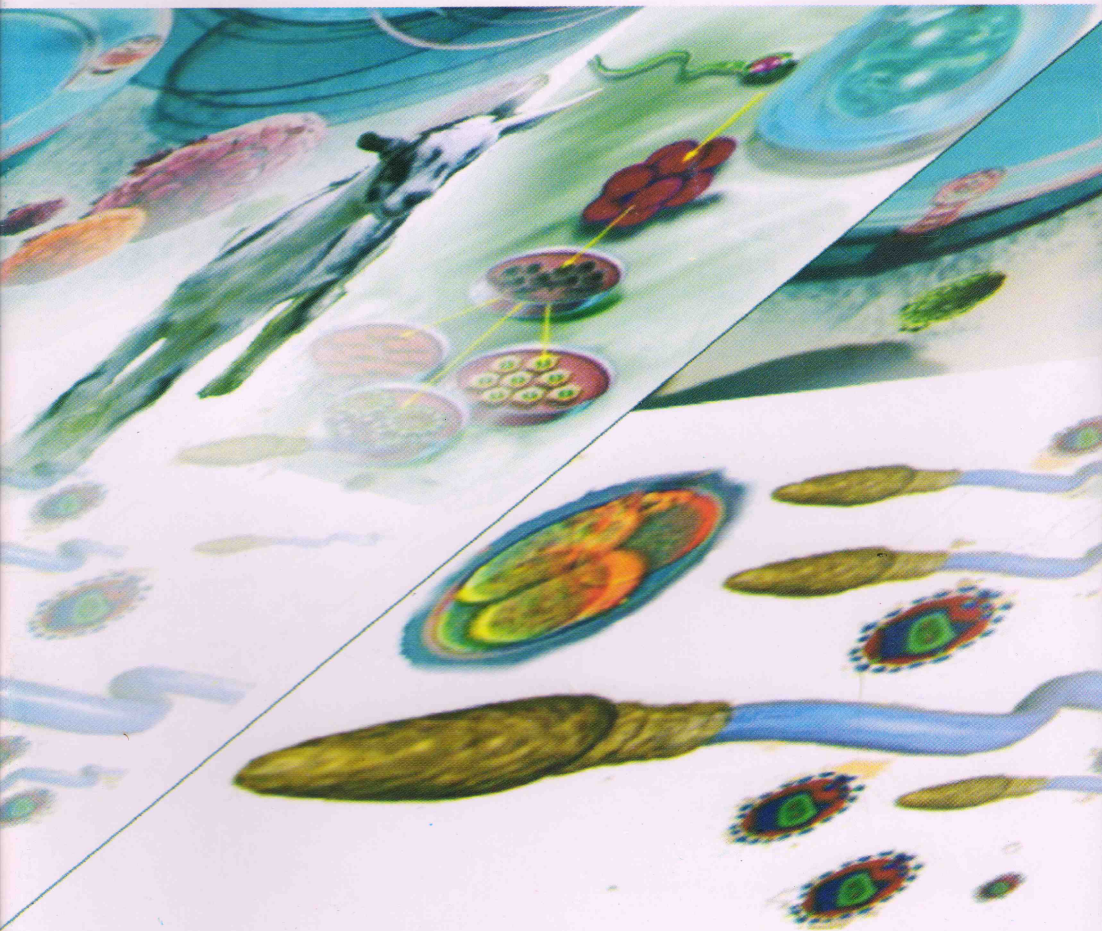


Transmissão de Doenças Infecciosas Através das Biotecnologias Reprodutivas em Pequenos Ruminantes



República Federativa do Brasil

Luís Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimázio
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Luís Fernando Rigato Vasconcelos
Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Caprinos

Aurino Alves Simplicio
Chefe-Geral

Maria Eliene da Silva Dourado
Chefe-Adjunto de Administração

Luiz da Silva Vieira
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Expedito Aguiar Lopes
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios para Transferência de Tecnologias

Documentos 51

Transmissão de Doenças Infecciosas Através das Biotecnologias Reprodutivas em Pequenos Ruminantes

Alice Andrioli
Raymundo Rizaldo Pinheiro
Francisco Selmo Fernandes Alves
Aurora Maria Guimarães Gouveia

Sobral, CE
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10

CEP 62011-970 - Sobral/CE

Fone:(0xx88) 3677-7000

Fax:(0xx88) 3677-7055

Home page: <http://www.cnpc.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpc.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Ângela Maria Xavier Eloy

Secretário-Executivo: Alice A. Pinheiro

Membros: Eneas Reis Leite

Alcido E. Wander

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisor gramatical: José Ubiraci Alves

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Alexandre César Silva Marinho

1ª edição

1ª impressão (2003): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Transmissão de doenças infecciosas através das biotecnologias reprodutivas em pequenos ruminantes / Alice Andrioli... [et al.]. - Sobral : Embrapa Caprinos, 2003.

27 p. (Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1676-7659; 51).

1. Reprodução Animal. 2 . Doença Animal. 3. Transmissão de Doença. 4. Biotecnologia Animal. I. Andrioli, Alice. II. Série.

CDD636.089

Autores

Alice Andrioli

Méd. Vet., D. Sc. em Ciência Animal
Pesquisadora Embrapa Caprinos
Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10
CEP 62011-970 - Sobral/CE
E-mail: alice@cnpic.embrapa.br

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Méd. Vet., D. Sc. em Ciência Animal
Pesquisador Embrapa Caprinos
Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10
CEP 62011-970 - Sobral/CE
E-mail: rizaldo@cnpic.embrapa.br

Francisco Selmo Fernandes Alves

Méd. Vet., Ph. D. em Bacteriologia e Imunologia
Pesquisador Embrapa Caprinos
Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal D 10
CEP 62011-970 - Sobral/CE
E-mail: selmo@cnpic.embrapa.br

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Méd. Vet., D. Sc. em Epidemiologia/Virologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária/Dep. de Med. Vet. Prev.
E-mail: aurora@net.ufmg.br

Apresentação

Nos últimos anos, vem ocorrendo no Brasil uma mudança qualitativa no fazer a caprino-ovinocultura.

O desenvolvimento de novas biotecnologias vem sendo uma das prioridades mundiais e se constitui uma das metas dos países desenvolvidos. Neste cenário o Brasil além de utilizar esses conhecimentos, vem se firmando como país capaz de desenvolver técnicas avançadas no que concerne a biotecnologia animal.

No que diz respeito a reprodução animal novas biotecnologias tem surgido visando alavancar a produtividade dos rebanhos.

São várias as enfermidades que podem interferir de forma direta ou indiretamente no aspecto reprodutivo dos pequenos ruminantes. Agentes virais, bacterianos, protozoários já foram isolados e identificados em caprinos e ovinos, no entanto, nem sempre a real interferência no processo reprodutivo e sanitário foi completamente estabelecida. Esses agentes podem ser transmitidos pelas mais diferentes formas: contato direto, indireto, técnicas de manejo, presenças de insetos, monta natural, inseminação artificial e transferência de embriões.

Este artigo de revisão reúne os textos sobre transmissão de doenças infecciosas através das biotecnologias reprodutivas, atendendo não somente aos técnicos de campo, mas também a classe produtora, ávida por conhecer e implementar as técnicas reprodutivas nos seus rebanhos.

Antônio César Rocha Cavalcante
Pesquisador Embrapa Caprinos

Sumário

Comércio de Sêmen e Embriões	09
Transmissão de Patógenos Através do	
Sêmen e do Embrião	13
Formas de contaminação do sêmen	14
Formas de contaminação do embrião	16
Uso de Biotecnologias como Forma	
de Controle de Enfermidades	20
Considerações Finais	21
Referências Bibliográficas	22

Transmissão de Doenças Infecciosas Através das Biotecnologias Reprodutivas em Pequenos Ruminantes

Alice Andrioli

Raymundo Rízaldo Pinheiro

Francisco Selmo Fernandes Alves

Aurora Maria Guimarães Gouveia

Comércio de Sêmen e Embrião

O expressivo crescimento da caprino-ovinocultura nacional tem demandado o aumento e difusão, dos conhecimentos científico-técnicos nas áreas de nutrição, sanidade, melhoramento genético e reprodução, bem como de processos gerenciais da cadeia produtiva de leite, carne e pele, de forma à contribuir para o crescimento social e econômico do Brasil, através do aumento do lucro dos produtores, da maior oportunidade de empregos e renda no meio rural e a possibilidade do acesso constante do consumidor de produtos caprinos e ovinos de alta qualidade, à preços compatíveis no mercado.

A busca pelo crescimento rápido, em número e em genética, dos rebanhos caprino e ovinos nacionais, tem levado muitos pecuaristas ao uso de técnicas reprodutivas e de importações de sêmen e embriões ou animais de raças exóticas tidas com grande potencial para leite ou carne.

No âmbito da reprodução animal tem ocorrido, nas últimas décadas, grande número de pesquisas, aprimorando e desenvolvendo novas biotecnologias que visam o aproveitamento máximo e rápido do potencial genético de reprodutores e matrizes de alto valor zootécnico. Por esta razão, é visível o interesse dos produtores em conhecer e implementar as técnicas reprodutivas nos seus rebanhos. No entanto, temos observado que a maioria dos sistemas produtivos

nacionais ainda esbarram em problemas básicos nas áreas de sanidade, nutrição e, até mesmo, do controle zootécnico, onerando e inviabilizando a implantação de técnicas reprodutivas, quando não de agronegócio como um todo.

Pesquisas sobre tecnologias reprodutivas demonstram a crescente vantagem do uso destas técnicas para o aumento na produção (Thibier & Guérin, 2000a). A criopreservação de sêmen e a inseminação artificial (IA), são as tecnologias mais utilizadas mundialmente e estão disponíveis para uso dos caprinocultores, constituindo um grande potencial de aproveitamento genético de reprodutores nacionais ou de sêmen oriundos de outros países. Porém, no caso da presença de patógenos no sêmen, o risco potencial de disseminação de enfermidades é relevante, pois, na IA várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado podendo causar grande prejuízo econômico, principalmente quanto à possibilidade de introdução de novas cepas de microrganismos mais virulentas. Em adição, a criopreservação pode facilitar a sobrevivência de certos patógenos, em longo prazo, especialmente vírus, além do que tem sido observado que os crioprotetores diminuem a eficiência dos antibióticos.

A transferência de embriões (TE) e a criopreservação, são tecnologias reprodutivas que apresentam resultados positivos e são muito procuradas pelos produtores, sejam quando possuem matrizes de alto valor genético, ou na importação e inovulação de embriões de animais de raças exóticas, visando aumentar a sua produtividade.

O comércio de embriões tem sido considerado mais seguro, com relação a possibilidade de disseminação de enfermidades, quando comparada com o intercâmbio de sêmen ou de animais. No entanto, questionamentos sobre o potencial para transmissão de patógenos através da TE iniciaram-se quando se tornou evidente que a comercialização de embriões poderia expandir-se mundialmente. Desta forma, as implicações epidemiológicas desta tecnologia foram definidas, e medidas de prevenção, baseadas em estudos científicos, começaram a ser implantadas pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Stringfellow, 1999).

Atualmente, o comércio de sêmen e embrião é mais procurado em relação ao de animais, em virtude do desenvolvimento das técnicas de criopreservação destes materiais, que garante a viabilidade destes produtos, alicerçada pelas evidentes vantagens de ordem prática, econômica e sanitária do comércio de germoplasma.

Porém, as pesquisas sobre o risco de disseminação de enfermidades via sêmen, embrião e ovócitos não foram totalmente elucidadas para as diferentes enfermidades que afetam estes animais. Além disso, as legislações nacionais não têm acompanhado esses avanços para exercer controle eficaz sobre o comércio destes materiais, de forma que evitem a entrada e disseminação de enfermidades em nossos rebanhos.

No Brasil, importações de caprinos de alta linhagem procedentes de vários países têm ocorrido no decorrer dos anos, sendo que em 1976 verificou-se um significativo aumento nas importações de animais (Tabela 1), principalmente procedentes de países detentores de rebanhos com alto potencial leiteiro, o que possibilitou a introdução de novas doenças infecciosas no Brasil, como foi o caso, comprovado da Artrite Encefalite Caprina – CAE, noticiada por Moojen et al. (1986), num rebanho que possuía caprinos importados. Outros relatos semelhantes comprovaram que a introdução e disseminação do vírus da Artrite Encefalite Caprina - CAEV, no rebanho nacional ocorreram pelas importações de caprinos de raças leiteiras, procedentes de distintos países, sem adequada supervisão, acarretando graves problemas sanitários (Assis & Gouveia, 1994).

É crescente a preocupação mundial com relação à disseminação de enfermidades, o que tem acirrado as barreiras sanitárias entre países em relação as barreiras tarifárias. Desta forma, a adoção de medidas de controle de enfermidades e uma maior atuação das barreiras sanitárias são de vital importância para a economia de um país (Thibier, 2001).

A meta é a manutenção de rebanhos, comprovadamente, sadios e, portanto, mais produtivos e férteis e, conseqüentemente, com maior potencial de comercialização nacional e internacional, tanto de animais, de seu material genético como também de seus produtos, sendo isto vital para a sustentabilidade econômica do agronegócio da caprinocultura e ovinocultura nacional.

Dentro deste quadro, observa-se que as legislações bem como as pesquisas sobre o diagnóstico e possibilidade de veiculação/transmissão de patógenos por germoplasma (sêmen e embrião) encontram-se aquém dos avanços obtidos na área da biotecnologia reprodutiva (Wrathall, 1995). Desta forma, ressalta-se a eficácia no estabelecimento de programas de controle e erradicação das enfermidades que resultem em grandes prejuízos econômicos à caprinocultura e

ovinocultura, os quais requerem pesquisas sobre a patogenia, epidemiologia, diagnóstico e principalmente, quanto às vias de transmissão de enfermidades que podem atingir o sistema reprodutor de machos e fêmeas.

Tabela 1. Importação de caprinos e sêmen, de acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, nos anos de 1980 a 1994.

Ano	País de origem	Nº cabeças	Sêmen (doses)
1980	Reino Unido	27	-
	Suíça	57	-
	Alemanha	49	-
1981	Reino Unido	91	-
	Suíça	7	-
1982	Reino Unido	78	-
1983	Alemanha	51	-
1984	França	100	-
	França	105	-
	Reino Unido	3	-
	Alemanha	28	-
	Canadá	4	-
1985	França	414	-
	Holanda	39	-
	Suíça	81	-
1986	França	426	-
	Suíça	37	-
	Canadá	196	-
	França	81	-
1987	Países Baixos	45	-
	Suíça	23	-
	Reino unido	14	-
1988	França	195	-
	Suíça	23	-
1989	Reino Unido	16	-
	Alemanha	19	-
1991	Reino Unido	3	-
	Suíça	2	-
1992	França	-	90
1993	França	-	918
1994	Alemanha	19	-
	Espanha	60	-

Fonte: Boletim de Defesa Sanitária (1980 - 1994), citado por Pinheiro (2001).

Transmissão de Patógenos Através do Sêmen e do Embrião

A transmissão de patógenos pelo sêmen, pelo embrião e pelos fluidos uterinos pode não ser a principal via de infecção para muitas enfermidades como é o caso da CAE, cuja principal via é o colostro e o leite de fêmeas infectadas e fômites, porém pode ser, também, a porta de entrada do vírus num rebanho e, ainda, ser responsável pela sua manutenção em rebanhos submetidos aos programas de controle destas viroses, dificultando a erradicação da enfermidade.

Na Embrapa Caprinos foi implementado um programa de controle da CAE (Gouveia, 1996), atuando sobre as principais vias de infecção, surtindo excelentes resultados, com redução das taxas de soroconversão de 14,3% para 1,4%, em dois anos, porém, há cinco anos, manteve-se a estabilização da ocorrência de soro-positividade a patamares ao redor de 1%, indicando a possível influência de outras vias de transmissão como a materno fetal e pelo sêmen (Andrioli, 2001). Como esta enfermidade pode ter um período de latência longo, ela possibilita a permanência de animais com o vírus, porém sem sintomas, assim como, também, de falsos negativos aos métodos de diagnóstico usuais. Estes animais, portadores do vírus, podem permanecer disseminando a doença no rebanho pelas vias reprodutivas, uma vez que as principais vias de transmissão continuam sendo controladas, o que impossibilita a erradicação da enfermidade no rebanho.

A natureza de uma doença, especialmente sua epidemiologia, e o potencial de disseminação desta sobre populações de animais e humanas (zoonoses) são fatores de elevada importância e preocupação das autoridades veterinárias nacionais, quando forem mensurar as ameaças a países importadores, regiões ou rebanhos (Garner & Lack, 1995). Ou seja, deve-se levar em consideração a morbidade e a mortalidade da doença, e se a doença é endêmica ou não para a região que irá receber o sêmen ou embriões. Não obstante, a introdução de novas cepas merece atenção especial, pois podem ser mais virulentas que as nativas, além do que muitos agentes possuem o potencial de se multiplicar e apresentar mutações rapidamente, e subseqüentemente, se adaptar a novos ambientes, como é o caso dos vírus RNA e de certas bactérias.

Formas de contaminação do sêmen

Os reprodutores podem representar importantes fontes de infecção, como foi demonstrado por Pinheiro et al. (1999) que realizaram testes sorológicos em rebanhos onde foram implantados programas de melhoramento em raças nativas do Brasil e/ou SRD, e verificaram que a infecção foi significativamente maior nos machos, puros ou mestiços, indicando que estes reprodutores podem ser a porta de entrada da CAE e de outras enfermidades no rebanho.

Na inseminação artificial (IA), o potencial de disseminação de enfermidades ou defeitos genéticos é relevante, pois o número de fêmeas que podem receber sêmen contaminado é expressivamente maior, caso não sejam rigorosamente seguidas as normas técnicas e sanitárias para o processamento do sêmen.

O sêmen pode infectar-se por microrganismos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, da uretra ou do prepúcio, ou os patógenos podem ganhar acesso ao sistema reprodutor, pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para o sistema reprodutor, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos. Além disso, o sêmen pode contaminar-se no meio externo, por agentes presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais utilizados na coleta e manipulação do sêmen, caso não sejam adequadamente esterilizados, e no caso da congelação do sêmen em *pellets* pode ocorrer no nitrogênio líquido a partir de outras amostras de *pellets* contaminados (Hare, 1985; Thibier & Guérin, 2000b).

As lesões ou inflamações/infecções no órgão reprodutor podem desencadear maior fluxo de células sanguíneas para o sêmen, juntamente com os patógenos (Concha-Bermejillo et al., 1996; Pinheiro, 2001). Além disso, outros fatores parecem influenciar a transmissão de microorganismos pelo sêmen, tais como o estágio da doença, o estado imunológico ou nutricional e a associação com outras enfermidades.

No caso do vírus da CAE e do Maedi Visna, foi observado que a sua presença no sêmen parece ter um caráter intermitente, não sendo constatado em todos os ejaculados do mesmo animal (Concha-Bermejillo et al., 1996; Andrioli, 2001), o que vislumbra a possibilidade de testar alíquotas de sêmen através de técnicas sensíveis, como a PCR, e utilizar na IA, as partidas de sêmen que obtiverem resultados negativos, ou seja, as partidas nas quais não foram detectados os patógenos.

A monta natural representa, também, um grande risco na transmissão de doenças, pois no caso de caprinos contaminados, o comportamento do bode durante a monta aumenta o risco de transmissão vertical de patógenos (por via aérea ou digestiva), visto que, frente à fêmea em estro, os bodes bufam e urinam com frequência cortejando a fêmea.

Adams et al. (1983) reportaram que cabras não soroconverteram após exposição ao sêmen ou a machos com CAE. No entanto, ligeiro aumento nas taxas de soroconversão tem sido reportado em cabras cobertas com bodes soropositivos comparadas com fêmeas cobertas com bodes soronegativos (Rowe et al., 1992).

Em pequenos ruminantes, vários patógenos foram detectados no sêmen, com transmissão demonstrada ou potencial, conforme verificado na Tabela 2 (Hare, 1985).

Doenças de carácter crônico, de sintomas pouco evidentes ou que possuem longos períodos de latência e soroconversão tardia, são particularmente preocupantes, pois são mais difíceis de serem identificadas, como é o caso da CAE e da Língua Azul (Philpott, 1993).

Até recentemente, a detecção do vírus da Maedi Visna e da CAE, em amostras de sêmen, não havia sido descrita, provavelmente em função da menor sensibilidade das técnicas disponíveis, na detecção de pequenas quantidades de partículas virais. Porém, a recente detecção do CAEV no sêmen de bodes, experimental e naturalmente infectados (Travassos et al., 1998, 1999; Andrioli et al., 1999; Andrioli, 2001), demonstra o risco de transmissão desta enfermidade por esta via, sendo recomendado que os reprodutores infectados sejam retirados da reprodução (Russo, 1983; Gouveia, 1994, 1996).

A ocorrência de doenças em reprodutores e matrizes de alto valor genético e a manutenção destes animais no rebanho representam sérios problemas sanitários e grande dificuldade para o controle e erradicação de enfermidades transmissíveis pelas práticas e vias reprodutivas. A retirada da reprodução e sacrifício destes animais apresenta grande resistência dos produtores, devido aos prejuízos econômico e genético que representa a perda destes animais.

Tabela 2. Patógenos/enfermidade com risco de transmissão pelo sêmen em pequenos ruminantes.

Enfermidade	Presença Demonstrada	Transmissão Demonstrada	Transmissão Provável
CAE*	x		x
Brucelose	x		x
Campylobacteriose	x	x	
Clamidiose	x		x
Doença das Fronteiras**	x		x
Febre Aftosa	x	x	
Febre Q**	x		x
Leptospirose	x	x	
Língua Azul	x	x	
Maedi Visna	x		x
Micoplasmose	x		x
Peste dos Pequenos Ruminantes**	x		x
Rinderpest**	x		x
Salmonelose			
(<i>S. abortus ovis</i>)**	x		x
Toxoplasmose	x		x

Adaptado de Hare (1985).

* Artrite Encefalite Caprina

** Enfermidades não notificadas no Brasil.

Formas de contaminação do embrião

Para que ocorra a transmissão de um patógeno através do embrião é necessário que ele esteja presente dentro do embrião (infecção embrionária verdadeira), em associação ou mesmo aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (Singh, 1987; Wrathall, 1995).

Outro fator importante na transmissão de agentes por embrião é a patogenia da doença, especialmente quanto à predileção do patógeno ao trato genital. Dentre as principais doenças que afetam os órgãos reprodutores de pequenos ruminantes estão a brucelose, campylobacteriose, leptospirose, clamidiose e micoplasmoses. Agentes carregados pelo sangue podem, também, ganhar acesso ao trato genital, aumentando o risco no caso de qualquer hemorragia uterina o que ocorre, inevita-

velmente, durante a colheita de embriões. No caso de outros agentes de doenças que têm predileção por pele ou vísceras, a probabilidade de contaminação do embrião é remota, todavia, tais agentes, ocasionalmente, produzem infecções generalizadas, e mesmo as localizadas podem causar contaminação dos meios, das soluções e do equipamento.

A ZP de bovinos, caprinos e ovinos tem sido considerada uma barreira aos patógenos, sendo que sua integridade é crítica na determinação do estado de sanidade dos embriões. Baseado neste fato, a IETS recomenda a lavagem dos embriões após a colheita, objetivando a retirada dos possíveis patógenos aderidos à ZP (Stringfellow, 1999). As soluções de lavagem podem ter sua eficiência aumentada pela adição ao meio de antibióticos e de tripsina, porém esta só é eficiente para remoção de vírus que possuem envelopes, como é o caso dos lentivírus, porém outros agentes, que aderem firmemente à ZP podem não ser removidos pela lavagem.

Pesquisas realizadas sobre a possibilidade de veiculação de patógenos pela TE e pelas demais biotecnologias de embriões são escassas, principalmente em pequenos ruminantes, e tem amostragem de poucos animais para serem suficientemente seguras. Porém, das pesquisas realizadas, várias demonstram resultados positivos com o uso da TE, como método rápido e seguro de obtenção de crias sadias de animais infectados, podendo ser uma solução para a obtenção máxima de material genético de matrizes infectadas de alta produção, desde que sejam obedecidas as normas sanitárias da IETS (Tabela 3).

Certos vírus podem aderir-se tão firmemente à ZP após a exposição *in vitro*, que mesmo a lavagem não consegue removê-los, a exemplo do herpesvírus BHV-1 e o vírus da estomatite vesicular, e também bactérias como *Brucella ovis* e *Brucella abortus* (Tabela 4). E há importantes diferenças nas propriedades da ZP entre as espécies, que podem determinar diferenças quanto à aderência de patógenos a esta. Desta forma, dados de embriões de uma espécie não podem ser extrapolados para os de outra espécie (Wrathall, 1995).

No entanto, o uso de tripsina em meios de lavagem dos embriões tem demonstrado ser eficiente na remoção de vírus envelopados que não são removidos pela lavagem sem a enzima, como no caso de Pinheiro (2001) que não detectou o vírus da CAE, por isolamento viral e por PCR *Nested*, em amostras de embriões lavados em meio com tripsina (Wrathall & Suttmoller, 1999).

Tabela 3. Transmissão de enfermidades através da transferência de embriões de doadoras infectadas para receptoras sadias.

Agente	Nº de lavagens dos embriões	Transmissão Receptoras	Transmissão Crias	Referência
EMBRIÕES CAPRINOS				
CAEV	03	Negativo	Negativo	Wolfe et al. (1987)
CAEV	10	Negativo	Negativo	Andrioli et al. (2002)
Lingua Azul	10	Negativo	Negativo	Chemineau et al. (1986)
EMBRIÕES OVINOS				
Scrapie	00	Negativo	Positivo	Foster et al. (1992)
Scrapie	03	nr	Negativo	Footo et al. (1993)
Lingua Azul	04	Positivo	Negativo	Gilbert et al. (1987)
Maedia Visna	nr	Negativo	Negativo	Dawson (1988)

nr – não relatado na referência citada.

Tabela 4. Infectividade de embriões após exposição *in vitro* ao patógeno e posterior lavagem.

Patógeno	Nº de embriões expostos (n)	Embriões portando patógenos	Referência
Embriões com zona pelúcida intacta			
Vírus da doença de Border	49	Negativo	Evermann et al. (1981)
Vírus da BVD	49	Negativo	Evermann et al. (1981)
<i>Brucella abortus</i>	53	4%	Riddell et al. (1989)
<i>Brucella ovis</i>	nr	Positiva	Riddell et al. (1990)
<i>Brucella ovis</i>	20*	95%	Wolfe et al. (1988)
<i>Brucella ovis</i>	49**	94%	Wolfe et al. (1988)
<i>Campylobacter fetus</i>	164	Negativo	Guérin et al. (1988)
Lentivírus caprino	nr	Negativo	Lamara et al. (2002)
Embriões sem Zona pelúcida			
Vírus da doença de Border	49	Negativo	Evermann et al. (1981)
Vírus BVD	23	Negativo	Evermann et al. (1981)
Lentivírus caprino	nr	Positivo	Lamara et al. (2002)

* Embriões não expostos a antibiótico.

** Embriões expostos a antibiótico.

nr - não relatado.

O meio de lavagem uterina colhido de doadoras infectadas pode conter patógenos, embora, Wolfe et al. (1987) não isolaram o CAEV de 12 lavados uterinos de cabras submetidas a TE. Pinheiro (2001) observou que das 10 amostras de fluido uterino coletadas de cabras infectadas com CAE 37,5% foram positivas ao isolamento viral e 70% pela técnica de PCR *Nested*.

A transmissão vertical do CAEV foi também apontada por Ali (1987), East et al. (1993) e por Pinheiro (2001), pois a presença do CAEV no meio uterino foi comprovada. Estes estudos demonstram o perigo da transmissão materno fetal de patógenos presentes no meio uterino.

A infecção de embriões *in vitro*, ou seja, no processo de fecundação *in vitro* (FIV) foi também hipotetizado, pois Lamara et al. (2000) observaram que células da granulosa de caprinos são susceptíveis à infecção e replicação do CAEV em cultura, e como os ovócitos, geralmente obtidos de ovários de cabras de abatedouros e a ZP de embriões produzidos *in vitro* diferem das produzidas *in vivo*, é importante verificar se a presença do Lentivírus pode influenciar a FIV e o desenvolvimento de embriões *in vitro*; e se os tecidos derivados destas fontes podem contribuir para a disseminação da CAE. Além disso, a ZP de embriões produzidos *in vitro* difere das produzidas *in vivo*, e somado ao fato do CAEV poder infectar e replicar bem em células da granulosa - *in vitro* (Lamara et al., 2000). É importante verificar se a presença do Lentivírus pode influenciar o desenvolvimento dos embriões *in vitro* e, principalmente, contribuir para infecção dos embriões.

As novas biotecnologias reprodutivas em estudo que requerem a ruptura da ZP como a transferência nuclear, entre outras, possuem grande risco de transmissão de patógenos, porém nenhum estudo nesta linha tem sido desenvolvido (Thibier, 2001).

Além do problema sanitário propriamente dito, o uso de animais ou germoplasma contaminados pode reduzir as respostas reprodutivas a estas técnicas, acarretando perda do investimento, como foi observado por Guérin et al. (1992), que verificaram redução significativa dos resultados de FIV, quando se utilizou sêmen de touros portadores de diarréia viral bovina (BVD). Portanto, o custo-benefício do uso de animais doentes em programas reprodutivos deve ser criteriosamente analisado (Pinheiro, 2001).

Segundo Pinheiro (2001), as taxas de prenhez e de natalidade obtidas, tanto de embriões de cabras contaminadas com CAEV, transferidos tanto a fresco como congelados, estão abaixo das descritas para a espécie caprina, e semelhantes às descritas por Wolfe et al. (1987) que obtiveram taxas de prenhez (12,5%) e de natalidade (6,25%), para cabras infectadas. Porém, faz-se necessário um estudo concomitante, com cabras sadias e infectadas com o CAEV, utilizando os mesmos tratamentos hormonais e de colheita de embriões, bem como com os mesmos fatores climáticos e de nutrição, para determinar se a infecção pelo CAEV influencia negativamente nas taxas reprodutivas num programa de TE.

Uso de Biotecnologias Como Forma de Controle de Enfermidades

A eliminação de patógenos de um plantel, região ou país, depende, muitas vezes, da identificação dos animais portadores que podem ser assintomáticos e falsos-negativos à muitos testes de diagnóstico usuais, necessitando-se de testes com maior sensibilidade e especificidade.

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), através de seu Comitê de Importação/Exportação, organizou, por vários anos, a formulação de protocolos baseados em estudos científicos, a fim de evitar a transmissão de doenças pela TE. Esses protocolos são apresentados por completo nos apêndices da Organização Internacional de Epizootias (OIE). Mas, a certificação da possibilidade de transmissão de patógenos pelo embrião, assim como pelo sêmen, requer a constatação de que o agente não se encontra neste meio ou que comprovem se ocorre ou não a transmissão destes patógenos pelas técnicas reprodutivas.

Também, procura-se estudar métodos que solucionem este problema, como o desenvolvimento de técnicas inóculas ao sêmen e do embrião, que visem eliminar os patógenos do germoplasma, ou de técnicas de diagnóstico para amostras de sêmen e/ou nos fluidos de coleta de germoplasma, que certifiquem que aquele material, especificamente, não possui os agentes patogênicos ou estão em quantidades mínimas e não infectantes. Estes métodos de diagnóstico devem ser específicos e sensíveis para a detecção de patógenos em quantidades mínimas, como também serem testes exequíveis do ponto de vista prático e econômico.

Enquanto não se comprova a possível veiculação das principais enfermidades pelo sêmen e embrião, normas oficiais para regulamentar a produção e o comércio de

material genético livre de patógenos se fazem necessárias (Afshar & Eaglesome, 1990). Desta maneira a OIE definiu suas diretrizes (Hare, 1985). Nos Estados Unidos da América essas normas foram padronizadas em 1989, sob controle da Associação Nacional de Reprodução Animal (NAAB) (Philpott, 1993) e, recentemente a União Européia (EU), através da diretiva 93/60/EEC, estabeleceu suas normas de controle. Países do MERCOSUL estão estudando normas para o comércio de sêmen, utilizando as exigências baseadas nas pesquisas da presença e transmissão de patógenos no sêmen contaminado.

Os padrões atuais de certificação internacional de embriões são baseados, substancialmente, nas recomendações do Código Internacional de Saúde Animal - Internacional Animal Health Code, da OIE e da Organização Mundial de Saúde Animal. Esses padrões visam conhecer as propriedades inatas do embrião, e a eficácia de metodologias padronizadas de processamento de embriões e de métodos de eliminação de patógenos específicos (Evans, 1999).

Considerações Finais

O estudo sobre a possibilidade de veiculação de patógenos pela monta natural, inseminação artificial (IA) e pela transferência de embrião (TE), assim como para as demais biotecnologias que estão em desenvolvimento para pequenos ruminantes, tem grande importância e requer mais atenção, pois influi diretamente no comércio e importação de germoplasma e, portanto, no potencial econômico deste empreendimento.

As rápidas mudanças que estão ocorrendo no mundo globalizado requerem adaptações de todo o contingente técnico envolvido na cadeia produtiva de pequenos ruminantes. Atualmente, para que qualquer negócio tenha sustentabilidade necessita-se de qualidade, eficiência, maior produtividade a um menor custo e, indispensavelmente, um controle rígido da sanidade, pois barreiras sanitárias impostas por países importadores estão cada vez mais rígidas, superando as econômicas.

Associando as biotécnicas reprodutivas às técnicas virológicas clássicas e de biologia molecular, tem-se a capacidade de detectar com segurança, a presença dos agentes patogênicos no sêmen e em embriões e de buscar técnicas alternativas para utilização de reprodutores e matrizes contaminadas, como ferramentas de controle da CAE.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; MCGUIRE, T. C.:
GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus.
American Journal of Veterinary Research, v. 44, n. 9, p.1670-1675, 1983.
- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M. D. Viruses associated with bovine semen.**
Veterinary Bulletin, **Farnham Royal**, v. 60, p. 93-109, 1990.
- ALI, O. A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of goat.
Veterinary Record, v. 121, n. 6, p.131-132, 1987.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA SOBRINHO, P. A.; PINHEIRO, R.
R.; SALLES, H. O. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas
pelo lentivírus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro,
v. 24, n. 5, p.215-220, 2002.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.;
MARTINS, A. S.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus
caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de
Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.
- ASSIS, A. P. M. V.; GOUVEIA, A. M. G. Evidências sorológicas de lentivírus

(Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de MG., RJ., BA., CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994, p. 104.

CHEMINEAU, P.; PROCUREUR, R.; COGNIE, Y.; LEFÈVRE, P. C.; LOCATELLI, A.; CHUPIN, D. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue infected goat herd without bluetongue transmission. **Theriogenology**, v. 26, n. 3, p. 279-290, 1986.

CONCHA-BERMEJILLO, A; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S. J.; DeMARTINI, J. C. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p. 684-688, 1996.

DAWSON, M. Lentivirus diseases of domesticated animals. **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 4, p. 401-19, 1988.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v.10, n. 3, p. 251-262, 1993.

EVANS, B. R. Considerações práticas e éticas sobre a certificação e o comércio internacional de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. p.7-15.

EVERMANN, J.F.; FARIS, M A, NIEMI, S.M.; WRIGHT, R. W. Pesti-virus persistence and pathogenesis: Comparative diagnostic aspects of border disease virus of sheep and bovine viral diarrhoea virus. Proc 24th ANN MEET AM. ASSOC VET. LAB DIAG. 1981, p.407-426. (ver este documento) PAG166, REF 14

FOOTE, W. C.; CLARK, W.; MACIULIS, A.; CALL, J. W.; HOURRIGAN, J.; EVANS, R. C.; MARSHALL, M. R.; CAMP, M. de. Prevention of scrapie transmission in sheep using embryo transfer. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p.1863-1868, 1993.

FOSTER, J. D.; MCKELVEY, W. A.; MYLNE, M. J.; WILLIAMS, A.; HUNTER, N.; HOPES, J.; FRASER, H. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by

embryo transfer. **Veterinary Record**, v. 130, n.16, p. 341-343, 1992.

GARNER, M. G.; LACK, M. B. Modelling the potential impact of exotic diseases on regional Australia. **Australian Veterinay Journal**, v. 72, p. 81-87, 1995.

GILBERT, R. O.; COUBROUGH, R. J.; WEISS, K. E. The transmission of bluetongue virus by embryo transfer in sheep. **Theriogenology**, v. 27, n. 3, p. 527-540, 1987.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria**: Setor Sanidade Animal. Sobral: Embrapa-CNPQ, 1994. 125 f.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v.10, n. 3, p. 251-262, 1993.

EVANS, B. R. Considerações práticas e éticas sobre a certificação e o comércio internacional de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. p.7-15.

EVERMANN, J. F.; FARIS, M. A; NIEMI, S. M.; WRIGHT, R. W. Pesti-virus persistence and pathogenesis: Comparative diagnostic aspects of border disease virus of sheep and bovine viral diarrhea virus. In: ANN. MEET. AM. ASSOC. VET. LAB. DIAG., 24., 1981, **Proceedings...** p.407-426.

FOOTE, W. C.; CLARK, W.; MACIULIS, A.; CALL, J. W.; HOURRIGAN, J.; EVANS, R. C.; MARSHALL, M. R.; CAMP, M. de. Prevention of scrapie transmission in sheep using embryo transfer. **American Journal of Veterinay Research**, v. 54, n. 11, p.1863-1868, 1993.

FOSTER, J. D.; MCKELVEY, W. A.; MYLNE, M. J.; WILLIAMS, A.; HUNTER, N.; HOPES, J.; FRASER, H. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. **Veterinary Record**, v. 130, n. 16, p. 341-343, 1992.

GARNER, M. G.; LACK, M. B. Modelling the potential impact of exotic diseases on regional Australia. **Australian Veterinay Journal**, v. 72, p. 81-87, 1995.

GILBERT, R. O.; COUBROUGH, R. J.; WEISS, K. E. The transmission of bluetongue virus by embryo transfer in sheep. **Theriogenology**, v. 27, n. 3, p. 527-540, 1987.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria**: Setor Sanidade Animal. Sobral: Embrapa-CNPC, 1994. 125 f.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria**: Área Sanidade Animal. Sobral: Embrapa-CNPC, 1996. 125 f.

GUÉRIN, B.; BUILLY, J. P.; HUMBLLOT, P.; NIBART, M.; THIBIER, M. Effects de la contamination experimentale *in vitro* des embryons de souris et de brebis par *Campylobacter fetus*. **Bulletin de L'Academie Veterinaire De France**, v. 61, p. 63-78, 1988.

GUÉRIN, B.; CHAFFAUX, S.; MARQUANT, LE GUIENNE; B.; ALLIETTA, M.; THIBIER, M. IVF and IV culture of bovine embryos using semen from a bull persistently infected with BVD. **Theriogenology**, v. 37, n.1, p. 217, 1992.

HARE, W. C. D. **Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones**. Paris: Office International des Epizooties, 1985. 83 p. (Serie Técnica, 4).

LAMARA, A.; FIENE, F.; CHEBLOUNE, T.; TAINURIER, D. In vitro susceptibility of goat granulosa cells to caprine arthritis encephalitis virus: preliminary results. **Theriogenology**, v. 53, n.1, p. 320, 2000.

LAMARA, A.; FIENE, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; CHATAGNON, G.; BRUYAS, J.F.; TAINURIER, D.; BATTUT, I.; FORNAZERO, C.; CHEBLOUNE, Y. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Theriogenology**, v. 58, n. 6, p. 1153-63, 2002.

MOOJEN, V., SOARES, H. C., RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi-visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 14, p. 77-78, 1986.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v. 149, p. 339-369, 1993.

PINHEIRO, A. A. **Vírus da artrite encefalite caprina**: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRIOLI, A. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 421-423, 1999.

RIDDELL, M. G.; STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; GALIK, P. K. *In vitro* exposure of ovine ova to *Brucella abortus*. **Theriogenology**, v. 31, n. 4, p.895-901, 1989.

RIDDELL, M. G.; STRINGFELLOW, D. A.; WOLFE, D. F.; GALIK, P. K. Seroconversion of recipient ewes after transfer of embryo exposed to *Brucella ovis in vitro*. **Theriogenology**, v. 34, p. 965-973, 1990.

ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THURMOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 2386-2395, 1992.

RUSSO, P. Isolation of a virus in an outbreak of polyarthritis in goat. Preliminary serological survey. **Bulletin de la Academie Veterinaire de France**, v. 56, n.1, p. 31-38, 1983.

SINGH, E. L. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 9-20, 1987.

STRINGFELLOW, D. A. Recomendações para o manuseio sanitário de embriões obtidos in vivo. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. p. 83-88.

THIBIER, M. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health, **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1465-1481, 2001.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 253-270, 2000a.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 233-251, 2000b.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G. da; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 3, p. 101-106, 1999.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A.; PERRIN, G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. **Veterinary Research**, v. 29, p. 579-585, 1998.

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

WRATHALL, A. E.; SUTMOLLER, P. Potencial da transferência de embriões para controlar a transmissão de doenças. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. p. 17-46

WOLFE, D. F.; NUSBAUM, E. E.; LAUERMAN, L. H.; MYSINGER, P. W.; RIDDELL, M. G.; PUTNAM, M. R.; SHUMWAY, L. S.; POWE, T. A. Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. **Theriogenology**, v. 28, n. 3, p. 307-316, 1987.

WOLFE, D. F.; STRINGFELLOW, D. A.; RIDDELL, M. G.; LAUERMAN, L. H.; GALIK, P. K. Adherence of *Brucella ovis* to preimplantation ovine ova. **Theriogenology**, v. 30, p. 387-393, 1988.



Caprinos