de 200.000 células por mL foi removido e 1mL de suspensão do BoHV-1 foi adicionado levando à incubação em estufa à temperatura de 37°C, durante 60 minutos para que ocorresse a adsorção do vírus às células.

Após esse período foram adicionados meio de manutenção e soro fetal bovino, homogeneizados e incubados novamente em estufa à temperatura de 37°C até que o tapete celular apresentasse de 70,0 a 80,0% de efeito citopático (ECP). Nesse estágio, a garrafa foi congelada à temperatura de -70°C e descongelada rapidamente em água à temperatura de 37°C, para assim ocasionar o rompimento das células e liberação das partículas virais. O material então foi submetido à centrifugação a 4°C durante 15 minutos e a 2000rpm (rotações por minuto) para a decantação dos restos celulares. O sobrenadante contendo as partículas virais foi distribuído em alíquotas de 0,7mL em criotubos para armazenamento à temperatura de -196°C, em nitrogênio líquido.

4.6.3 Titulação do BoHV-1

Passadas 24 horas do procedimento de amplificação viral, uma das alíquotas foi descongelada em banho-maria à temperatura de 37°C e submetida à titulação viral

segundo a metodologia preconizada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2010).

Em uma placa de microtitulação de poliestireno com 96 cavidades foram acrescentados 50µL de meio de manutenção Eagle – MEM®, excetuando a nona coluna, que permanecia vazia para separar as cavidades com diluições virais daquelas destinadas ao controle celular. Em seguida foram preparadas diluições seriadas sucessivas, iniciando com a 0,5mL da suspensão viral em 4,5mL de meio de manutenção Eagle-MEM (diluição 10^{-1}), em tubos de ensaio mantidos em banho de gelo para evitar a queda do título viral, seguindo até a diluição 10^{-8} . Em cada uma das oito primeiras colunas da placa de microtitulação foi adicionada a respectiva diluição viral, começando a distribuição da última (10^{-8}) para a primeira diluição (10^{-1}). Então foram adicionados em cada cavidade da placa, com exceção das cavidades da coluna divisória, 50µL de suspensão de células MDBK contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle-MEM com 10,0% de SFB.

As colunas 10, 11 e 12 foram os controles celulares e receberam apenas 100µL de meio e a suspensão celular na mesma quantidade e concentração do restante da placa. Após esse procedimento, a placa foi mantida sob a temperatura de 37°C, em incubadora com atmosfera controlada de 5,0% de CO₂ e, decorridas 72 horas, observada em microscópio invertido para pesquisar os efeitos citopáticos característicos, nas diferentes diluições.

O título viral foi expresso como a recíproca da maior diluição capaz de provocar reação específica (ECP) em 50,0% dos cultivos e a unidade foi TCID₅₀. Os valores obtidos nos ensaios de titulação foram submetidos à análise matemática, que converteram os dados de infectividade em valores numéricos com uma acurácia aceitável. O método REED & MUENCH (1938) foi utilizado para o cálculo do título viral.

4.6.4 Teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1

O exame sorológico para diagnosticar o BoHV-1 foi realizado por meio do teste de VN, conforme protocolo definido pela OIE (2010), para detecção e titulação dos

anticorpos, utilizando como antígeno a estirpe Nebraska deste vírus, oriunda da Universidade Estadual de Londrina – PR (UEL).

As amostras de soro sanguíneo foram descongeladas e colocadas em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema complemento e em cada placa de microtitulação foram testadas quatro amostras em duplicata.

Os exames foram realizados em placas de microtitulação de poliestireno contendo 96 cavidades (TPP®) adicionando, inicialmente, 100µL de meio Eagle - MEM® acrescido de 10,0% de SFB, 1,0% de antibiótico composto por penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10.000µg/mL) Gibco® na primeira coluna (controle de células) e 50µL nas demais colunas, excetuando a terceira coluna que correspondia à diluição 1:2. Na segunda (controle de soro), terceira e quarta colunas foram adicionadas 50µL das amostras a serem testadas. Em seguida, a diluição do soro da quarta coluna foi homogeneizada e 50µL de cada cavidade foram retirados e passados à próxima coluna. Esse procedimento foi repetido até a décima segunda coluna, obtendo-se uma diluição seriada de 1:4 até 1:1024. Depois, em cada cavidade, excetuando as da primeira e segunda coluna, foram adicionados 50µL da suspensão viral ajustada a uma concentração de 200 TCID₅₀ para então as placas serem incubadas em estufa com tensão controlada de 5,0% de CO₂ à temperatura de 37°C.

Decorrido um período de 18 a 24 horas, as placas foram retiradas da estufa e, à mistura soro e vírus de cada cavidade foram acrescentados 100µL de uma suspensão de células MDBK numa concentração de 300.000 células/mL. Terminado este processo, as placas foram novamente incubadas sob as mesmas condições anteriormente descritas de tensão de CO₂ e temperatura.

Após 72 horas de incubação a leitura das placas foi realizada em microscópio invertido para observar o efeito citopático característico. A amostra de soro positiva foi aquela que neutralizou o vírus a partir da diluição 1:2 e o título de anticorpos considerado foi a recíproca do inverso da última diluição em que não foi observado efeito citopatogênico característico. As médias dos títulos obtidos foram transformadas em TMG por meio da média geométrica que é definida como a raiz enésima do produto de n números.

4.6.5 Controle das TCID₅₀

Em todas as reações de VN foi verificado se as TCID₅₀ estavam dentro do intervalo de validação do teste preconizado pela OIE, que para o BoHV-1 é de 20 a 200 TCID₅₀.

Para o preparo das 200 TCID₅₀, do valor apresentado na titulação viral foi subtraído o logaritmo de 200 TCID₅₀ (2,3) do título viral e do resultado dessa subtração foi obtido o antilogaritmo correspondente que representava o volume final da diluição que conteria as 200 TCID₅₀.

Essa mesma diluição que definiu as 200 TCID₅₀ foi utilizada na placa de validação do teste e a partir dela foram obtidas as diluições que definiram 0,2 TCID₅₀, 2 TCID₅₀ e 20 TCID₅₀.

Após o preparo das diluições, numa placa de microtitulação com 96 cavidades foram colocados 50µl por cavidade nas quatro primeiras colunas, respectivamente das diluições 0,2 TCID₅₀, 2 TCID₅₀, 20 TCID₅₀ e 200 TCID₅₀. A quinta e a décima primeira coluna permaneciam sem nenhum reagente, consistindo em colunas limítrofes e a última coluna foi destinada ao controle de suspensão celular.

Em cada teste foi realizado o mesmo procedimento de titulação descrito no item 4.5.3, pois a suspensão viral a ser usada no teste foi obtida a partir de uma das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁸. Como o valor desse título foi previamente conhecido, apenas as diluições com intervalos próximos ao título foram testadas utilizando as cinco colunas restantes da placa.

Nas cavidades destinadas às diluições virais foram adicionados 50µl de meio de manutenção Eagle – MEM e 50µL de cada diluição por cavidade nas colunas correspondentes às diluições desejadas, com oito repetições. Transcorrido o período de incubação de 18 a 24 horas, pois a placa foi submetida aos mesmos intervalos de tempo do teste de VN, foram adicionados em todas as cavidades da placa 50µL da suspensão de células contendo 300.000 células/mL em meio de manutenção Eagle – MEM com 10,0% de SFB.

Por fim, a placa de validação voltava à estufa e após 72 horas a leitura era realizada em microscópio óptico invertido antes das demais placas do teste de VN, pois os resultados nela encontrados validavam ou não o teste realizado.

4.7 Análise Estatística

Com a finalidade de verificar a relação entre os perfis sorológicos antes e depois da vacinação nas três fazendas, os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado (X^2) e, quando um ou mais categorias possuíam uma frequência esperada igual ou menor que cinco, pelo teste exato de Fisher, no entanto, para verificar a associação entre os perfis sorológicos e os parâmetros reprodutivos observados foi feita a análise de variância pelo teste F, utilizando-se o pacote estatístico SAS – ‘Statistical Analysis System’ com 5,0% de confiabilidade (SAS, 1996; SAMPAIO, 2007).

5 RESULTADOS

Inicialmente procedeu-se com a análise laboratorial de VN com teste em duplicata das 209 amostras de soro sanguíneo da primeira colheita que foi anterior à vacinação dos animais.

Sendo assim, detectou-se nesse total de amostras das três propriedades 75 novilhas positivas para o BoHV-1 com prevalências de 39,7% na fazenda A, 27,5% na fazenda B e 36,6% na fazenda C, conforme pode ser visto na tabela 1. A análise estatística, contudo, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os perfis sorológicos (positivo ou negativo) apresentados antes da vacinação nas três fazendas estudadas ($X^2 = 0,4320$).

Posteriormente, com o propósito de determinar a resposta imune de esquema vacinal pré-definido, dos animais que foram submetidos à TE, foi dada seqüência às análises laboratoriais de VN com teste em duplicata das outras 209 amostras de soro sanguíneo colhidas após a vacinação.

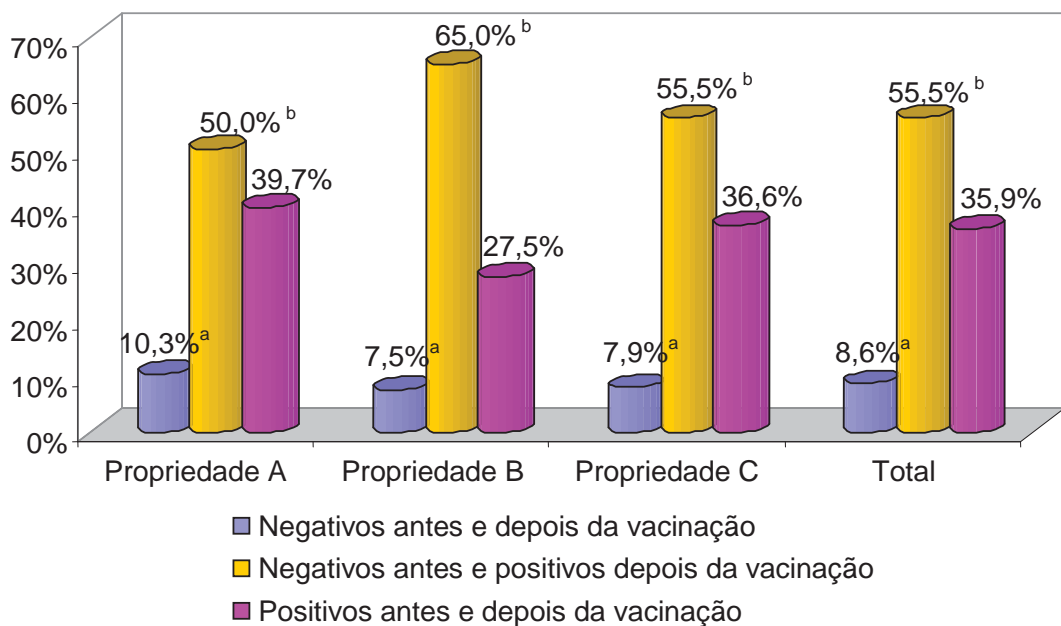
Analisando os dados obtidos de forma geral nos três rebanhos, deparou-se com três condições distintas a saber: 18 (8,6%) animais foram negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação, 116 (55,5%) foram negativos antes, mas soroconverteram em positivos depois da vacinação e 75 (35,9%) animais foram positivos antes e depois da vacinação (Tabela 1).

Tabela 1. Reatividade sorológica dos animais, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, antes e depois da vacinação em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas (A, B e C) localizadas no município de Prata (MG).

		Depois da vacinação		
		Negativos	Positivos	Total
Antes da vacinação	Negativos	18 (8,6%)	116 (55,5%)	134 (64,1%)
	Positivos	0	75 (35,9%)	75 (35,9%)
	Total	18 (8,6%)	191 (91,4%)	209 (100,0%)

Das 134 (64,1%) amostras negativas no teste de VN para o BoHV-1 antes da vacinação, 41 (60,3%) procediam da fazenda A, 29 (72,5%) da fazenda B e 64 (63,4%) da fazenda C. Após a vacinação, 18 (8,6%) continuaram negativas, sendo sete (10,3%) na fazenda A, três (7,5%) na fazenda B e oito (7,9%) na fazenda C; e 116 (55,5%) que soroconverteram em positivas, sendo que 34 (50,0%) eram amostras da fazenda A, 26 (65,0%) da B e 56 (55,5%) da C. Das 75 (35,9%) novilhas que foram positivas no teste de VN para o BoHV-1 tanto antes quanto depois da vacinação, 27 (39,7%) eram da fazenda A, 11 (27,5%) da fazenda B e 37 (36,6%) da fazenda C, resultados representados esquematicamente na figura 1.

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os perfis sorológicos apresentados antes da vacinação comparados com os depois da vacinação ($X^2= 0,0009$) entre os animais da fazenda A ($X^2= 0,023$ e teste exato de Fisher= 0,023) e os da fazenda C ($X^2= 0,025$ e teste exato de Fisher= 0,0219), porém não entre os da fazenda B ($X^2= 0,2674$ e teste exato de Fisher= 0,3698).



¹Percentuais seguidos de letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade no teste exato de Fisher

Figura 1. Representação da reatividade sorológica dos animais, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, antes e depois da vacinação, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

Desse modo, no contexto geral dos resultados, procurou-se verificar a relação entre os títulos médios geométricos (TMG) de anticorpos, apresentados antes e depois da vacinação, com os parâmetros reprodutivos monitorados que foram: número de TE necessárias para se obter prenhez e morte embrionária/fetal, sendo que quando foi necessário mais de um serviço, ou seja, mais de uma TE para confirmar a prenhez a repetição de estro foi considerada. Além disso, quando uma novilha foi submetida a quatro ou mais serviços classificou-se como repetidora de estro (HAFEZ & HAFEZ, 2004; PIERONI, 2009).

Para tanto, os dados observados foram separados de acordo com o perfil sorológico e encontram-se detalhados nos subitens a seguir. Porém, a análise estatística mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os perfis sorológicos dos animais no teste de VN para o BoHV-1 tanto antes (Teste F= 1,45 e $p=0,2066$) como depois (Teste F= 1,28 e $p=0,2745$) da vacinação dos parâmetros reprodutivos caracterizados nas três fazendas.

5.1 Animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação

Dos 18 animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação, um apresentou morte embrionária/fetal. Nos outros 17 animais (detalhados na tabela 2) foi observado que em dez (58,7%) houve sucesso de prenhez na 1ª TE, em cinco (29,3%) na 2ª, em um (6,0%) na 3ª e em um (6,0%) na 4ª TE.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos dos animais negativos antes e depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

Fazendas	Nº de TE				Total (%)
	1	2	3	4	
A	3 (17,6%)	3 (17,6%)	0	1 (6,0%)	7 (41,2%)
B	3 (17,6%)	0	0	0	3 (17,6%)
C	4 (23,5%)	2 (11,7%)	1 (6,0%)	0	7 (41,2%)
Total	10 (58,7%)	5 (29,3%)	1 (6,0%)	1 (6,0%)	17 (100,0%)

Como o número máximo de TE realizadas nesse experimento foram seis, nesse grupo verifica-se que sete novilhas apresentaram repetição de estro, sendo que uma delas precisou de quatro TE, sugerindo sua classificação como uma repetidora de estro.

5.2 Animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e positivos depois da vacinação

Dos 116 animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e positivos depois da vacinação, nove novilhas apresentaram morte embrionária/fetal e em 107 animais (detalhados na tabela 3) foi observado que, depois da vacinação, 93 (87,1%) apresentaram TMG abaixo de 16, tendo 51 (47,8%) novilhas sucesso de prenhez na 1ª TE, 23 (21,6%) na 2ª TE, 13 (12,1%) na 3ª, seis (5,6%) na 4ª, 5ª ou 6ª TE. Doze (11,1%) animais tiveram TMG entre 16 e 256, sendo que cinco (4,6%) apresentaram prenhez na 1ª TE, quatro (3,8%) na 2ª, dois (1,8%) na 3ª e um (0,9%) na 4ª, 5ª ou 6ª TE. Outros dois (1,8%) animais apresentaram TMG acima de 256, um (0,9%) deles obteve sucesso de prenhez na 1ª TE e outro na 2ª TE.

As taxas de prenhez observadas encontram-se na tabela 4, separadas de acordo com o TMG apresentado depois da vacinação. Dos 93 animais com TMG abaixo de 16, a taxa de prenhez na 1ª TE foi de 54,8%, na 2ª de 24,7%, na 3ª de 14% e na 4ª, 5ª ou 6ª de 6,5%. Dos doze animais com TMG entre 16 e 256, apresentaram na 1ª TE uma taxa de prenhez de 41,7%, na 2ª de 33,3%, na 3ª de 16,7% e na 4ª, 5ª ou 6ª de 8,3%. Os dois animais que apresentaram TMG acima de 256 apresentaram taxas de prenhez de 50% tanto na 1ª quanto na 2ª TE.

Como foram feitas até seis TE, também nesse grupo verificou-se que 50 (46,7%) das novilhas falharam na 1ª TE, sendo que sete (6,5%) precisaram de quatro ou mais serviços, o que possibilita caracterizá-las como repetidoras de estro.

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos dos animais negativos antes e que apresentaram depois da vacinação título baixo (< 16), intermediário (≥ 16 e ≤ 256) ou alto (> 256), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

TMG	Fazenda A						Fazenda B					Fazenda C				Total (%)
	Nº de TE						Nº de TE					Nº de TE				
	1	2	3	5	11	19	1	2	3	4 ou 5	1	2	3	4 ou 6		
Título < 16	19 (17,8%)	9 (8,4%)	5 (4,7%)	11 (10,4%)	6 (5,6%)	21 (19,6%)	1 (0,9%)	6 (5,6%)	4 (3,7%)	2 (1,9%)	8 (7,6%)	4 (3,7%)	4 (3,7%)	4 (3,7%)	93 (87,1%)	
Título ≥ 16 e ≤ 256	0	0	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	4 (3,7%)	0	0	0	0	3 (2,9%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	12 (11,1%)	
Título > 256	0	0	0	0	0	1 (0,9%)	0	0	0	0	1 (0,9%)	0	0	0	2 (1,9%)	
Total Parcial (%)	19 (17,8%)	9 (8,4%)	6 (5,6%)	12 (11,3%)	7 (6,5%)	26 (24,2%)	4 (3,7%)	2 (1,9%)	2 (1,9%)	12 (11,4%)	5 (4,7%)	5 (4,7%)	5 (4,7%)	107 (100,0%)		
Total (%)	34 (31,8%)						25 (23,4%)					48 (44,8%)				

Tabela 4. Taxas de prenhez dos animais negativos antes e com os diferentes títulos positivos induzidos depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

TMG	Nº de TE				Total (%)
	1	2	3	4, 5 ou 6	
Título < 16	51 (54,8%)	23 (24,7%)	13 (14%)	6 (6,5%)	93 (100,0%)**
Título ≥ 16 e ≤ 256	5 (41,7%)	4 (33,3%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	12 (100,0%)
Título > 256	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0	0	2 (100,0%)
Total (%)	57 (53,3%)	28 (26,2%)	15 (14%)	7 (6,5%)	107 (100,0%)

*ME/F = Morte embrionária/fetal

**Cálculos de percentual válidos somente na mesma linha.

5.3 Animais positivos no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação.

A tabela 5 contém os dados dos animais positivos, antes da vacinação, conforme o título agrupado entre baixo a intermediário e alto no teste de VN para o BoHV-1. Avaliando os TMG das 75 amostras positivas, verificou-se que 47 (62,7%) tiveram TMG menores do que 128, sendo 16 (21,3%) na fazenda A, nove (12,0%) na fazenda B e 22 (29,3%) na fazenda C. As outras 28 (37,3%) apresentaram TMG maiores ou igual a 128, sendo 11 (14,7%) na fazenda A, dois (2,7%) na B e 15 (20,0%) na fazenda C.

Tabela 5. Animais positivos antes da vacinação, agrupados conforme o título médio geométrico (TMG) entre baixo a intermediário (< 128) e alto (≥ 128), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

TMG	Fazenda A	Fazenda B	Fazenda C	Total
Título < 128	16 (21,3%)	9 (12,0%)	22 (29,3%)	47 (62,7%)
Título ≥ 128	11 (14,7%)	2 (2,7%)	15 (20,0%)	28 (37,3%)
Total	27 (36,0%)	11 (14,7%)	37 (49,3%)	75 (100,0%)

Dos 75 animais que se mostraram também positivos no teste de VN para o BoHV-1 depois da vacinação, a morte embrionária/fetal foi observada em quatro animais. Nos outros 71 animais, conforme mostrado na tabela 6, foi observado que 14 (19,7%) apresentaram TMG abaixo de 16, sendo que sete (9,8%) e seis (8,4%) conseguiram sucesso de prenhez na 1ª e 2ª TE, respectivamente, e um (1,5%) na 4ª ou 5ª TE. Outros 50 (70,4%) tiveram TMG entre 16 e 256, dos quais 26 (36,6%) obtiveram sucesso de prenhez na 1ª TE, 10 (14%) na 2ª, oito (11,2%) na 3ª e seis (8,5%) na 4ª ou 5ª TE. Sete (9,9%) animais tiveram TMG acima de 256, sendo que seis (8,4%) apresentaram prenhez na 1ª TE e um (1,5%) na 4ª ou 5ª TE.

A tabela 7 apresenta as taxas de prenhez dessas 71 novilhas, separadas de acordo com o TMG determinados depois da vacinação. Entre os animais com TMG abaixo de 16 observou-se uma taxa de prenhez de 50,0% na 1ª TE, 42,9% na 2ª TE e 7,1% na 4ª ou 5ª TE. Dos 50 animais com TMG entre 16 e 256, na 1ª TE a taxa de prenhez foi de 52,0%, na 2ª de 20,0%, na 3ª de 16,0% e na 4ª ou 5ª de 12,0%. Os animais que apresentaram TMG acima de 256 apresentaram taxas de prenhez de 75,0% na 1ª TE e de 12,5% na 4ª ou 5ª TE.

Descontando as 39 (54,9%) novilhas que tiveram sucesso na 1ª TE, verifica-se ainda que 32 (45,1%) apresentaram repetição de estro e oito (11,3%), dentre elas, foram repetidoras de estro.

Comparando-se os títulos de anticorpos antes e depois da vacina, pode-se verificar que 36 (48,0%) animais tiveram aumento de títulos de anticorpos, 13 (17,3%) mantiveram os títulos observados antes da vacinação e 26 (34,7%) tiveram diminuição dos mesmos.

Tabela 6. Parâmetros reprodutivos dos animais positivos antes e que apresentaram depois da vacinação título baixo (< 16), intermediário (≥ 16 e ≤ 256) ou alto (> 256), no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

	Fazenda A					Fazenda B				Fazenda C					Total (%)
	Nº de TE					Nº de TE				Nº de TE					
TMG	1	2	3	4		1	2	4		1	2	3	4 ou 5		
Título < 16	3 (4,2%)	4 (5,6%)	0	0	0	0	0	0	0	4 (5,6%)	2 (2,8%)	0	1 (1,5%)	14 (19,7%)	
Título ≥ 16 e ≤ 256	9 (12,8%)	4 (5,6%)	3 (4,2%)	2 (2,8%)	5 (7,0%)	3 (4,2%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	12 (16,9%)	3 (4,2%)	5 (7,0%)	3 (4,2%)	50 (70,4%)		
Título > 256	2 (2,8%)	0	0	0	0	0	0	0	4 (5,6%)	0	0	1 (1,5%)	7 (9,9%)		
Total Parcial (%)	14 (19,8%)	8 (11,3%)	3 (4,2%)	2 (2,8%)	5 (7,0%)	3 (4,2%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	20 (28,1%)	5 (7,0%)	5 (7,0%)	5 (7,0%)	71 (100,0%)		
Total (%)	27 (38,0%)					9 (12,7%)				35 (49,3%)					

Tabela 7. Taxas de prenhez dos animais positivos antes e com os diferentes títulos induzidos depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1, em rebanhos onde se processa a transferência de embriões (TE) de fazendas localizadas no município de Prata (MG).

TMG	Nº de TE				Total (%)
	1	2	3	4 ou 5	
Título < 16	7 (50,0%)	6 (42,9%)	0	1 (7,1%)	14 (100,0%)**
Título ≥ 16 e ≤ 256	26 (52,0%)	10 (20,0%)	8 (16,0%)	6 (12,0%)	50 (100,0%)
Título > 256	6 (75,0%)	0	0	1 (12,5%)	7 (100,0%)
Total (%)	39 (54,9%)	16 (22,5%)	8 (11,3%)	8 (11,3%)	71 (100,0%)

*ME/F = Morte embrionária/fetal

**Cálculos de percentual válidos somente na mesma linha.

6 DISCUSSÃO

Inicialmente, esse trabalho vislumbrou diagnosticar a situação sanitária quanto ao BoHV-1 de novilhas receptoras de embriões mantidas em três fazendas localizadas no município de Prata, região do Triângulo Mineiro no Estado de Minas Gerais (MG) no período precedente ao processamento biotécnico.

Sendo assim, a primeira análise laboratorial determinou a prevalência variável de 27,5% até 39,7% de animais positivos no teste de VN para o BoHV-1, percentual que ficou abaixo dos 44,7% determinados por ALEXANDRINO (2008) em rebanhos de bovinos de corte no Estado de Minas Gerais e São Paulo; dos 58,2% observados por ROCHA et al. (2001) em bovinos provenientes de propriedades localizadas em 335 municípios do Estado de Minas Gerais e dos 80,2% encontrados por MENDES et al. (2009) no mesmo Estado, porém em fêmeas de aptidão leiteira. Por outro lado, KONRAD et al. (2003) observaram 29,1% de prevalência para o BoHV-1 em rebanhos de aptidão leiteira no Estado de Minas Gerais e JUNQUEIRA et al. (2006) encontraram 36,7% de prevalência em novilhas criadas extensivamente na região oeste do Estado de São Paulo em rebanhos de bovinos de corte, prevalência que mais se aproximou da encontrada nesse estudo.

Como a análise estatística mostrou no primeiro momento que não houve diferença significativa entre os perfis sorológicos apresentados nas três fazendas antes da vacinação, então a distribuição do vírus esteve homogênea, provavelmente, devido ao uso de práticas de manejo semelhantes (DURHAN & HASSARD, 1990). Além disso, os rebanhos estudados eram formados por animais com idade em faixa etária próxima (novilhas), o que possibilitou um tipo de manejo no qual não existiu a transmissão mais intensa do agente por animais mais velhos comumente mais acometidos pelo BoHV-1, conforme salienta JUNQUEIRA et al. (2006).

Nesse estudo, 13,4% (28/209) das amostras positivas tinham títulos acima de 128 antes da vacinação. Perfil com títulos acima de 128, segundo ALFIERI et al. (1998), podem significar que há infecção recente no rebanho, e conseqüentemente causar baixo desempenho reprodutivo nos animais. Além disso, os resultados estão próximos

dos 11,0% encontrados por JUNQUEIRA et al. (2006), porém bem abaixo dos 47,6% observados por KONRAD et al. (2003); contudo, permite supor que poderia haver circulação viral em baixos níveis nas propriedades.

Num segundo momento, a análise laboratorial de VN das amostras colhidas depois da vacinação permitiu determinar a resposta imune do esquema vacinal pré-definido, com a observação de três perfis sorológicos diferentes. A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os perfis sorológicos apresentados antes da vacinação comparados com os depois da vacinação entre os animais da fazenda A e os da fazenda C. Isso se deveu à positividade geral dos animais no teste de VN que passou de 35,9% antes para 91,4% depois da vacinação, indicando que a vacina com dose única foi responsável por esse resultado, sendo que 72,7% (152/209) dos animais (116 negativos e 36 positivos) apresentaram aumento de títulos de anticorpos para o BoHV-1.

Em 18 (8,6%) animais, que apresentaram perfil sorológico negativo antes e depois da vacinação no teste de VN para o BoHV-1, não houve soroconversão. Só que outras literaturas como VALLE et al. (2006), utilizando vacina semelhante, e por POSPISIL et al. (1996), encontraram 100,0% de soroconversão utilizando duas doses com vacina inativada, cujo esquema ideal recomendado por ALFIERI et al. (1998) seria intervalos de três a quatro semanas para revacinação. Vale ressaltar que nesse experimento foi aplicada uma única dose da vacina, estímulo que pode ter sido insuficiente para a produção de níveis maiores de anticorpos em animais não infectados. Por outro lado, também se observa que o esquema não prejudicou a eficiência reprodutiva, pois 58,7% e 29,3% dos animais do experimento com esse perfil sorológico obtiveram prenhez na 1ª e 2ª TE, respectivamente.

Também há forte evidência que não houve relação estatística entre a sorologia negativa para o BoHV-1 e a ocorrência de repetições de estro apresentadas pelos animais nas três fazendas, ou seja, a falha no parâmetro reprodutivo observado foi por fator indeterminado que não dependeu do perfil sorológico negativo.

Por outro lado, entre os animais que apresentaram perfil sorológico negativo antes e positivo depois da vacinação no teste de VN para o BoHV-1, ou seja, os

animais que soroconverteram, observou-se que 87,1% apresentaram títulos de anticorpos menor ou igual a 16. Mesmo assim, esses valores foram ligeiramente maiores que os 77,7% obtidos por POSPISIL et al. (1996) três semanas após uma única dose de vacina em animais negativos antes da vacinação em rebanho naturalmente infectado.

No trabalho citado anteriormente, os autores observaram indução de títulos máximos de 128 e SILVA (2006) de 256 com vacinas comerciais aplicadas com esquema de revacinação. Nesse estudo, utilizando uma única dose de vacina, verificou-se que somente 11,1% dos animais negativos antes e positivos depois da vacinação apresentaram título entre 16 e 256, acima do encontrado por POSPISIL et al (1996) e semelhante ao demonstrado por SILVA (2006).

Dois animais (1,8%) responderam com títulos de anticorpos acima de 256. Nesse caso, a vacina dificilmente seria responsável pelos títulos tão altos, porque a colheita da segunda amostra de soro desses animais foi realizada entre sete e dez meses após a única vacinação. Portanto é mais provável que os animais atingiram esses títulos de anticorpos apenas com uma dose de vacina, porque eram portadores latentes e devido à infecção por reexcreção viral recente no rebanho ou no passado de sua origem.

GARCIA et al. (2005) relatam taxas de gestação entre 20 e 60% para embriões PIV, valores semelhantes aos observados nesse estudo após a 1ª e 2ª TE, porém menores do que quando foi realizada três ou mais TE nos animais com perfil sorológico negativo antes e positivo depois da vacinação. Comparando esses resultados com os obtidos por PONTES et al. (2009 e 2011) cuja baixa taxa de prenhez obtida foi por fatores relacionados às receptoras utilizadas, verifica-se então que após a 1ª TE os resultados foram melhores do que os encontrados por esses autores, porém piores quando as novilhas foram submetidas a duas ou mais TE. Portanto, na 1ª TE foram obtidos boas taxas de prenhez para embriões PIV e, embora esse estudo não tenha um grupo controle não vacinado, pode-se inferir que a vacinação não teve influência negativa sobre os índices de gestação.

Dos 75 animais com perfil sorológico positivo antes e depois da vacinação no teste de VN para o BoHV-1 observa-se que os TMG, depois da vacinação,

concentraram-se entre os títulos 16 e 256, portanto dentro dos padrões de imunidade aceitáveis quando considera que títulos mínimos de 16 ou 32 seja suficiente para proteger os animais da infecção clínica frente a uma exposição ao agente (POSPISIL et al., 1996).

Quando se comparou os títulos de anticorpos antes e depois da vacinação desses animais, observou-se que 48,0% tiveram aumento de títulos de anticorpos, o que pode ser atribuído ao efeito 'booster' em animais que se encontravam latentemente infectados (PASTORET & THIRY, 1985). Nos demais animais esse efeito não foi observado, no entanto, 54,8% das novilhas tiveram sucesso de prenhez após a 1ª TE e 22,4% na 2ª TE. Também não houve relação estatística significativa entre o perfil sorológico positivo antes e depois da vacinação para o BoHV-1 e a ocorrência das repetições de estro, sugerindo, mais uma vez, que devem-se a outros fatores.

As taxas de prenhez dessas novilhas em apreço se encontraram dentro do intervalo observado por GARCIA et al. (2005) após a 1ª e 2ª TE, no entanto são menores quando realizadas três ou mais TE. Por outro lado, os valores obtidos após a 1ª TE foram maiores que os determinados por PONTES et al. (2009 e 2011), porém menores nas novilhas que foram submetidas a duas ou mais TE, ou seja, mais uma vez, na 1ª TE foram obtidos resultados melhores para embriões PIV e que, apesar de não haver um grupo controle não vacinado, a vacinação não teve influência negativa sobre os índices de gestação.

Porém, quando considerado que todo animal com mais de uma TE teve repetição de estro, então nesse estudo observou 89 (42,6%) animais com essa alteração. Além disso, 16 (7,7%) novilhas precisaram de quatro ou mais TE para conseguir a prenhez, fato que caracteriza repetidoras de estro, conforme as considerações feitas por HAFEZ & HAFEZ (2004) e PIERONI (2009). Segundo DOCHI et al. (2008) as melhores taxas de concepção encontram-se entre os animais que são submetidos a uma menor quantidade de serviços, mesmo assim, GARCÍA-ISPIERTO et al. (2006) e PIERONI (2009) insistem na aplicação da técnica da TE mesmo em vacas repetidoras de estro.

Assim, vale ressaltar que a relação embrião-receptora é fundamental para o sucesso de prenhez, primeiramente pela natureza estranha do concepto, devido à

herança de genes paternos que codificam proteínas estranhas à mãe poderem ativar o seu sistema imunológico e levar à destruição do concepto. Para que isso não aconteça, modificações nas células do sistema imunológico materno e de características únicas da placenta fetal são necessárias para limitar a imunogenicidade da mãe. Por outro lado, também o embrião deve promover a liberação de interferon-tau (IFN- τ) à fim de sinalizar sua presença para a mãe, cabendo à receptora reconhecer e conduzir a gestação, caso contrário, há a repetição de estro (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006; DOCHI et al., 2008).

Por fim, pode-se verificar que, independente do perfil sorológico apresentado antes e depois da vacinação, foram obtidos bons resultados reprodutivos com a TE. Levando-se em consideração todas as novilhas estudadas, 179 (85,6%) delas tiveram confirmação de prenhez até a 3ª TE, destacando-se 106 (50,7%) delas que confirmaram a prenhez após uma única TE. Vários fatores podem ser apontados como responsáveis por esses resultados, dentre eles estão a qualidade do embrião utilizado, as condições intrínsecas de produção laboratorial, bem como o estado nutricional, reprodutivo e sanitário das receptoras. No entanto é importante ressaltar a habilidade do operador, uma vez que a manipulação do útero, a passagem do aplicador, bem como a possibilidade de inoculação de microrganismos ou mesmo a lesão interna do útero podem interferir na taxa de concepção da TE (SREENAN & DISIN, 1987; SCHALLENBERGER et al., 1989; ODENSVI et al., 1993).

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados no teste de VN e confrontados com a literatura sobre BoHV-1, em três rebanhos de novilhas receptoras de embriões concluiu-se que:

- a prevalência média de animais positivos nos rebanhos estudados se aproximaram dos outros relatos em rebanhos com bovinos de corte;
- os perfis sorológicos antes da vacinação dos animais não foram diferentes nas fazendas A, B e C;
- comparando os perfis sorológicos dos animais antes e depois da vacinação foram diferentes nas fazendas A e C, fato que não aconteceu na fazenda B;
- o maior sucesso de prenhez na 1ª TE para a PIV foi observado nos animais que eram positivos e atingiram títulos acima de 256 depois da vacinação;
- no contexto estatístico, os índices gerais de gestação não tiveram influência significativa em decorrência da vacinação com dose única.

8. REFERÊNCIAS*

ALEXANDRINO, B. **Variação da ocorrência da rinotraqueíte infecciosa bovina pela associação com a diarreia viral bovina e a leucose enzoótica bovina.** 2008. 59f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C. Conseqüências da infecção pelo Herpesvírus Bovino Tipo 1 sobre o sistema reprodutivo de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 19, n. 1, p. 86-93, 1998.

ALICE, F.J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.

ARMSTRONG, J.A.; PEREIRA, H.G.; ANDREWES, C. H. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis and its affinity with the herpesvirus group. **Virology**, Orlando, n. 14, p. 276-285, 1961.

BIELANSKI, A.; LOEWEN, K. S.; DEL CAMPO, M. R.; SIRARD, M. A.; WILLADSEN, S. Isolation of bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, n. 40, p. 531-38, 1993.

BOSCH, J. C.; KAASSHOEK, M. J.; KROESE, A. H.; VAN OIRSCHOT, J. T. An attenuated bovine herpesvirus 1 marker vaccine induces a better protection than two inactivated marker vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, n. 52, p. 223-234, 1996.

* De acordo com as normas da ABNT-NR 6023 de agosto de 2002.

BOSCH, J. C.; KAASSHOEK, M. J.; VAN OIRSCHOT, J. T. Inactivated bovine herpesvirus 1 marker vaccines are more efficacious in reducing virus excretion after reactivation than a live marker vaccine. **Vaccine**, Kidlington, n. 15, p. 1512-1517, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose (PNCEBT). Brasília: Departamento de Saúde Animal, 2006. 188 p.

BROWN, F. The Classification and Nomenclature of Viruses: Summary of Results of Meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada 1987. **Intervirology**, Basel, v. 30, p. 181-186, 1989.

CRUICK-SHANK, J. G.; BERRY, D. M. Morphology of infectious bovine rhinotracheitis virus. **Virology**, Orlando, v. 25, p. 481, 1965.

DEL FAVA, C. Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR/IPV). **Boletim do Leite**, Piracicaba, n. 25, 1996.

DINTER, Z.; MOREIN, B. **Virus infections of ruminants**. Elsevier Science Publishers, vol. 3, p. 69-151, 1990.

DOCHI, O.; TAKAHASHI, K.; HIRAI, T.; HAYAKAWA, H.; TANISAWA, M.; YAMAMOTO, Y.; KOYAMA, H. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breedind dairy cattle. **Theriogenology**, New York, v. 69, p. 124-128, 2008.

DURHAN, P. J. K.; HASSARD, E. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial and bovine viral diarrhoea viruses in cattle of Saskatchewan and Alberta. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, p. 815-820, 1990.

EDWARDS, S.; WHITE, H.; NIXON, P. A study of the predominant genotypes of Bovid Herpesvirus 1 found in the U.K. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 213-223, 1990.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 151-170, 2001.

FERREIRA, C. Y. M. R.; PIATTI, R. M.; MIYASHIRO, S.; GALUPPO, A. G.; ZERIO, N. M. C.; SAMARA, S. I.; D'ANGELO, M. Ocorrência de Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1) no líquido folicular e células epiteliais de oviduto bovino. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 309-311, 2005.

FLORES, E. F. **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 888 p.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GARCÍA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; NOGAREDA, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; DE RENSIS, F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, New York, v. 65, p. 799-807, 2006.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1,

2005, Londrina. **Biotechnologia da reprodução em bovinos**. Londrina: UEL, 2005, 201p.

GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2002. 340 p.

GUERIN, B.; GUIENNE, B.; CHAFFAUX, S.T.; HARLAY, T.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. Contamination des ovocytes et des embryos fécondes *in vitro* apres infection experimentale de vaches donneuses par le virus herpes bovin de type 1 (BoHV-1-). **Recueil de Médecine Vétérinaire**, Masons Alfort, v. 165, n. 10, p. 827-833, 1989.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Editora Manole, 2004. 513p.

JUNQUEIRA, J. R. C.; FREITAS, J. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 471-480, 2006.

KAHRS, R. F. Infectious Bovine Rhinotracheitis: a review and update. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.171, n.10, p.1055-1064, 1977.

KASTELIC, J. P. Noninfectious embryonic loss in cattle. **Veterinary Medicine**, v. 79, n. 12, p. 584-589, 1994.

KENDRICK, J. W.; GILLESPIE, J. H.; McENTEE, K. Infectious pustular vulvovaginitis of cattle. **The Cornell Veterinarian**, v. 48, n. 4, p. 458-495, 1958.

KONRAD, P. A.; RODRIGUES, R. O.; CHAGAS, A. C. P.; PAZ, G. F.; LEITE, R. C. Associação da ocorrência da rinotraqueíte infecciosa bovina e problemas reprodutivos em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 4, p. 647-651, 2003.

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.

LEMAIRE M.; PASTORET P.P.; THIRY E. Le contrôle de l'infection par le virus de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, vol. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

MADIN, S.H.; YORK, R.J.; MCKERCHER, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. **Science**, Washington, v. 124, n. 3225, p. 721-722, 1956.

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: IETS, 1998. p. 57-70.

MARS, M. H.; DE JONG, M. C.; VAN OIRSCHOT, J. T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 76, p. 1-13, 2000.

MCKERCHER, D. G.; MOULTON, J. E.; KENDRICK, J. W.; SAITO, J. K. Recent developments in upper respiratory disease of cattle. In: ANNUAL MEETING OF THE UNITED STATES LIVESTOCK SANITARY ASSOCIATION, 59., 1955. **Proceedings...**, 1955. p. 151-167.

MENDES, M. B.; BITTAR, J. F. F.; PEREIRA, W. A. B.; ARDUINO, G. G. C.; BITTAR, E. R.; PANETTO, J. C. C.; SANTOS, J. P. Determinação da prevalência das principais

doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Goiânia: Revista Ciência Animal Brasileira, 2009, v. 1, p.772-777.

METZLER, A. E.; MATILE, H.; GASSMANN, U.; ENGELS, M.; WYLER, R. European isolates of bovine Herpesvirus 1: a comparison os restriction endonuclease sites, polypeptides and reactivity with monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, Vienna, v. 85, n. 1-2, p. 57-69, 1985.

MILLER, J. M. Infectious necrotic rhinotracheitis in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 126, n. 939, p. 463-467, 1955.

MILLER, J. M. The effectus of IBR virus infection on reproductive function of cattle. **Veterinary Medicine.**, v. 86, n.1, p.95-98, 1991.

MILLER, J. M.; VAN DER MATTEN, M. J. Effect of primary and recurrent infectious bovine rhinotracheitis virus infection on the bovine ovary. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 46, n. 7, p. 1434-1437, 1985.

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**, Chicago, v. 47, n. 2, p. 223-228, 1986.

MOREIRA, S. P. G. **Avaliação do desenvolvimento ponderal de bezerros em plantéis leiteiros infectados pelo Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1)**. 2004. 89f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

NICHOLSON, M. J.; BUTTERWORTH, M. H. **A guide to condition scoring of zebu cattle**. Addis Ababa: International Livestock Centre for Africa, 1986. 29p.

ODENSVIK, K.; DUCHENS, M.; GUSTAFSSON, H. Does mechanical manipulation of the reproductive organs cause a prostaglandin release in the heifer during embryo transfer? **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 219-221, 1993.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/ 2.04.13_IBR_IPV.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.13_IBR_IPV.pdf)> Acesso em: 18 out 2010.

PASTORET, P.; THIRBIUK-RUDAN Y, E.; BROCHIER, B.; DERBOVEN, G. Bovine herpesvirus 1 infection of cattle pathogenesis, latency, consequences of latency. **Annual Record Veterinary**, v.13, p.221-235, 1982.

PASTORET, P. P.; THIRY, E. Diagnosis and prophylaxis of infectious bovine rhinotracheitis: the role of virus latency. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 1985.

PATEL, J. R. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, n. 31, p. 405-481, 2005.

PIERONI, J. S. P. **Influência do local de inovulação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* sobre as taxas de concepção de fêmeas bovinas e sua relação com a**

morfologia uterina. 2009. 121p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

PITUCO, E.M. **Aspectos clínicos, prevenção e controle da IBR.** Disponível em: <http://www.infobibos.com/artigos/2009_2/IBR/Index.htm>. Acesso em: 20 out. 2010.

PITUCO, E. M.; CARNEIRO, B.; MENZ, I.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H. Detecção de anticorpos contra o Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, p. 126, 1999. Suplemento.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, New York, 2011. Disponível em: <<http://www.dx.doi.org>>. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.12.026.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, New York, n. 71, p. 690-697, 2009.

POSPISIL, Z.; KREJČÍ, J.; JÍNEK, P.; LÁNY, P.; ZENDULKOVÁ, D.; CÍHAL, P. Development of a disease control program based on the use of an inactivated vaccine against infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Microbiology**, v.53, n.1- 2, p.199-206, 1996.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

REED, L. J.; MUENCH, H. A. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REICHENBACH, H.D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, supl. 31, p.15-27, 2003.

ROCHA, M. A. Diagnóstico da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 535-539, 1999.

ROCHA, M. A.; GOUVEIA, A. M. G.; LOBATO, Z. I. P.; LEITE, R. C. Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1991. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 645-647, 2001.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS, R. C.; FLECKENSTEIN, B.; LOPEZ, C.; MINSON, A. C.; STUDDERT, M.J. The family *Herpesviridae*: An update. **Archives of Virology**, Vienna, v. 123, p. 425-449, 1992.

RUFINO, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Impacto do herpesvírus bovino tipo 1 e do vírus da diarreia viral bovina na transferência de embriões. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 78-84, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de estudo e pesquisa em medicina veterinária e zootecnia, 2007. 264p.

SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows**: version 6.12 (compact disc), Cary. NC, USA, SAS. Institute, 1996.

SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; MEYER, H. H. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 37, p. 277-286, 1989.

SCHROEDER, R. J.; MOYS, M. D. An acute upper respiratory infection of dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 125, p. 471-472, 1954.

SILVA, L. F. **Imunogenicidade de vacinas inativadas contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em bovinos e cobaias**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SREENAN, J. M.; DISIN, M. G. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, New York, v. 27, p. 99-113, 1987.

STRAUB, O. C. Infectious BHV-1: relevance and spread in Europe. **Compendium of Immunological and Microbiological Infectious Diseases**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

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

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, p. 203-209, 2001.

TIKOO, S. K.; CAMPOS, M.; BABIUK, L. A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. In: MARAMOROSCH, K.; MURPHY, F.A.; SHANTKIN, A.J. **Advances in virus research**. San Diego: Academic Press, 1995. v. 45, p. 191-223.

VALLE, O. J. G.; REVA, D.; GONÇALVES, R. L.; LAMBERTI, Y. J. C. Resposta imunológica humoral em bovinos induzida pelas vacinas Biopoligen® HS e Bioabortogen® H contra a IBR e BVD em um ensaio a campo em condições brasileiras. **A hora veterinária**, São Paulo, ano 25, n.149, p. 50-53, 2006.

VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURK, S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 113, p. 3-4, 2006.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.; CHARLIER, G.; VAN OOSTVELDT, P.; KRUIF, A. Why is the zona pellucida of *in vitro*-produced embryos an efficient barrier for viral infection? **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 1, p. 276, 1999.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n.2, p. 100-109, 2008.

WHITE, M. B.; SNOWDON, W. A. The breeding record of cows inseminated with a batch of semen contaminated with infectious bovine rhinotracheitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 49, p. 501-506, 1973.

WYLER, R.; ENGELS, M.; SCHWYZR, M. Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginites (BHV-1). In: WITTMANN, G. **Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs**. Massachusetts: Keuwer Academic Publishers, 1989. p.1-72.