



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

Lucimara Antonio Borges<sup>1</sup>; Bruna Alexandrino<sup>2</sup>; Andrea Souza Ramos de Medeiros<sup>3</sup>; Bruno Lima Muniz<sup>4</sup>; Samir Issa Samara<sup>5</sup>

1. Pós-Graduanda em Medicina Veterinária Preventiva, UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal ([luci.borges95@hotmail.com](mailto:luci.borges95@hotmail.com))
2. Professora Assistente Doutora da Universidade Federal do Tocantins, Câmpus de Araguaína
3. Assistente de Suporte Acadêmico, UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal
4. Médico Veterinário
5. Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, UNESP, Univ Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal

Recebido em: 12/04/2014 – Aprovado em: 27/05/2014 – Publicado em: 01/07/2014

### RESUMO

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 contra o vírus 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 a vacinação com dose única definiu o aumento de títulos de anticorpos para o BoHV-1 em 72,7% (152/209) dos animais e 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

#### ABSTRACT

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 against 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 vaccination with a single dose defined the increase of antibody titers for BoHV-1 in 72.7% (152/209) of the animals; 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.

**KEYWORDS:** Bovine herpesvirus tipe 1, antibody titers, embryo transfer.

## INTRODUÇÃO

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 *in vitro*, aproximadamente 50,0% (REICHENBACH, 2003; VARAGO et al., 2008).

No entanto, as alterações na sanidade do rebanho, em particular as infecções que comprometem direta ou indiretamente o trato reprodutivo de fêmeas e machos podem 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 provocando baixas taxas de concepção, abortamento, infertilidade temporária e repetição de estro (WHITE & SNOWDON, 1973).

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).

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 (LEMAIRE et al., 1994; VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, 2006).

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

Considerando os distúrbios reprodutivos que o BoHV-1 pode ocasionar em bovinos, esta pesquisa em rebanho de fêmeas receptoras de embriões teve como propósito analisar a resposta imunológica em vacas receptoras de embriões vacinadas contra o BoHV-1 frente ao sucesso de prenhez. Para tanto, objetivou-se 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.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido em três fazendas (A, B e C) localizadas no município de Prata, região do Triângulo Mineiro, Estado de Minas Gerais (MG), cuja atividade econômica principal é destinada à transferência de embriões. Foram utilizadas novilhas não vacinadas contra o BoHV-1, selecionadas de acordo com a avaliação de escore corporal do rebanho *Bos indicus*, classificadas entre os valores intermediários de quatro a seis (NICHOLSON & BUTTERWORTH, 1986).

O manejo sanitário e reprodutivo foi realizado pelo mesmo médico veterinário que submeteu todas as novilhas do rebanho 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, 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 negativos para as duas enfermidades citadas continuaram no rebanho e então foram selecionadas aleatoriamente 209 novilhas para o desenvolvimento do estudo, sendo 68 novilhas na fazenda A, 40 na fazenda B e 101 na fazenda C. Foram colhidas amostras de sangue, por punção da veia caudal mediana ou jugular em tubos *vacutainer* sem coagulante. Separadas, as amostras de soro foram acondicionadas em microtubos e estocadas à temperatura de aproximadamente 20°C negativos 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 e as novilhas foram observadas diariamente quanto à apresentação de estro para então serem involuadas com embriões produzidos *in vitro*.

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 3,5 mL de cloridrato de lidocaína 2,0%, via epidural

prossequindo 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. 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.

Foram realizadas até seis TE em cada animal. Quando houve confirmação de prenhez foi colhida uma amostra de sangue desse animal por punção da veia caudal mediana ou jugular em tubos *vacutainer* sem anticoagulante e o soro separado foi também estocado à temperatura de aproximadamente 20°C negativos até a realização dos testes sorológicos. Além disso, quando foi necessário mais de um serviço, ou seja, mais de uma TE para confirmar a prenhez a repetição de estro foi considerada e quando uma novilha foi submetida a quatro ou mais serviços classificou-se como repetidora de estro (HAFEZ & HAFEZ, 2004; PIERONI, 2009).

As amostras de soro sanguíneo foram testadas em duplicata em diluições seriadas na base 2 de 1:4 até 1:1024 pela técnica de virusneutralização, de acordo com protocolo definido pela OIE (2008), para detecção e titulação dos anticorpos, adicionando suspensão viral da estirpe Nebraska do BoHV-1 ajustada a uma concentração de 200 DICT<sub>50</sub> (Dose Infectante em Cultura de Tecido) e suspensão de células Madin & Darby bovine kidney (MDBK) numa concentração de 3x10<sup>5</sup> células/mL.

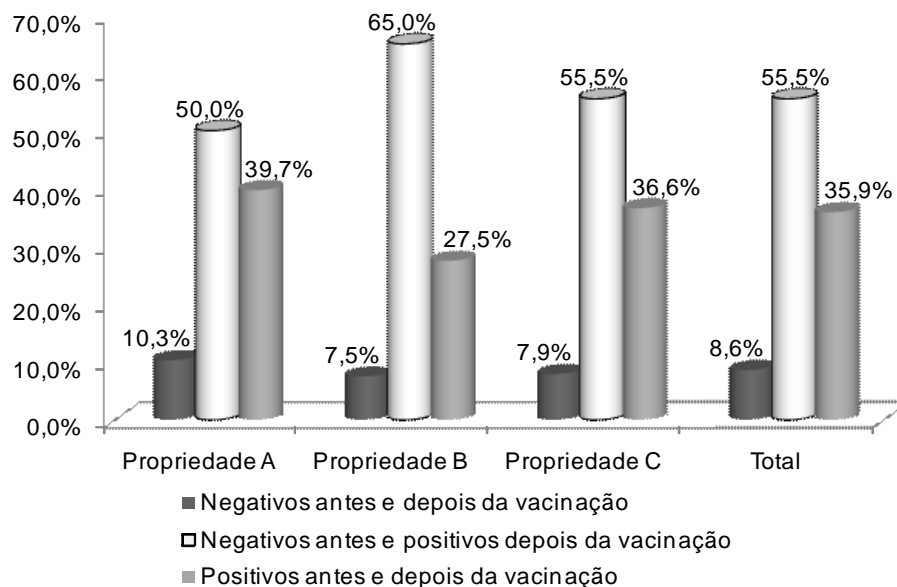
O título de anticorpos neutralizantes considerado foi a recíproca do inverso da última diluição em que não foi observado efeito citopático característico (ECP) causado pelo vírus, sendo que o seu valor foi o inverso da diluição. As médias dos títulos obtidos das amostras testadas em duplicata foram transformadas em média geométrica de títulos (TMG) por meio da média geométrica que é definida como a raiz enésima do produto de n números (THRUSFIELD, 1986). Assim, verificou-se a relação entre as TMG apresentadas antes e depois da vacinação com os parâmetros reprodutivos monitorados.

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<sup>2</sup>) 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).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, 37,3% (28/75) das amostras positivas antes da vacinação tinham títulos acima de 128, o que sugere a presença de infecção recente no rebanho (ALFIERI et al., 1998) e a circulação viral em baixos níveis nas propriedades, podendo causar baixo desempenho reprodutivo nos animais.

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 nos rebanhos: 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, os resultados representados esquematicamente por fazenda encontram-se na figura 1.



**FIGURA 1.** Reatividade sorológica dos animais, no teste de VN para o BoHV-1, antes e depois da vacinação.

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).

Isso se deveu à positividade geral dos animais 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.

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.

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. Vale ressaltar que nesse estudo 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.

Das novilhas negativas no teste de VN para o BoHV-1 antes e depois da vacinação, uma (5,5%) da fazenda C apresentou morte embrionária/fetal. Nas outras 17 (95,5%), representadas na tabela 1, foi observado que em dez (58,7%) houve sucesso de prenhez na 1ª TE, em cinco (29,3%) na 2ª, em uma (6,0%) na 3ª e em uma (6,0%) na 4ª TE.

**TABELA 1.** Parâmetros reprodutivos dos animais negativos antes e depois da vacinação, no teste de virusneutralização (VN) para o BoHV-1.

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%)

Sendo assim, também se observa que o esquema não prejudicou a eficiência reprodutiva, pois 58,7% e 29,3% dos animais com esse perfil sorológico obtiveram prenhez na 1ª e 2ª TE, respectivamente.

Como o número máximo de TE realizadas nesse experimento foi 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. No entanto, 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.

Dos 116 animais negativos no teste de VN para o BoHV-1 antes e positivos depois da vacinação, nove (7,8%) novilhas apresentaram morte embrionária/fetal: um (0,9%) animal na fazenda A e oito (6,9%) na fazenda C, ambos com TMG abaixo de 16. Em 107 (92,2%) animais (Tabela 2) foi observado que, depois da vacinação, 93 (86,9%) apresentaram TMG abaixo de 16, tendo 51 (47,7%) novilhas sucesso de prenhez na 1ª TE, 23 (21,5%) na 2ª TE, 13 (12,1%) na 3ª, seis (5,6%) na 4ª, 5ª ou 6ª TE. Doze (11,2%) animais tiveram TMG entre 16 e 256, sendo que cinco (4,7%) apresentaram prenhez na 1ª TE, quatro (3,7%) na 2ª, dois (1,9%) 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.

Entre esses animais que soroconverteram observou-se que 87,1% apresentaram títulos de anticorpos menores ou iguais 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.

**TABELA 2.** 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.

TMG	Fazenda A			Fazenda B				Fazenda C			
	N° de TE			N° de TE				N° de TE			
	1	2	3	1	2	3	4 ou 5	1	2	3	4 ou 6
Título < 16	19 (17,8%)	9 (8,4%)	5 (4,7%)	11 (10,3%)	6 (5,60%)	4 (3,7%)	2 (1,9%)	21 (19,6%)	8 (7,5%)	4 (3,7%)	4 (3,7%)
Título ≥ 16 e ≤ 256	0	0	1 (0,9%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)	0	0	4 (3,7%)	3 (2,8%)	1 (0,9%)	1 (0,9%)
Título > 256	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,9%)	1 (0,9%)	0	0
Total (%)	34 (31,8%)			25 (23,4%)				48 (44,8%)			

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 10,5% 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).

As taxas de prenhez observadas encontram-se na tabela 3, separadas de acordo com o TMG apresentado depois da vacinação. 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.** 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.

TMG	N° 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%)

\*\*Cálculos de percentual válidos somente na mesma linha.

\*\*Cálculos de percentual válidos somente na mesma linha.

GARCIA et al. (2005) relatam taxas de gestação entre 20 e 60% para embriões produzidos *in vitro* (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.

A tabela 4 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.

**TABELA 4.** 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.

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 (5,3%) animais: dois (2,7%) animais na fazenda B e um (1,3%) na fazenda C, ambos com TMG entre 16 e 256; e um (1,3%) na fazenda C com TMG acima de 256. Nos outros 71 (94,7%) animais (detalhados na tabela 5) 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 (1,4%) 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 (1,4%) na 4ª ou 5ª TE.

**TABELA 5.** 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.

TMG	Fazenda A				Fazenda B			Fazenda C			
	Nº de TE				Nº de TE			Nº de TE			
	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	4 (5,6%)	2 (2,8%)	0	1 (1,4%)
Título ≥ 16 e ≤ 256	9 (12,7%)	4 (5,6%)	3 (4,2%)	2 (2,8%)	5 (7%)	3 (4,2%)	1 (1,4%)	12 (16,9%)	3 (4,2%)	5 (7%)	3 (4,2%)
Título > 256	2 (2,8%)	0	0	0	0	0	0	4 (5,6%)	0	0	1 (1,4%)
Total (%)	27 (38,0%)				9 (12,7%)			35 (49,3%)			



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 sejam suficientes para proteger os animais da infecção clínica frente a uma exposição ao agente.

A tabela 6 apresenta as taxas de prenhez dessas 71 novilhas, separadas de acordo com o TMG determinados depois da vacinação. 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, porém 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.

**TABELA 6.** 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.

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%)

\*\*Cálculos de percentual válidos somente na mesma linha.

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.

No contexto geral, comparando-se os títulos de anticorpos antes e depois da vacina, pode-se verificar ainda que 36 (48,0%) animais tiveram aumento de títulos de anticorpos, o que pode ser atribuído ao efeito 'booster' em animais que se encontravam latentemente infectados, 13 (17,3%) mantiveram os títulos observados antes da vacinação e 26 (34,7%) tiveram diminuição dos mesmos.

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 as caracteriza como repetidoras de estro. 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.

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; ODENSVIK et al., 1993).

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 131135/2009-0) pela bolsa de estudo de mestrado concedida a Lucimara Antonio Borges e ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pelas análises estatísticas dos resultados.

### CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, os índices gerais de gestação não tiveram influência significativa da resposta imunológica em decorrência da vacinação com dose única em vacas receptoras de embriões, no entanto, 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.

### REFERÊNCIAS

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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: 11 mar 2014.

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.

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.

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

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.

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.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1986, 556 p.

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.

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.