



## BoHV-1 (o vírus da IBR) e sua relação com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina

*Study of the relationship between BoHV-1 (IBR virus) and cows' genital structures and organs*

Eduardo Paulino da Costa<sup>1</sup>, Vanessa Lopes Dias Queiroz, Abelardo Silva Junior, José Domingos Guimarães, Saullo Vinicius Pereira Alves, Marcus Rebouças Santos, Luiz Fernando Lino de Souza

Departamento de Medicina Veterinária (DVT), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [epcosta@ufv.br](mailto:epcosta@ufv.br)

### Resumo

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina é uma relevante doença, tendo em vista os transtornos reprodutivos causados, a facilidade de disseminação, o difícil controle e a ampla disseminação nos rebanhos bovinos de corte e de leite. O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) pode estar presente em fluidos onde os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos, assim como no sêmen, nos órgãos genitais e também no líquido folicular e ovócitos. A interação do BoHV-1 com estruturas e órgãos genitais da fêmea bovina vem sendo estudada pelo Grupo de trabalho. Até o presente foram encontrados resultados relevantes nesta interação. O DNA viral foi detectado em ovários, ovócitos e em complexos *cumulus oophorus* de animais soropositivos. Verificou-se ainda que vacas infectadas naturalmente apresentam comprometimento na taxa de maturação nuclear ovocitária. Trabalhos em andamento estão demonstrando, em animais soropositivos, a presença de partículas virais em tecido ovariano, uterino e tubárico, sendo em substancial quantidade no tecido ovariano. Teria o vírus alguma afinidade por estes órgãos? Os resultados ainda são parciais, sugerindo a necessidade de aprofundar os estudos a respeito.

**Palavras-chave:** Bovinos, BoHV-1, órgãos genitais, embriões e gametas.

### Abstract

*Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) is an important disease because it can cause reproductive problems. It is also highly contagious with a high prevalence in beef and dairy herds, making it very difficult to control viral spread. BoHV-1 might be present in embryo fluids when collected, manipulated, cryopreserved, or transferred, as well as in the semen, genital organs, follicular fluids, and oocytes. Here, we investigated the relationship between BoHV-1 and cows' genital organs. Our results showed relevant findings regarding this relationship. For instance, viral DNA was detected in the ovary, oocytes, and cumulus-oocyte complex from BoHV-1 positive cows. Our results also showed that the oocyte nuclear maturation rate was compromised in naturally infected cows. Furthermore, BoHV-1 particles were detected in the ovary, uterus, and the uterine tube tissues, in which the highest number of viral particles was found in the ovary tissue. Despite the promising results, they are still preliminary to make conclusions about the tropism of the virus for these organs, and therefore, further investigation is still required for that.*

**Keywords:** Bovine, BoHV-1, genital organs, embryos, and gametes.

### Introdução

O herpesvírus bovino 1 (BoHV-1), agente causador da IBR, é um agente cosmopolita e apresenta alta disseminação em rebanhos bovinos de todo o mundo com exceção de alguns países europeus que são livres do BoHV-1 (Nandi et al., 2011; Fino et al., 2012; Ravishankar et al., 2013). A doença foi descrita pela primeira vez na Alemanha, durante o século XIX (Graham, 2013), sendo que no Brasil, a IBR foi registrada inicialmente no estado da Bahia em 1962 e o BoHV-1 isolado pela primeira vez em 1978, a partir de pústulas vaginais de vacas (Alice, 1978).

Trata-se de uma relevante doença, tendo em vista os transtornos reprodutivos causados, a facilidade de disseminação, o difícil controle e a ampla disseminação nos rebanhos bovinos de corte e de leite (Médici et al., 2000; Takiuchi et al., 2001). A infecção caracteriza-se por diversas formas clínicas que comprometem o aparelho respiratório e os órgãos genitais. No contexto da reprodução, o agente pode determinar repetição de estros a intervalos regulares ou irregulares, morte embrionária ou abortamentos (Miller e Van der Maaten, 1986).

As principais biotécnicas da reprodução animal utilizadas na bovinocultura, como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIV), podem ser potenciais disseminadoras desta doença, quando são utilizados insumos, gametas ou embriões contaminados pelo vírus. Neste contexto, vale ressaltar que o Brasil assume papel de destaque quanto ao uso destas biotecnologias, atingindo no ano de 2014 a marca de 354.892 embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, segundo dados da



Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Adicionalmente, quanto ao uso de sêmen na inseminação artificial, foi comercializado no Brasil o volume recorde de 13.609.311 milhões de palhetas em 2014, segundo o Index Asbia, divulgado pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2014).

Tendo em vista a elevada prevalência da doença nos rebanhos brasileiros, assim como os prejuízos causados na eficiência reprodutiva, o nosso Grupo de Trabalho vem atuando ultimamente nesta linha de pesquisa. Este Grupo de Trabalho multidisciplinar é constituído basicamente por especialistas em Virologia, Biologia Molecular e Reprodução Animal, incluindo no contexto, orientados destes pesquisadores. Face às escassas informações da relação do vírus com estruturas e órgãos genitais femininos, as pesquisas deste Grupo estão direcionadas em estudos a respeito, cujos resultados encontrados e em andamento encontram-se inseridos no final deste texto.

O tema IBR é complexo e rico em diversidade de informações. Destarte, seria pretensiosa a tentativa de descrever todos os aspectos e diversidades em um único texto científico, como este ora apresentado. Diante disto, objetiva-se no presente trabalho apresentar uma sinopse objetiva a respeito, abordando alguns aspectos relevantes sobre o assunto, assim como alguns avanços em conhecimentos que podem contribuir para o entendimento da doença, no contexto da reprodução em bovinos.

Assim, serão abordados, de maneira resumida, aspectos relacionados às características gerais do vírus, prevalência da infecção em rebanhos bovinos, riscos de contaminação por embriões e gametas, interação do vírus com a zona pelúcida, o diagnóstico viral, assim como algumas considerações sobre os tipos de vacinas disponíveis.

Finalmente, serão abordados os estudos concluídos ou em andamento do Grupo de trabalho citado anteriormente, a respeito da relação do vírus com estruturas e órgãos genitais femininos.

### Características gerais do Herpesvírus bovino 1

O Herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) pertence à Ordem *Herpesvirales*, Família *Herpesviridae*, Subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Varicellovirus* (Muylkens et al., 2007). A partícula viral apresenta envelope, simetria icosaédrica e um diâmetro entre 70 a 110 nm (Fenner, 1987). O genoma viral codifica cerca de 70 proteínas, entre enzimas virais, proteínas reguladoras estruturais e não estruturais (Muylkens et al., 2007). Estudos utilizando enzimas de restrição e sequenciamento genômico possibilitaram a divisão do BoHV-1 em três subtipos, BoHV-1.1, BoHV-1.2a e BoHV-1.2b.

A forma natural de entrada do BoHV-1 nos hospedeiros é através das membranas mucosas do aparelho respiratório cranial, do epitélio conjuntival e dos órgãos genitais. O contato direto das regiões nasais entre os animais é a principal via de transmissão do BoHV-1, sendo que pode ocorrer também por meio de aerossóis em distâncias curtas. Contudo, a infecção genital pode ocorrer pela monta natural e/ou IA, principalmente pelo sêmen contaminado pelo vírus (Kupferschmied et al., 1986; Mars et al., 2000), ou pela transferência de embriões (produzidos *in vitro* ou *in vivo*), com o patógeno associado à zona pelúcida ou presente nos líquidos onde o embrião é manipulado (D'Angelo, 1998).

Como formas indiretas e menos comuns de transmissão, tem-se a ingestão de água e de alimentos contaminados, além da coleta de sêmen com vaginas artificiais também contaminadas (Engels e Ackermann, 1996).

Durante a infecção aguda, o vírus é excretado pelas secreções. Contudo, após a primoinfecção ocorre a latência viral (principal característica biológica dos herpesvírus), com o vírus se mantendo em gânglios periféricos, sendo que neste estado não há excreção viral. Entretanto, a latência induz nos animais o estado de portadores e transmissores potenciais do vírus, devido aos episódios de re-excreção viral. Assim, o agente pode ser reativado sob condições de estresse ou de terapia com corticoide, com consequente liberação de partículas virais infectantes (Engels e Ackermann, 1996; Workman et al., 2012).

A forma genital manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de pequenas vesículas que evoluem para pústulas e erosões na vulva, no vestíbulo da vagina e na vagina. O epitélio apresenta-se edemaciado, hiperêmico e com secreção, a qual pode tornar-se mucopurulenta devido à contaminação bacteriana secundária. Além disso, o vírus pode também determinar lesões necrosantes nos ovários, principalmente se a infecção ocorrer no período da ovulação (Miller e Van der Maaten, 1986). Em touros, lesões similares são encontradas no prepúcio e pênis (Wyler et al., 1989).

### Prevalência da infecção pelo BoHV-1

Esta doença encontra-se disseminada em todo o mundo. Assim, tem sido encontrado elevada prevalência de rebanhos soropositivos em países europeus (40 a 50% na Grã-Bretanha e 62% na Bélgica e 74,9% na Irlanda, conforme relatos de Raaperi et al. (2010) e Cowley et al. (2011). Por outro lado, a Dinamarca e a Suíça possuem baixa prevalência de animais soropositivos, em consequência da implantação de um rígido programa de erradicação com o sacrifício dos animais portadores, obtendo a condição de países livres do vírus (Ackermann e Engels, 2005).



Na Índia, Nandi et al. (2011) encontraram 38,6% de amostras soropositivas oriundas de machos bovinos não vacinados. Adicionalmente, um estudo conduzido por Ravishankar et al. (2013) com 65 reprodutores não vacinados no norte da Índia, indicou que 96,92% dos animais eram reagentes positivos. Contudo, apenas 61,54% das amostras, apresentaram o DNA do BoHV-1 no sêmen, indicando que nem todos os touros soropositivos estavam eliminando o vírus no ejaculado. Na região central do Irã (província Esfahan), a soroprevalência de animais não vacinados atingiu 72% em uma das áreas de produção leiteira mais importantes do país (Shirvani et al., 2012). No Canadá, há relatos de 59,5% de rebanhos infectados pelo BoHV-1 (Durham e Hassard, 1990).

No Brasil, dados regionais, obtidos a partir de levantamentos sorológicos revelam também uma expressiva disseminação do vírus em rebanhos de corte e leite. Dentre os levantamentos realizados, verifica-se uma prevalência 42,2 % em São Paulo (Mueller et al., 1981), 52,9, 71,3 e 81,7% no Rio Grande do Sul (Ravazzolo et al., 1989, Vidor et al., 1995 e Piovesan et al., 2013, respectivamente). Um estudo realizado neste último estado (Lovato et al., 1995) revelou que 91,9% de 99 municípios avaliados apresentavam animais soropositivos.

No estado de Minas Gerais, estudos realizados em 335 municípios, demonstraram que em 313 (93,4%) destes apresentaram animais com sorologia positiva. O exame de 5.511 amostras demonstrou que 58,2% eram soropositivas (Rocha et al., 2001). No Espírito Santo, Santos et al. (2014) encontraram 66,8% de amostras positivas oriundas de 59 rebanhos de vacas leiteiras não vacinadas, no total de 23 municípios avaliados.

No Estado de Goiás, um estudo com 6.932 animais não vacinados provenientes de 232 municípios apresentou 51,9% de soropositividade, sendo que 100% dos municípios apresentaram pelo menos uma propriedade positiva (Barbosa et al., 2005). No Paraná, Dias et al. (2013) realizaram um estudo com 14.803 fêmeas, provenientes de 2.018 rebanhos não vacinados. Verificaram que 71,3% dos rebanhos eram positivos para BoHV-1 enquanto que 59,0% das fêmeas eram soropositivas.

Ainda no Brasil, Pituco (1988) e Rocha et al. (1994) constataram uma prevalência de 72,5 e 63,15% de animais soropositivos, respectivamente, em levantamentos sorológicos em touros de centrais de inseminação de vários estados brasileiros. Adicionalmente, em estudos com amostras de sêmen fresco oriundas do estado de Rio Grande do Sul e Goiás, foram encontradas 44,7% positivas para o BoHV-1 (Oliveira et al., 2011).

### **Riscos de contaminação por embriões e gametas**

O uso de biotécnicas reprodutivas como a IA e a TE (embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*), no contexto geral, têm contribuído para a redução na transmissão de patógenos, quando comparado ao transporte dos animais em si. Contudo, não se deve desconsiderar os riscos destas técnicas na transmissão de agentes patogênicos (Thibier e Wrathall, 2012).

A transmissão do BoHV-1 de forma direta ou indireta por meio do sêmen pode acarretar prejuízos sanitários e econômicos. Este agente infeccioso pode ser encontrado no sêmen, independentemente do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (Rocha et al., 1999). Apesar do BoHV-1 ser um dos agentes infecciosos em que os reprodutores devem ser avaliados, antes de ingressarem como doadores de sêmen (segundo a Organização Mundial de Saúde Animal), a legislação nacional ainda carece de requisitos a respeito. Assim, a Instrução Normativa N° 48 de 17 de junho de 2003 do MAPA não estabelece que a IBR esteja dentre os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no Brasil, apesar desta exigência constar na Instrução Normativa N° 8 de 10 de março de 2006, a qual estabelece que os animais residentes em Centrais e cujo sêmen seja destinado à exportação, devem ser submetidos às provas diagnósticas e apresentar resultado negativo para o BoHV-1.

Para que ocorra a transmissão de um patógeno ao embrião, é necessário que o agente esteja presente nas células embrionárias (infecção embrionária verdadeira), aderido ou associado à zona pelúcida (ZP), ou presente nos fluidos onde os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Wrathall, 1995; Wrathall e Suttmöller, 1998).

A infecção viral de células embrionárias irá comprometer posteriormente o embrião, o feto ou, subsequentemente, o animal recém-nascido. Nesse tipo de infecção, o patógeno pode estar associado ao ovócito ou ser carregado para o seu interior durante o processo da fecundação, por meio da fusão com o espermatozoide contaminado (Wrathall e Suttmöller, 1998).

O BoHV-1 pode estar presente em materiais biológicos utilizados em biotecnologias da reprodução assistida. Bielanski et al. (1993) salientaram que os embriões positivos para o BoHV-1 estiveram associados ao fluido folicular também positivo. Estes achados salientam a importância de garantir a biossegurança de materiais biológicos utilizados na PIV.

Ademais, são também consideradas fontes de contaminação os materiais de origem animal utilizados para suplementação dos meios de cultura, as células somáticas utilizadas na maturação e/ou manutenção dos embriões, os meios de lavagem, além do próprio profissional, instrumentos ou equipamentos (Galuppo, 2005).

Vale ressaltar que existem diferenças na relação de patógenos com embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, tendo em vista que embriões desenvolvidos pela FIV diferem morfológica e fisiologicamente daqueles fertilizados *in vivo* (Wright e Ellington, 1995). Segundo Bielanski (2006), as técnicas de fertilização *in vitro*



possuem riscos específicos quanto à transmissão de patógenos, devido às condições artificiais de cultivo, que são substancialmente diferentes daquelas encontradas *in vivo*.

Adicionalmente, Vanroose et al. (2000) relatam que a ZP possui peculiaridades diferentes, dependendo do tipo de embrião. Neste contexto, alguns patógenos são capazes de aderir mais prontamente em embriões produzidos *in vitro* do que *in vivo* (Thibier, 2011). Também Pollard e Leibo (1993) relatam que a dissolução da ZP pela enzima pronase é mais lenta em embriões produzidos *in vivo* (387 segundos) do que nos produzidos *in vitro* (132 segundos), caracterizando que existem diferenças na estrutura da mesma.

### **A Zona Pelúcida como barreira mecânica e veículo passivo para o vírus**

A Zona Pelúcida (ZP) é uma matriz extracelular única que envolve o ovócito e também o embrião em sua fase inicial conferindo especificidade na fertilização, bloqueio à polispermia e proteção durante os estádios iniciais do desenvolvimento embrionário. Segundo Stringfellow e Givens (2000a), a maioria dos patógenos é incapaz de penetra-la quando intacta.

Os vírus não são capazes de replicar na ZP em si, uma vez que se trata de uma estrutura acelular. Adicionalmente, Vanroose et al. (2000) relatam que a estrutura da ZP dos embriões bovinos não permite que os vírus BoHV-1 e BVD transpassem essa barreira. Segundo Wrathall e Suttmöller (1998), a penetração do vírus pela ZP é improvável, pois os canais da ZP deixados pelas expansões das células da *corona radiata* ou pela passagem do espermatozoide se fecham muito rapidamente.

Contudo, o risco de infecção viral não deve ser excluído uma vez que, ainda que não transpassem, as partículas virais podem ser retidas nas camadas mais externas da ZP, podendo penetrar no ovócito no momento da fertilização (Bowen, 1979). Além disto, eles podem atravessar a membrana plasmática e infectar o embrião, quando o mesmo já não está sob a proteção da ZP (Bielanski, 2006; Ponsart e Pozzi, 2013).

Conforme relatado anteriormente, apesar da maioria dos agentes infecciosos não serem capazes de penetrar na ZP intacta, especialmente vírus, podem aderir-se a essa estrutura, ocorrendo a infecção do embrião no momento da sua eclosão. Entretanto, os vírus aderidos à superfície da ZP são vulneráveis a tratamentos específicos, com o objetivo de removê-los ou inativá-los. Neste contexto, a IETS descreve a necessidade de utilizar a tripsina no tratamento dos embriões, a qual demonstra ser efetiva após exposição a diferentes patógenos bovinos (Stringfellow e Givens, 2000b). Os tratamentos realizados com o objetivo profilático podem ser realizados com sucesso, ainda que em alguns casos não tornem os embriões completamente livres do vírus (Wrathall e Suttmöller, 1998; Bielanski e Lalonde, 2009).

Todavia, vale ressaltar que existem relatos contraditórios a respeito. Assim, Stringfellow e Givens (2000b) relatam que há patógenos infecciosos, dentre eles o BoHV-1, que podem permanecer associados a embriões bovinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*, mesmo após exposição à tripsina, de acordo com as recomendações da IETS. Em uma revisão apresentada, estes autores ressaltam que embriões derivados *in vivo* e expostos ao BoHV-1 não apresentaram mais o agente viral após a exposição à tripsina. Porém, o vírus permaneceu associado aos embriões produzidos *in vitro*. Eles destacam a relativa ineficácia dos procedimentos de lavagem, mesmo com a tripsina, o que gera preocupações legítimas.

Diante destas considerações, ressalta-se que, enquanto está claro que a ZP intacta atua como barreira mecânica que protege as células embrionárias da maioria dos patógenos, ela também pode agir como veículo passivo do BoHV-1, já que o mesmo pode aderir-se a ZP e infectar o embrião após a eclosão.

### **O diagnóstico viral**

Os sinais clínicos relacionados à reprodução e associadas ao herpesvírus bovino -1 são diversos e semelhantes a outras doenças infecciosas de natureza reprodutiva, como por exemplo, a Diarreia Viral Bovina. Desta forma, é limitado o diagnóstico presuntivo, baseado nos sintomas provocados pelo vírus (Bielanski et al., 1993; Givens et al., 2006).

Durante as infecções agudas, as quais manifestam evidências clínicas de atividade viral, devem ser coletadas amostras de secreções como suabes nasais, oculares, vaginais, de prepúcio ou coletadas das áreas com lesões evidentes. Também podem ser coletados tecidos (traqueia, pulmões), fetos abortados ou tecidos dos mesmos (pulmões, fígado e rins) (Franco e Roehle, 2007).

Usualmente, os testes são baseados na detecção do agente viral (testes diretos) ou na detecção de anticorpos anti-BoHV-1 (testes indiretos). Considera-se “padrão ouro” de diagnóstico viral, o isolamento em cultivo celular. As células de linhagem contínua (células de derivadas de rins de bovinos – MDBK) são a mais utilizadas para o isolamento viral, em razão da sua praticidade. O BoHV-1 após o seu isolamento produz efeito citopático na cultura celular, podendo o seu crescimento e titulação serem monitorados por este tipo de atividade biológica. Entretanto, após o isolamento e observação do efeito citopático, é necessário a confirmação da identidade antigênica do BoHV-1 por meio de ensaios de imunofluorescência ou imunoperoxidase (Flores e Cargnelutti, 2012).

Também pode ser utilizada a reação da polimerase em cadeia (PCR), seguida de sequenciamento parcial



do genoma viral. A identificação do DNA do BoHV-1 por meio da PCR apresenta vantagens relacionadas a sensibilidade e especificidade, bem como na praticidade e rapidez de resultados. A PCR também possibilita amplificação de segmentos do genoma viral diretamente das amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico. Entretanto, vale ressaltar que, na fase de latência viral, a PCR não é capaz de detectar o vírus em amostras que não se originam dos sítios de latência.

Outra aplicação da PCR, no contexto da reprodução, é a detecção de baixa concentração viral em embriões e fluidos uterinos, o que nem sempre é possível de ser detectado pelo método de isolamento. Esta condição torna esta ferramenta indispensável para a avaliação da sanidade dos embriões produzidos por biotécnicas da reprodução (Givens et al., 2001).

Adicionalmente, deve ser destacado a técnica de PCR em tempo real, sendo considerada mais sensível e específica do que a PCR convencional, possibilitando a quantificação da carga viral em amostras analisadas.

Fora do período da doença clínica (infecção aguda), pode-se realizar exames sorológicos como forma indireta de identificação do BoHV-1. As técnicas sorológicas mais empregadas no diagnóstico sorológico são a ELISA e a soroneutralização. Ambas são altamente sensíveis e podem oferecer também resultados quantitativos. Uma grande vantagem inerente a técnica está relacionada ao diagnóstico indireto de atividade viral durante a fase de latência. O animal nunca vacinado contra o BoHV-1 e fora do período de 6 meses da imunidade passiva (Hubner et al., 1996) pode ser considerado portador crônico do vírus, se positivo em testes sorológicos.

Contudo, algumas limitações inerentes aos testes sorológicos empregados para BoHV-1 devem ser consideradas. Os testes sorológicos não diferenciam animal vacinado de naturalmente infectado, não devendo ser empregadas em rebanhos recentemente vacinados. Também é importante ressaltar que estes tipos de testes não diferenciam anticorpos anti-BoHV-1 e anti-BoHV-5 (Delhon et al., 2003).

Outra importante limitação que deve ser mencionada está relacionada às interpretações dos testes sorológicos, durante a fase aguda da doença em um rebanho. A detecção de anticorpos em uma amostra isolada de soro possui pouco significado de diagnóstico para o curso da doença clínica. A detecção de um único animal soropositivo em um teste isolado, indica somente que o animal teve contato prévio com o BoHV-1, seja por infecção natural ou por vacinação (Franco e Roehe, 2007). O status sorológico do rebanho (prevalência e título médio dos anticorpos) associado ao quadro clínico podem auxiliar o diagnóstico se empregados em uma amostragem considerável do rebanho. A simples definição de sorologia positiva para BoHV-1 não diagnostica quadro de doença clínica. Este tipo de interpretação vem ocorrendo erroneamente com frequência pelos profissionais de campo.

É importante mencionar o emprego das técnicas de histologia no diagnóstico viral. Assim, a histopatologia e a imunohistoquímica podem ser empregadas como ferramentas de suporte de diagnóstico nos casos de abortamento, doenças respiratórias e neurológicas associadas ao BoHV-1. A histopatologia pode definir a gravidade da lesão causada pelo vírus, bem como inferir sobre o grau de patogenicidade do isolado viral. A imunohistoquímica proporciona marcação de antígenos virais associadas as lesões, definindo com total segurança a etiologia do agente infeccioso causador da lesão.

Na literatura há descrição de diversas técnicas de diagnóstico para BoHV-1, sendo muitas ainda não aplicáveis em maior escala. Contudo, os testes de diagnóstico vêm sendo aprimorados, visando a simplificação dos procedimentos, assim como minimizar os diagnósticos inconclusivos dos agentes virais, incluindo o BoHV-1.

### **Considerações sobre os diferentes tipos de vacinas disponíveis**

Estudos relatam que este agente viral está amplamente disseminado na pecuária nacional (Durham e Hassard, 1990; Rocha et al., 2001; Cowley et al., 2011; Piosevan et al., 2013; Rebouças et al., 2014). Entretanto deve ser ressaltado que vários trabalhos utilizam rebanho vacinados, cuja resposta sorológica é indistinguível daquela induzida pela infecção natural (Flores et al., 2000; Pritchard et al., 2003).

De acordo com a OIE (2010), países como Suécia, Suíça, Finlândia e Áustria adotaram um programa de vacinação e reduziram a prevalência de BoHV-1. No Brasil, a vacinação é voluntária e há várias empresas que comercializam as vacinas contra o BoHV-1. Normalmente, são formuladas em associação com outros antígenos (BVD tipo I e II, PI3, BRSV e *Leptospira* spp). Em sua grande maioria, as vacinas são comercializadas na forma inativada. Recentemente, as vacinas nas formas atenuadas termossensíveis também têm sido comercializadas no Brasil.

Existem também vacinas geneticamente marcadas que oferecem a possibilidade de diferenciação sorológica de animais vacinados de naturalmente infectados (Xiao et al., 2004, Muylkens et al., 2007). Entretanto, este tipo de vacina ainda não está disponível para comercialização no Brasil.

As vacinas vivas geneticamente atenuadas e as inativadas são capazes de prevenir o desenvolvimento de sinais clínicos e reduzem a reexcreção viral devido à resposta imune primária, porém não previnem a infecção a campo. As vacinas inativadas apresentam vantagens frente às atenuadas uma vez que não possibilitam capacidade de replicação viral nas células dos hospedeiros não provocando, deste modo, abortamento, risco de reversão da virulência e de infecção latente pela cepa vacinal (Jones et al., 2011). Todavia, a duração da



imunidade conferida por estas vacinas é geralmente inferior às vacinas vivas modificadas. As vacinas vivas geneticamente atenuadas induzem uma rápida resposta e imunidade duradoura. Entretanto, este tipo de vacina possui potencial abortivo e não pode ser usado em vacas prenhas (Nandi et al., 2009). A vacina viva comercializada no Brasil é considerada biossegura para vacas prenhas, uma vez que o vírus vacinal, apesar de vivo, é um mutante termossensível.

No Brasil não existe nenhum tipo de regulamentação específica definindo o grau de imunidade exigido para as vacinas contra o BoHV-1. Por um longo período, pesquisadores da área ainda apresentavam dúvidas na eficácia das vacinas nos parâmetros reprodutivos. Entretanto, trabalhos recentes vem demonstrando uma relativa eficácia frente aos aspectos reprodutivos por meio de desafio experimental (Walz et al., 2017) ou experimentação a campo (Pereira et al., 2013). Vacas vacinadas contra o BoHV-1 vêm apresentando menores perdas gestacionais e maiores taxas de prenhez (Aono et al., 2013). Anziliero et al. (2015) testaram sete vacinas comercializadas no Brasil contra o BoHV-1, cinco inativadas com adjuvantes diferentes, uma viva atenuada termossensível e uma vacina viva quimicamente alterada. Todas induziram anticorpos com atividade neutralizante contra o BoHV-1, sendo considerado que a vacina viva atenuada termossensível apresentou maior indução de títulos de anticorpos neutralizantes. Adicionalmente, Newcomer et al. (2017) por meio de um estudo de metanálise, demonstraram que tanto a vacina inativadas quanto a viva modificada diminuem o risco de abortamento.#

Embora as vacinas nos últimos anos têm evoluído quanto à sua eficácia, a vacinação ainda não impede a circulação do BoHV-1 entre os rebanhos vacinados e o desenvolvimento da infecção latente. Destarte, novos estudos ainda devem continuar no aprimoramento dos métodos vacinais, tecnologias de produção, adjuvantes, doses e protocolos de vacinação.

#### **A relação do vírus com estruturas e órgãos genitais femininos (avanços e estudos em andamento)**

Trata-se de uma doença de elevada prevalência nos rebanhos brasileiros, razão pela qual o nosso grupo de trabalho vem atuando nesta linha de pesquisa nos últimos anos. Conforme já relatado, este grupo de trabalho multidisciplinar é constituído basicamente por especialistas em Virologia, Biologia Molecular e Reprodução Animal, incluindo no contexto, orientados destes pesquisadores. Os estudos do Grupo estão relacionados com a interação do vírus com órgãos genitais, incluindo o folículo e o ovócito, face às escassas informações desta interação.

Assim, este Grupo já concluiu um Projeto de Pesquisa intitulado “Herpesvírus Bovino (BoHV-1) e sua relação com o folículo ovariano e a viabilidade de ovócitos bovinos”, cujos resultados elucidaram aspectos importantes a respeito.

Deste modo, trabalhando com vacas abatidas em frigorífico oriundas de rebanhos não vacinados, o Grupo verificou que 83,6% dos animais eram soropositivos, corroborando com as pesquisas, as quais demonstram que a infecção apresenta-se amplamente disseminada em rebanhos bovinos. Adicionalmente, utilizando a técnica de PCR, foi encontrado o DNA viral também no tecido ovariano e em ovócitos de animais soropositivos, além da presença no sangue (Pereira et al., 2015). A detecção do DNA viral em ovários e ovócitos de animais soropositivos sugere uma atenção especial quanto a distribuição do vírus no organismo animal. Teria o vírus alguma afinidade por estas estruturas? Seria prematura esta afirmação, tendo em vista que os estudos ainda são iniciais. Contudo, estes achados sugerem a necessidade de aprofundar os estudos a respeito.

No intuito de avaliar o efeito do vírus na maturação ovocitária, o Grupo realizou um estudo com vacas não vacinadas contra o BoHV-1, as quais foram submetidas à coleta de ovócitos por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU). Os animais soronegativos não apresentaram DNA do BoHV-1 tanto no sangue quanto no *pool* de ovócitos. Entretanto, em fêmeas soropositivas (infectadas naturalmente), observou-se reação positiva por meio da *Nested-PCR* no *pool* de Complexos *Cumulus Oophorus* (COCs). Este achado contraria a hipótese de que animais sorologicamente positivos, sem sintomatologia clínica seriam improváveis de terem seus órgãos genitais acometidos pela infecção do BoHV-1. Deste modo, estes animais são potenciais transmissores deste vírus por meio de COCs (Mendes et al., 2014).

Ademais, o Grupo avaliou a taxa de maturação nuclear de vacas soropositivas, ocorrendo influência ( $P < 0,05$ ) do estado sorológico do animal (título de anticorpos) na taxa de maturação nuclear em ovócitos bovinos. Os animais que apresentaram titulação média (16 a 32) e alta (64 a 512) apresentaram comprometimento na taxa de maturação nuclear ovocitária (48,4 e 50,9%, respectivamente) quando comparados aos animais controle, com taxa de maturação de 76,7%. Estes dados inferem a respeito do efeito deletério do vírus no desenvolvimento do ovócito, comprometendo a sua viabilidade.

Dando continuidade aos estudos ora citados, encontra-se em andamento outro projeto de pesquisa do Grupo, intitulado “Capacidade de contaminação celular pelo Herpesvírus Bovino 1 em estruturas ovarianas e detecção do agente em ovários, tubas uterinas e útero de animais soropositivos”. Os resultados parciais já obtidos incrementam informações valiosas no entendimento da relação do vírus com órgãos genitais.

Na primeira fase de execução deste projeto, utilizando animais não vacinados, verificou-se que 58% apresentaram-se soropositivos. Um resultado parcial e importante no contexto da reprodução foi a detecção do



BoHV-1 em ovários, útero e tubas uterinas de animais soropositivos por meio da técnica de Microscopia Confocal de Varredura a Laser. Adicionalmente, verificou-se a presença de partículas virais em tecido ovariano, uterino e tubárico, sendo em substancial quantidade no tecido ovariano. Tendo em vista que os resultados ainda são parciais, seria prematura qualquer afirmação. Contudo, caso estas observações se consolidem, poderia sugerir uma afinidade do vírus com estes órgãos genitais, com destaque para o tecido ovariano.

O Grupo também está iniciando estudos a respeito da capacidade de penetração celular do vírus no ovócito com as células do *cumulus* ao redor da zona pelúcida, em células isoladas do *cumulus* e em ovócitos desnudados de vacas soronegativas. As estruturas serão incubadas *in vitro* com o BoHV-1 e posteriormente analisadas por meio da técnica Microscopia Confocal de Varredura a Laser.

Dando continuidade aos estudos, o Grupo de trabalho está também iniciando a execução de um projeto intitulado “Detecção do Herpesvírus Bovino 1 em muco vaginal de fêmeas bovinas e sua relação com a latência no gânglio sacral”, no intuito de dar continuidade aos estudos da relação do vírus com os órgãos genitais da vaca. Espera-se verificar possível relação da latência do BoHV-1 no gânglio sacral com a infecção genital de fêmeas bovinas, considerando a proximidade de ambas estruturas.

Os resultados obtidos até o presente momento, associados aos obtidos com a continuidade destes estudos poderão fornecer subsídios e informações quanto à patogenia do vírus, especificamente relacionado aos órgãos genitais femininos. Possivelmente também sugerir um tropismo do vírus por estruturas e órgãos genitais femininos, dependendo dos resultados obtidos pelos estudos em andamento.

### Conclusões

A Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) apresenta expressiva prevalência no mundo. Dentre os prejuízos causados pela doença, destaca-se o comprometimento substancial na eficiência reprodutiva de rebanhos. Diante disto, ressaltamos a relevância dos estudos que visem um maior entendimento da relação do vírus com estruturas e órgãos genitais femininos.

### Agradecimentos

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo apoio financeiro dos projetos executados e em andamento.

### Referências

- Ackermann M, Engels M.** Pro and contra – IBR eradication. *Vet Microbiol*, v.113, p.293-312, 2005.
- Alice FJ.** Isolamento do vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) no Brasil. *Rev Bras Biol*, v.38, p.919-920, 1978.
- Aono FH, Cooke RF, Alfieri AA, Vasconcelos JLM.** Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. *Theriogenology*, v.79, p.242-248, 2013.
- Anziliero D, Martins M, Weiss M, Monteiro FL, Ataíde CF, Weiblen R Flores EF.** Resposta sorológica aos herpesvírus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. *Cienc Rural*, v.45, p.58-63, 2015.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** Índice ASBIA mercado. Disponível em: [www.asbia.org.br](http://www.asbia.org.br). Acessado em: 06 de fevereiro de 2017.
- Barbosa ACVC, Brito WMED, Alfaia BT.** Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Cienc Rural*, v.35, p.1368-1373, 2005.
- Bielanski A, Loewen KS, Del Campo MR, Sirard MA, Willadsen S.** Isolation of bovine herpesvirus-1 (bbv-1) and bovine viral diarrhoea virus (bvdv) in association with the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.40, p.531-538, 1993.
- Bielanski A.** The potential for animal and human germplasm contamination through assisted reproductive biotechnologies. *Trends Reprod Biol*, v.2, p.13-36, 2006.
- Bielanski A, Lalonde A.** Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus-1. *Theriogenology*, v.72, p.919-925, 2009.
- Bowen RA.** Viral infections of mammalian preimplantation embryos. *Theriogenology*, v.11, p.5-15, 1979.
- Cowley DJB, Clegg TA, Doherty ML, More SJ.** Aspects of bovine herpesvirus-1 infection in dairy and beef herds in the Republic of Ireland. *Acta Vet Scand*, v.53, p.40, 2011.
- D’Angelo M.** Interação do Herpesvírus Bovino tipo-1 (BHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro*. 1998. 52f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- Delhon G, Moraes MP, Lu Z, Afonso CL, Flores EF, Weiblen R, Kutish GF, Rock DL.** Genome of bovine herpesvirus 5. *J Virol*, v.77, p.10339-10347, 2003.
- Dias JA, Alfieri AA, Ferreira-Neto JS, Gonçalves VSP, Muller EE.** Seroprevalence and Risk Factors of



- Bovine Herpesvirus 1 Infection in Cattle Herds in the State of Paraná, Brazil. *Transbound Emerg Dis*, v.60, p.39-47, 2013.
- Durham PJK, Hassard LE.** Prevalence of antibody to infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza 3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral diarrhea viruses in cattle in Saskatchewan and Alberta. *Can Vet J*, v.31, p.815-820, 1990.
- Engels M, Ackermann M.** Pathogenesis of ruminants pestivirus infections. *Vet Microbiol*, v.53, p.3-15, 1996.
- Fenner, F.** *Veterinary Virology*. 1st ed. Londres: Academic Press, 1987.
- Fino TCM, Melo CB, Ramos AF, Leite RC.** Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.36, n.2, p.122-127, 2012.
- Flores EF, Gil LH, Botton SA, Weiblen R, Ridpath JF, Kreutz LC, Pilati C, Driemeyer D, Moojen V, Wendelstein AC.** Clinical, pathological and antigenic aspects of bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2 isolates identified in Brazil. *Vet Microbiol*, v.77, p.175-183, 2000.
- Flores EF; Cargnelutti, JF.** Diagnóstico laboratorial das infecções víricas, In: Flores E.F. (2Ed.), Santa Maria Editora (Ed), *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, capítulo 11, 2012.
- Franco AC, Roche PM, Herpesviridae.** Herpesviridae, In: Flores E.F. (Ed.), Santa Maria Editora (Ed), *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, p.433-488, 2007.
- Galuppo AG.** Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões/patógenos. 74f. 2005. Dissertação (Mestrado em epidemiologia experimental aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Givens MD, Galik PK, Ridell KP, Stringfellow DA.** Validation of a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) to detect bovine virus diarrhea virus (BVDV) associated whit in vitro-derived bovine embryos and co-cultured cells. *Theriogenology*, v.56, p.787-799, 2001.
- Givens, MD.** A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, v.66, p. 648-654, 2006.
- Graham DA.** Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle – a review with emphasis on reproductive impacts and the emergence of infection in Ireland and the United Kingdom. *Ir Vet J*, v.66, p.1-15, 2013.
- Hubner SO, Weiblen R, Silva AM, Moraes MP.** Evolução da imunidade passiva contra o herpesvírus bovino tipo 1. *Cienc Rural*, v.26, p. 435-439, 1996.
- Jones C, Da Silva LF, Sinani D.** Regulation of the latency-reactivation cycle by products encoded by the bovine herpesvirus 1 (BHV-1) latency-related gene. *J Neurovirol*, v.17, p.535-45, 2011.
- Lovato LT, Weiblen R, Tobias LF, Moraes MP.** Herpesvírus bovino tipo 1 (HVB 1): Inquérito sorológico epidemiológico no rebanho leiteiro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural*, v.25, p.425-430, 1995.
- Kupferschmid HU, Kihm U, Bachmann P, Muller KH, Ackermann M.** Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*, v.25, p. 439-443, 1986.
- Mars MH, Jong MCM, Van Maanen C, Hage JJ, Van Oirschot JT.** Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Vet Microbiol*, v.76, p.1-13, 2000.
- Médici KC, Alfieri AF, Alfieri AA.** Prevalência de anticorpos neutralizantes contra o herpesvírus bovino tipo 1, decorrente de infecção natural, em rebanhos com distúrbios reprodutivos. *Cienc Rural*, v.30, n.2, p.347-350, 2000.
- Mendes VRA, Pereira ECM, Costa EP, Silva Júnior A, Rodrigues ACF, Silva TF, Costa SL, Freitas PPT, Pereira JVTN, Ferreira HCC, Santos MR.** Presence of the viral DNA in *oophorus cumulus* complexes of cows clinically healthy and naturally infected by bovine herpesvirus 1 (bohv1). *Ciência Animal*, v.24, p.55-60, 2014
- Miller JM, Van der Maaten MJ.** Experimentally induced infectious bovine rhinotracheitis virus infection during early pregnancy: effect on the bovine corpus luteum and conceptus. *Am J Vet Res*, v.47, p.223-228, 1986.
- Mueller SBK, Ikuno AA, Machado JS, Lima RMA, Richtzenhain LJ, Taki EM.** Prevalência de anticorpos contra o vírus da Rinotraqueite Infecçiosa Bovina / Vulvovaginite Pustular Infecçiosa (IBR/IPV) em bovinos do Estado de São Paulo. *Instituto Biológico de São Paulo*. v.47, p.55-59, 1981.
- Muykens B Thiry J Kirten P Schynts F Thiry E.** Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Research*, v.38, p.181-209, 2007.
- Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS.** Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Heal Res Rev*, v.10, p.85-98, 2009.
- Nandi S, Kumar M, Yadav V, Chander V.** Serological Evidences of Bovine Herpesvirus-1 Infection in Bovines of Organized Farms in India. *Transbound Emerg Dis*, v.58, p.105-109, 2011.
- Newcomer BW, Cofield LG, Walz PH, Givens MD.** Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Prev Vet Med*, v.138, p.1-8, 2017.
- Oliveira MT, Campos FS, Dias MM, Velho FA, Freneau GE, Brito WM, Rijsewijk FA, Franco AC, Roche PM.** Detection of bovine herpesvirus 1 and 5 in semen from Brazilian bulls. *Theriogenology*, v.75, p.1139-1145, 2011.
- Pereira MHC, Cooke RF, Alfieri AA, Vasconcelos JLM.** Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI. *Anim Reprod Sci*, v.137, p.156-162, 2013.





- Pereira ECM, Costa EP, Silva Júnior A, Mendes VRA, Santos GM, Costa SL, Santos MR.** Natural infection in ovarian structures by bovine herpesvirus 1: molecular and serological detection. *Semina Ciências Agrárias*, v.36, p.863, 2015.
- Piovesan M, Fernandes MHV, Corrêa RA, Prado MHJ, Camargo AD, Rodrigues PRC.** Anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1, vírus da diarreia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. *Science and Animal Health*, v.1, p.38-49, 2013.
- Pituco EM.** Ocorrência da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos/Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IBR/IPV) em rebanhos criados no estado de São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais. Utilização das reações sorológicas de microssoroneutralização, microhemoaglutinação passiva e da imunofluorescência indireta para detecção de anticorpos anti-herpesvírus bovino-1. 74f. 1988. Dissertação (Mestrado em Patologia bovina) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, 1988.
- Pollard J, Leibo S.** Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.287, 1993.
- Ponsart C, Pozzi N.** Sanitary requirements for gametes and embryos. *Anim Reprod*, v.10, p.283-296, 2013.
- Pritchard GC, Banks M, Vernon RE.** Subclinical breakdown with infectious bovine rhinotracheitis virus infection in dairy herd of high health status. *Vet Rec*, v.153, p.113-117, 2003.
- Raaperi K, Nurmoja I, Orro T, Viltrop A.** Seroepidemiology of bovine herpesvirus 1 (BHV1) infection among Estonian dairy herds and risk factors for the spread within herds. *Prev Vet Med*, v.96, p.74-81, 2010.
- Ravazzolo AP, Pizzol MD, Moojen V.** Evidência da presença de anticorpos para o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa dos Bovinos, em alguns municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.17, p.89-95, 1989.
- Ravishankar C, Nandi S, Chander V, Mohapatra TK.** Concurrent testing of breeding bulls for bovine herpesvirus 1 infection (BHV-1) in India. *Vet Ital*, v.49, p.145-150, 2013.
- Rocha MA, Gouveia AMG, Leite RC.** Pesquisa de anticorpos anti IBR em soro de touros de uma central de inseminação. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda. *Anais...* Recife, PE: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 656f, p.213, 1994.
- Rocha MA, Gouveia AMG, Leite RC.** Herpesvírus bovino tipo 1 no sêmen. *Cienc Rural*, v.29, p.373-380, 1999.
- Rocha MA, Gouveia AMG, Lobato ZIP, Leite RC.** Pesquisa de anticorpos para IBR em amostragem de demanda no Estado de Minas Gerais, 1990-1999. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.53, p.645-647, 2001.
- MR Santos, HCC Ferreira, OV Carvalho, LHS Bulos, VA Nascimento, JAPS Martins, EP Costa, MR Almeida, A Silva Júnior.** Surveillance of neutralizing antibodies against bovine herpesvirus 1 in cattle herds from different farming property systems. *Bioscience Journal*, v.30, p.803-809, 2014.
- MR Santos, HCC Ferreira, MA Santos, GL Saraiva, NF Tafuri, GM Santos, FL Tobias, MAS Moreira, MR Almeida, A Silva Júnior.** Antibodies against *Bovine herpesvirus 1* in dairy herds in the state of Espírito Santo, Brasil. *Rev Ceres*, v.61, p.280-283, 2014.
- Shirvani E, Lotfi M, Kamalzadeh M, Noaman V, Bahriari M, Morovati H, Hatami A.** Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). *Trop Anim Health Prod*, v.44, p.191-195, 2012.
- Stringfellow DA, Givens MD.** Preventing disease transmission through the transfer of in-vivo derived bovine embryos. *Livest Prod Sci*, v.62, p.237-251, 2000a.
- Stringfellow DA, Givens MD.** Epidemiologic concerns relative to *in vivo* and *in vitro* production of livestock embryos. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.629-642, 2000b.
- Takiuchi E, Alfieri AF, Alfieri AA.** Herpesvírus bovino tipo 1: tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. *Semina: Ciências Agrárias*, v.22, p.203-209, 2001.
- World Organization for Animal Health (OIE).** Terrestrial Manual. Infectious bovine Rhinotracheitis. Chapter 2.4.13, 2010.
- Thibier M.** Embryo transfer: a comparative biosecurity advantage in international movements of germplasm. *Rev Sci Tech*, v.30, p.177-188, 2011.
- Thibier M, Wrathall T.** International Trade of Livestock Germplasm. New York: Taylor & Francis. (Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food) 4p, 2012.
- Vanroose G, Nauwynck H, Soom AV, Ysebaert MT, Charlier G, Oostveldt PV, de Kruif A.** Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol Reprod*, v.62, p.463-469, 2000.
- Vidor T, Halfen DC, Leite TE.** Herpesvírus Bovino tipo 1(HVB-1). Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Cienc Rural*, v.25, p.421-424, 1995.
- Xiao DH, Li LH, Jiang HX, Wang LY.** Research in Prevention and Cure of Infectious Bovine Rhinotracheitis. *China Dairy Cattle*, v.4, p.43-45, 2004.
- Walz PH, Givens MD, Rodning SP, Riddell KP, Brodersen BW, Scruggs D, Short T, Grotelueschen D.** Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary



vaccination with modified-live viral vaccine. *Vaccine*, p.1046-1054, 2017.

**Workman A, Eudy J, Smith L, Silva LF, Sinani D, Bricker H, Cook E, Doster A, Jones C.** Cellular Transcription factors induced in trigeminal ganglia during dexamethasone-induced reactivation from latency stimulate bovine herpesvirus 1 productive infection and certain viral promoters. *J Virol*, v.86, p.2459-2473, 2012.

**Wrathall AE.** Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, p.81-88, 1995.

**Wrathall AE, Suttmoller P.** Potential of embryo transfer to control transmission of disease. Savoy, In: Manual of the International Embryo Transfer Society (3rd edition). Stringfellow DA, Seidel SM (eds). IETS, Savoy, IL, p.17-44, 1998.

**Wright RW, Ellington J.** Morphological and physiological differences between *in vivo* and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, v.44, p.1167-1189, 1995.

**Wyler R, Engels M, Schwyzr M.** Infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis (BHV-1). In: Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. Wittman G. (ed.) Kluwer Academic Publishers: Hingham, MA, 1-72, 1989.

---