

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio**

Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos

Anna Carolina Cenamo Junqueira

**São Paulo
2020**

Anna Carolina Cenamo Junqueira

Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Sanidade Alimentar e
Sanidade no Agroecossistema

Orientadora Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

São Paulo
2020

Eu **Anna Carolina Cenamo Junqueira**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: Anna Carolina Cenamo Junqueira Data 30 /07/2020.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Junqueira, Anna Carolina Cenamo.

Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos.

/ Anna Carolina Cenamo Junqueira. - São Paulo, 2020.

69 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2020D.AJ006

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Qualidade de produtos e processos na produção animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Impact of blue tongue at production *in vitro* bovine embryos.

1. BTV 2. oócitos 3. Certificação de embriões I. Junqueira, Anna Carolina Cenamo II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2020/006

FOLHA DE APROVAÇÃO**Nome: Anna Carolina Cenamo Junqueira****Título: Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 30 / 07 / 2020

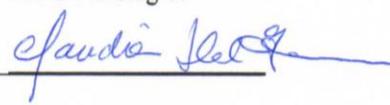
Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

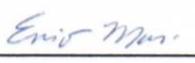
Julgamento: AprovadaAssinatura: Prof^a. Dra. Claudia Del Fava

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: A PROVADAAssinatura: 

Dr. Enio Mori

Instituição: Instituto Pasteur

Julgamento: AprovadaAssinatura: 

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho à minha família,
principalmente à minha mãe que me
possibilitou estudar com excelência e
concluir mais uma etapa
da minha profissão”

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos de muito estudo, aprendizado e crescimento, gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma foram fundamentais para realização e conclusão deste trabalho, já que nenhum trabalho científico acontece sem o esforço e dedicação de outrem.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco**, pela receptividade desde a primeira conversa há dois anos, por me receber no Laboratório e me proporcionar um desenvolvimento científico e profissional neste período.

À **Dra. Líria Hiromi Okuda**, que me ajudou no meu experimento, me auxiliando em todo o processo, sempre acessível, disposta a ajudar e responder as minhas dúvidas.

À **Dr. Enio Mori**, membro da banca, pesquisador científico do Instituto Pasteur, pelas correções precisas do texto, trazer experiência profissional e esclarecer minhas dúvidas.

À **Dra. Cláudia Del Fava**, membro da banca, pesquisadora do Instituto Biológico, por me treinar em atividades competentes a área de anatomia patológica, me levar a eventos relacionados a medicina veterinária e confiar a mim trabalho que publicamos em parceria.

À **Msc. Priscilla Schoeps Felicio** por todo o companheirismo, ajuda e ensinamentos, sempre disposta a me auxiliar da melhor maneira possível.

À **Msc. Vivian da Silva Cardoso Pinto** e a equipe da *In Vitro* Brasil, por terem feito a produção de embriões e pelos esclarecimentos do processo.

À **Msc. Marcia Mayumi Fusuma**, laboratorista do LVB, por me auxiliar bastante na parte prática do experimento, me ajudando a fazer as etapas da PCR e extração por BEADS magnéticas

À **Marta Elisabete Scarelli Vicente**, por me auxiliar na parte prática do experimento, no momento que estava como laboratorista do LVB.

À Pqc Dra. Adriana H. C. Nogueira, Pqc Dra. Eliana De Stefano, e à toda equipe do LVB: Alisete, Taís Ávila e Dudu pela atenção e ajuda desde que entrei no laboratório.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Código de financiamento 001”

EPIGRAFE

“A motivação não é a fórmula mais rápida para atingir o sucesso, mas certamente é o caminho mais rápido para o alcançar...”

RESUMO

JUNQUEIRA, A.C.C. Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos. Impact of blue tongue virus at production *in vitro* bovine embryos. São Paulo, 2020, 69 f., dissertação Mestrado em sanidade animal, segurança alimentar e ambiental no agronegócio – Instituto Biológico de São Paulo.

O vírus da língua azul (bluetongue virus, BTV), membro da família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, é transmitido aos ruminantes domésticos e silvestres por Culicídeos. Embora bovinos sejam assintomáticos, apresentam-se como importantes reservatórios na cadeia epidemiológica da doença. Em fêmeas gestantes virêmicas, o BTV pode atingir oócitos e embriões, o que pode justificar imposição de barreira sanitária por países importadores de animais e material genético. A presença do agente em células embrionárias associada à zona pelúcida ou aos fluidos que o envolvem pode resultar em perdas diretas do embrião durante a PIVE, e risco de infecção e abortamento à receptora. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da infecção experimental por BTV em embriões produzidos *in vitro* e desenvolver protocolo de ensaio para certificação de embriões livres deste agente. Para tanto, foram testados todos os insumos de origem animal envolvidos na produção *in vitro* de embriões (PIVE), além de infectar oócitos em maturação com diferentes diluições virais de BTV-4, com título $10^5/100\mu\text{L}$ (10^{-1} à 10^{-8}), analisar os efeitos no desenvolvimento do embrião por meio de microscopia óptica em todas as etapas do cultivo e avaliar por RT-qPCR os procedimentos de lavagens recomendados pela IETS. Os resultados obtidos na RT-qPCR nas amostras, colhidas durante o procedimento da PIVE, como oócitos não fecundados e embriões degenerados, extraídas com Trizol, foram positivos nos grupos que receberam doses virais $10.000 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (diluição 10^{-1}) à $1 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-5}), e o grupo que recebeu $0,1 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-6}) foi identificado como inconclusivo e os que receberam $0,01 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-7}) e $0,001$ (10^{-8}) apresentaram resultados negativos. Quando o mesmo protocolo foi aplicado às mesmas amostras, variando apenas o método de extração, com BEADS magnéticas, o resultado foi similar, exceto na amostra inconclusiva que passou a ser positiva na diluição 10^{-6} . Foram evidenciadas, nos grupos que receberam maior carga viral, alterações morfológicas, como aumento do espaço entre as células, clivagens assimétricas, com granulações, quando comparadas ao grupo controle. As lavagens preconizadas no manual da IETS, sem tripsina, não foram eficazes para impedir a multiplicação do BTV nos grupos experimentalmente infectados. Portanto, recomenda-se análise de amostras colhidas, em pontos críticos, para certificação de partidas de embrião livres do BTV. A validação deste protocolo será uma ferramenta útil para as autoridades sanitárias e profissionais da área, nas negociações dos acordos comerciais entre países para certificação de partidas de embriões livres de BTV-4, que além de evitar perdas diretas devido ao baixo desempenho da PIVE quando algum insumo estiver contaminado, garantirá o comércio seguro de embriões. Essas medidas incluídas nos protocolos sanitários de transferência de embriões bovinos vão fortalecer o setor e permitir a abertura de mais mercados internacionais.

Palavras-chave: BTV, oócitos, certificação de embriões

ABSTRACT

JUNQUEIRA, A.C.C. Impact of bluetongue virus at production *in vitro* bovine embryos. Impacto do vírus da língua azul na produção *in vitro* de embriões bovinos São Paulo, 2020, 69 f., dissertação Mestrado em sanidade animal, segurança alimentar e ambiental no agronegócio – Instituto Biológico de São Paulo.

The bluetongue virus (BTV), member of the family *Reoviridae*, genus *Orbivirus*, is transmitted to domestic and wild ruminants by *Culicoides*. Although cattle are asymptomatic, they are an important reservoir in the epidemiological chain of the disease. In viremic pregnant females, BTV can reach oocytes and embryos, which justifies the requirement of a health barrier imposed by countries that import animals and genetic material. The presence of the agent in embryonic cells associated with the zona pellucida or the fluids that surround it can result in risk of infection and miscarriage to the recipient. The objective of this work was to evaluate the impact of experimental infection by BTV in embryos produced *in vitro* and to develop an assay protocol for certification of free embryos of this agent. To do so, all the inputs of animal origin involved in the *in vitro* production of embryos (PIVE) were tested, in addition to infecting maturing oocytes with different viral doses of BTV -4 with title $10^5/100\mu\text{L}$ (10^{-1} à 10^{-8}), analyzing the effects on the development of the embryo by means of optical microscopy at all stages of cultivation and evaluate using washing procedures recommended by IETS using qRt-PCR. The results obtained in were that embryos infected with doses $10.000 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (dilution 10^{-1}) à $1 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-5}), and the group that received $0,1 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-6}) was identified as inconclusive and those that receive $0,01 \text{ TCID}_{50} / 100 \mu\text{L}$ (10^{-7}) e $0,001$ (10^{-8}) showed negative results. When the same protocol was applied to the same samples, varying only the extraction method, with Magnetic BEADS the result was similar, except in the inconclusive sample, wich became positive in 10^{-6} dilution . It was evident in the groups that received the highest viral load morphological changes, such as increased space between cells, asymmetric cleavages, with granuations, when compared to the control group. In conclusion, it is suggested that the RT-qPCR diagnostic method and the washes recommended by IETS are of fundamental importance to prevent the spread of the BTV. The validation of this protocol will be a useful tool available to health authorities and professionals in the field, in the negotiation of commercial agreements between countries for the certification of BTV-4 free embryo departures, wich in addition to avoiding direct losses due to the poor performance of PIVE when any input contaminated, it guarantees the safe trade of embryos. These measures included in the sanitary protocols for the transfer of bovine embryos will strengthen the sector and allow the opening of an international market.

Keywords: BTV, oocytes, embryo certification

LISTA DE ABREVIATURAS

Be	Blastocisto eclodido
Bi	Blastocisto inicial
Bl	Blastocisto
BT	Bluetongue
Be	Blastocisto eclodindo
BSA	Bovine Seric Albumin (Albumina Sérica Bovina)
BTV	Bluetongue virus
Bx	Blastocisto expandido
CCO	Complexo cumulus oócito
CCPS	Centros de Coleta e Processamento de Sêmen
CIV	Cultivo de desenvolvimento <i>in vitro</i>
CLIV	Clivado
CN	Controle negativo
Cp	Crossing point d
DNA	deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EPC	Equipamento de proteção coletiva
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
IPC	Internal Positive Control
LA	Língua azul
MEM	Meio essencial mínimo
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Mo	Mórula
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico mensageiro)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
SFB	Soro fetal bovino
Tm	Temperatura de melting
ZP	Zona pelúcida

LISTA DE SIGLAS

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IB	Instituto Biológico
IETS	International Embryo Transfer Society (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
LVB	Laboratório de viroses de bovídeos
OIE	Organização Internacional das Epizootias (Organização Mundial de Saúde Animal)
SVO	Serviço Veterinário Oficial
PBI	Produto Interno Bruto

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Distribuição dos grupos utilizados no experimento, infecção experimental com BTV-4 de acordo com as diluições e doses infectantes.....	39
Quadro 2: Classificação dos embriões e estruturas em relação a qualidade, segundo recomendações da IETS(1999).....	40
Quadro 3: Preparo da mistura de reagentes para RT-qPCR para BTV e volume do RNA e controles.....	42
Quadro 4:Ciclo de amplificação para BTV na RT-qPCR.....	43
Quadro 5: Interpretação dos resultados.....	43
Quadro 6: Número/porcentagem de estruturas contabilizadas durante a PIVE do experimento dos grupos 39 ao 47, e classificação destas em D8.....	47
Quadro 7: Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR para BTV-4.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Classificação/porcentagem a partir de zigotos cultivados (CIV), em estruturas clivadas (CLIV) e diferentes estágios de desenvolvimento, dos grupos 39 ao 47.....49
- Gráfico 2: Porcentual de embriões viáveis e estruturas de descarte, dos grupos 39 ao 47.....50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das diluições seriadas utilizadas e doses teciduais infectantes respectivas às diluições BTV-4 com título 10^5	35
Figura 2: Etapas do processo da PIVE e as amostras colhidas em cada etapa, de acordo com o dia do experimento (D0 ao D8).....	38
Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento de embrião bovino, demonstrando suas diferentes fases (zigoto, mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto eclodido e blastocisto expandido).....	40
Figura 4: G39 BTV controle D6_40x grau 1.....	41
Figura 5: G39 BTV controle D6_40x.grau 2.....	41
Figura 6: G39 BTV controle D6_40x.grau 3.....	41
Figura 7: Embriões de grau 3, em D8, na diluição 10^{-8}	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados de RT-qPCR das diferentes diluições de BTV-4 extraídos por TRIZOL [®]	52
Tabela 2: Resultados de RT-qPCR das diferentes diluições de BTV-4 extraídos por BEADS magnéticas.....	53
Tabela 3: Resultado da RT-qPCR nos embriões viáveis com ZP íntegra, os grupos experimentais foram subdivididos em lavados com e lavados sem tripsina, preconizadas pelo IETS.....	56
Tabela 4: Desenvolvimento de embriões a partir de oócitos expostos ao sorotipo 4 do BTV durante o processo de maturação.....	58

SUMÁRIO

Resumo	VIII
Abstract.....	IX
Lista de Abreviaturas	X
Lista de siglas.....	XI
Lista de símbolos.....	XII
Lista de quadros.....	XIII
Lista de gráficos.....	XIV
Lista de figuras	XV
Lista de tabelas.....	XVI
Sumário	XVII
1. Introdução	19
2. Objetivos.....	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. Revisão de literatura	23
3.1. Epidemiologia.....	24
3.2. Sinais clínicos.....	25
3.3. Etiologia	29
3.4. Transmissão.....	29
3.5. Patogenia	30
3.6. Controle	30
3.7. Diagnóstico.....	31
4. Material e métodos	33
4.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	34
4.1.1. Obtenção dos oócitos.....	34
4.1.2. Seleção dos oócitos.....	34
4.1.3. Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	34
4.1.4. Exposição dos oócitos ao vírus da língua azul	35
4.1.5. Fertilização <i>in vitro</i> dos oócitos bovinos.....	35
4.1.6. Cultivo <i>in vitro</i>	36

4.1.7. Amostras colhidas para pesquisa do BTV-4 durante a PIVE	38
4.1.8. Avaliação da morfologia e viabilidade dos embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> expostos ao BTV	39
4.2. Análise por PCR.....	41
4.2.1. Extração do material genético	41
4.2.2. Oligonucleotídeos	41
4.2.3. Amplificação	42
4.2.4. Condições de reação	44
4.3. Análise estatística	44
5. Resultados.....	45
5.1. Avaliação morfológica durante a PIVE, subgrupos 39-47	45
5.2. Avaliação da viabilidade de embriões bovinos PIVE	46
5.3. RT- PCR	50
5.3.1. Amplificação	50
5.3.2. RT-qPCR	50
5.4. Análise estatística	58
6. Discussão	59
7. Conclusões.....	62
8. Referência bibliográficas	63

1. INTRODUÇÃO

O setor agropecuário brasileiro é de grande importância para a economia. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2019), o Brasil somou R\$ 597,22 bilhões em 2018, acima dos R\$ 551,41 bilhões atingidos em 2017. Com isso, o Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária elevou para 8,7% sua participação no PIB total brasileiro. Atualmente o Brasil exporta seus produtos de origem animal para mais de 180 países, destacando-se como um dos maiores exportadores mundiais de carne bovina, suína e de frango. Visando conquistar cada vez mais os mercados consumidores é necessário assegurar a sanidade animal, a idoneidade dos insumos e dos serviços utilizados na agropecuária e a identidade e segurança higiênico-sanitária desses produtos.

O Bluetongue (BT) é uma enfermidade infecciosa de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos (sêmen e embriões, bastante comercializados devido ao seu alto valor genético). A doença é considerada enzoótica em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo, sendo que em muitas regiões a enfermidade é rara ou inexistente.

A pecuária tem crescido muito nos últimos anos e a biotecnologia possibilitou que isso fosse possível. Várias técnicas como a inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões, superovulação, transferência de embriões e fertilização *in vitro* tem promovido o desenvolvimento científico e tecnológico em todo o mundo, tornando o Brasil uma referência na produção *in vitro* de embriões (VIEIRA, 2012).

A PIV, sigla utilizada para produção *in vitro* de embriões, é uma técnica fundamental para o aumento dos descendentes de fêmeas bovinas que possuem um potencial genético superior as demais, além de maior aproveitamento de partidas de sêmen e oócitos de bovinos e tem sido utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo. A PIV envolve as etapas de coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (MELLO et al., 2016). Essas etapas necessitam de meios que forneçam substratos adequados para o pleno desenvolvimento do embrião, até que este seja implantado em uma receptora. A obtenção dos oócitos pode ser realizada por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) ou aspiração direta de ovário de abatedouro (BRITO, 2017). A PIV possui algumas limitações na produção animal, principalmente em bovinos, devido ao alto custo de infraestrutura e mão de obra especializada, além de inconsistência nas taxas de mórulas e blastocistos.

O trabalho realizado pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) em conjunto com o Escritório Internacional de Epizootias (OIE) baseados em dados

experimentais e de campo, consideram que existem riscos diferenciados de transmissão de doença em relação a animais vivos, sêmen e embriões, sendo fundamentais as medidas sanitárias para que essas doenças não sejam disseminadas (PARRA, 2008).

Uma das medidas para garantir a condição sanitária de embriões produzidos *in vitro* é a obtenção dos oócitos e sêmen de touros certificados como livre de patógenos, para minimizar o risco de transmissão de agentes por essa via. Na exportação, segundo INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 36, DE 27 DE OUTUBRO DE 2015, o sêmen deve apresentar resultados negativos para diarreia viral bovina (BVD), ovócitos infecciosa bovina (IBR), língua azul (BTV) e febre do Vale Rift. E touros residentes nos centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) devem ser submetidos a testes regulares para doenças como brucelose, tuberculose, campilobacteriose genital bovina e tricomonose (MAPA, 2015).

A inseminação artificial já foi associada a doenças como Brucelose (GALUPPO, 2006), Diarreia Viral Bovina (PINTO, 2015), e Leucose Enzoótica Bovina (SANTOS, 2018).

Em maio de 2001, foi feita a 1ª notificação pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) (OIE, 2001) de um foco de Língua Azul no sul do Brasil, no Estado do Paraná, município de Campo Tenente, onde bovinos, caprinos e ovinos foram acometidos, sendo observados casos clínicos apenas em caprinos e ovinos.

A identificação da circulação do BTV na América, Ásia e Europa serve de alerta para os serviços sanitários dos países incluir essa doença nos protocolos para exportação de animais vivos, sêmen e embriões, para não introduzir novos sorotipos nos rebanhos e, conseqüentemente, grandes prejuízos econômicos. Em decorrência disso, a OIE classificou a língua azul como uma doença de notificação obrigatória (ACEVEDO et al., 2016).

A primeira descrição da doença foi realizada na África do Sul em 1876 e foi denominada “Epizootia Catarral das Ovelhas” em 1881 por Hurtcheon, o cirurgião veterinário já relatava sobre a doença desde 1880 (Hurtcheon, 1902). Em 1906, Theiler demonstrou que a doença era causada por um vírus, injetando-se sangue filtrado de ovelhas doentes em ovelhas susceptíveis, resultando no aparecimento da doença. Tradicionalmente a doença era aceita como restrita a ovinos até 1943, o primeiro surto ocorreu na cidade de Chipre, onde uma cepa altamente virulenta causou morte em um grande número de ovinos (SMITH, 2006). Antes da confirmação do surto de Chipre na década de 40, imaginava-se que o BTV estava restrito ao continente africano.

O acordo sobre Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS) da Organização Mundial do Comércio (OMC) estabelece regras que visam garantir a segurança alimentar e a sanidade dos animais e das plantas. Uma das maiores dificuldades em sua execução é estabelecer padrões que garantam a sanidade animal e a saúde pública de um país e ao mesmo tempo evitar que as medidas adotadas sejam formas de proteger os produtores desse país (Organização Mundial do Comércio-OMC, 1994). Em decorrência da grande importância do vírus da Língua Azul e o grande impacto econômico que pode causar, o presente estudo validou protocolo sanitário para certificação de embriões livres de BTV produzidos *in vitro*, importante para o comércio seguro desses produtos.

O resultado desse trabalho irá beneficiar diretamente o setor pecuário do país, com a disponibilização ao Serviço de Defesa Sanitária brasileiro de protocolo validado para facilitar a negociação dos acordos comerciais entre os países, propiciando abertura de mercados, além de conquista da credibilidade e confiança.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar os possíveis efeitos do vírus da língua azul (BTV) no desenvolvimento e viabilidade do embrião produzido *in vitro* (PIVE) e estabelecer qual será a melhor etapa de coleta de amostras durante o processo de PIVE que garanta a sanidade do embrião e possibilite a certificação de livre de língua azul.

2.2. ESPECÍFICOS

- Testar a presença do vírus da língua azul em todos os insumos de origem animal envolvidos no processo PIVE (albumina bovina, soro fetal bovino e sêmen), utilizados para a produção de embriões bovinos *in vitro*.
- Infectar oócitos em maturação com diferentes doses infectantes do BTV e utilizar esses oócitos para a produção de embriões *in vitro*.
- Avaliar microscopicamente os efeitos do BTV nos embriões produzidos *in vitro*.
- Detectar a presença do vírus em amostras colhidas em diferentes etapas do processo de fertilização *in vitro*, após as lavagens preconizadas pela IETS.
- Propor protocolo sanitário para certificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, livres de BTV.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O agronegócio brasileiro tem como destaque no cenário mundial a bovinocultura, em torno de mais de 214,69 milhões de bovinos, sendo abatido 44,23 milhões por ano (ABIEC, 2019). Além disso, desde 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. O valor bruto da produção bovina das cadeias de carne e de leite é estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os Estados brasileiros, evidenciando a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (MAPA, 2016). Além das exportações de carne, há também exportação de oócitos, sêmen e embriões *in vitro* e *in vivo*. Até agosto de 2016, não havia acordo com os países da América do Sul para o comércio de embriões bovinos *in vitro*, sendo estes identificados como um mercado de grande interesse do setor. Os acordos sanitários foram firmados com os Serviços Veterinários do Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina.

A Colômbia é o país mais recente a fechar o acordo com o Brasil para iniciar a exportação de embriões, sendo que o mercado colombiano é o principal importador de genética bovina brasileira para melhoramento dos rebanhos de corte (MAPA, 2017). Nas últimas décadas, o aprimoramento e a difusão das técnicas de inseminação artificial (IA) em bovinos, dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda de sistemas de produção mais eficientes, intensificaram o estudo e o desenvolvimento de novas biotecnologias: transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIVE) - criopreservação, micromanipulação e sexagem. Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução animal, a IA é a mais antiga, simples e de grande impacto. É uma técnica eficaz, econômica, utilizada para melhoramento genético. A TE em bovinos, trata-se de uma técnica também econômica e prática, utilizada para aumentar as taxas reprodutivas de fêmeas de alto valor genético, produzir um número de descendentes muito maior que o fisiológico, além de acelerar o processo de seleção animal. A PIVE também é uma biotécnica utilizada para melhoramento genético através da multiplicação. O Brasil ocupa uma posição de destaque, com grande reconhecimento internacional em relação à PIVE. Atualmente é o método de eleição para a multiplicação de animais de interesse econômico no Brasil, e devido à importância destas técnicas, elas devem seguir requisitos básicos e atender as condições sanitárias necessárias (NEVES et al., 2010). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura o Brasil tem expansão de 9,3% na exportação de carne bovina (FAO, 2020). Todos esses dados indicam grande crescimento na bovinocultura, e para isso novas tecnologias devem ser alcançadas para

aumentar a produção, visando principalmente o controle sanitário, que é uma grande preocupação no setor.

Uma das maiores limitações para a eficiência reprodutiva refere-se à sanidade animal, uma vez que, se não forem tomados os devidos cuidados nas técnicas de reprodução, estas podem facilitar a transmissão de diversas doenças infecciosas, principalmente as de causas virais e bacterianas. Caso os problemas reprodutivos, caracterizados como infertilidade, mortalidade embrionária/fetal, repetição de cio, abortamentos, natimortalidade, entre outros, fossem diagnosticados quanto à sua origem, e se fossem adotadas rigorosas medidas de controle e profilaxia, os prejuízos econômicos poderiam ser evitados ou menores. Porém, isto não é feito de forma rotineira (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006).

Baseado em evidências sorológicas, sabe-se que o BTV circula pela América do Sul. O vírus foi identificado por RT-qPCR e por isolamento viral somente no Brasil, na Argentina e também na Guiana Francesa e apesar da importância da LA, ainda pouco se sabe sobre a distribuição dos sorotipos do BTV. (KAWANAMI,2016).

A transferência de embriões é considerada um método seguro, sob o ponto de vista de transmissão de agentes patogênicos quando comparada ao trânsito de matrizes e reprodutores vivos. Entretanto, o risco sanitário está presente e devem ser estudados os pontos críticos e impedir a transmissão de doenças por meio do embrião (NEVES et al., 2010).

Para que doenças infecciosas sejam transmitidas pela TE, o agente infeccioso deve estar presente nas células embrionárias, associados com a zona pelúcida e/ou nos fluidos que envolvem o embrião. Na PIVE deve ser levado em conta cuidados desde a obtenção dos oócitos e do sêmen, até a transferência dos embriões, passando inclusive pela produção e manipulação dos meios de cultura utilizados, e seus componentes, visto que a maioria deles tem componentes de origem animal. A infecção pode ocorrer durante a fase de maturação do oócito, antes ou durante a fertilização (WRATHALL; SUTMÖLLER, 2003; GALUPPO, 2006)

3.1. Epidemiologia

A epidemiologia da língua azul está relacionada à presença de vetores transmissores, dípteros do gênero *Culicoides*. O reconhecimento de espécies de *Culicoides* nos diferentes ecossistemas do mundo é um fator crítico para o entendimento da epidemiologia dessa doença (MELLOR, 1996). As condições climáticas como alta temperatura e umidade são requeridas para a eclosão dos ovos e para o desenvolvimento das larvas, sendo os ovos depositados em

ambientes alagados e com alto grau de matéria orgânica (MELLOR, 1996; LOBATO, 1999; WITTMANN; BAYLIS, 2000).

Os bovinos infectados normalmente não apresentam sinais clínicos, por isso a importância das análises laboratoriais (OIE, 2017).

Todos os ruminantes domésticos e selvagens são susceptíveis pelo vírus da língua azul (VLA)(COSTA et al., 2006).

Em ovinos e cervídeos, a enfermidade é particularmente importante, podendo atingir 70% de mortalidade em ovinos e 100% em cervídeos (OIE, 2013). Em caprinos e bovinos, a infecção pelo BTV raramente apresenta sinais clínicos da doença, (geralmente em torno de 5%) e a taxa de mortalidade é muito baixa ou nula (LOBATO, 1999). No entanto, este segundo grupo de animais é muito importante no ciclo epidemiológico da doença, pois servem como reservatório de vírus. A doença causa abortos em vacas, queda de desempenho reprodutivo, perda de condição corporal e redução na produção de leite (EMBRAPA, 2006). Diversas lacunas existem em relação à epidemiologia do BTV, pois a doença apresenta caráter sazonal em muitas regiões, dependendo da complexa interação entre hospedeiro, vetores, clima, estirpes virais e suas inter-relações.

O clima é o principal fator de risco, já que os Culicídeos requerem calor e umidade para se reproduzirem, bem como clima úmido quente e calmo para se alimentarem. Existem cerca de 1500 espécies de Culicídeos já mundialmente identificadas. A identificação de Culicídeos da fauna brasileira tem sido realizada nos seguintes Estados brasileiros: Minas Gerais (LAENDER et al., 2004), Acre (FELIPPE-BAUER et al., 2000), Amapá (SARAIVA, 2011), Rio de Janeiro (SILVA et al., 2001), Amazonas (FELIPPE-BAUER et al., 2008), e Maranhão (BARROS et al., 2007). Entretanto, a fauna de Culicídeos no Brasil ainda é pouco conhecida, sendo necessários outros estudos para identificar as espécies competentes nos focos epidemiológicos da infecção pelo BTV.

3.2. Sinais clínicos

Em zonas endêmicas a infecção dos ruminantes pelo BTV é comum e a doença clínica é rara. No Brasil não há evidências que os bovinos infectados manifestam sinais clínicos para essa doença. Em zonas epidêmicas e incursivas, exemplo a Europa, há relatos de repetição de cio, abortamento, nascimento de bezerros com anomalias teratogênicas, fetos mumificados, nascimento de crias fracas e infertilidade em vacas causados pelo BTV.

A língua azul (LA), também conhecida por “bluetongue” (BT) está incluída na lista da OIE (2017) de enfermidades infecciosas, cujas consequências socioeconômicas são graves e de

importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos, gerando embargos e restrições por países importadores, além das perdas diretas em rebanhos afetados.

Os sinais clínicos da doença variam desde subclínico a severos casos agudos. Nos ovinos e em alguns cervídeos, a BT pode se apresentar como uma doença severa, caracterizada por lesões inflamatórias em tecidos vascularizados como mucosas e bandas coronárias. Caprinos e na maioria dos ruminantes selvagens é geralmente caracterizada por uma viremia prolongada e com manifestações clínicas da doença branda ou assintomática. Os animais infectados podem apresentar manqueira, febre, focinho com secreções ou crostas, salivação excessiva, hiperemia ou cianose nos lábios, língua ou focinho, queda na produção de leite, lacrimejamento, hiperemia podal, edema nas patas, úlceras podais, pelos secos, perda de pelos, feridas nas tetas, olhos inflamados, tetas hiperêmicas, olhos manchados ou ulcerados, edema na língua, desprendimento dos cascos, diarreia crônica. Em bovinos além de aborto, a infecção em vacas prenhes em início de gestação pode levar à má formação congênita, caracterizada por hidrocefalia, microcefalia, cegueira e deformações da mandíbula (GIBBS; GREINER, 1994; MELLOR, 1996; LAENDER, 2002; BREARD et al., 2004).

Em ovinos, os principais sinais clínicos observados são: edema da face, febre, corrimento nasal muco-purulento ou sanguinolento, crostas, salivação, hiperemia da mucosa oral e edema da língua, focinho, lábios e mucosa oral, e em casos severos a língua fica cianótica. A hiperemia pode se estender a outras partes do corpo, particularmente virilha, axila e períneo. Hemorragia na porção coronária dos cascos é comum e está associada à degeneração muscular, levando à claudicação. Posteriormente, observam-se vesículas na boca e lábios, erosão e ulceração extensivas do trato gastrointestinal, localizadas principalmente nas faces laterais da língua, cianose da mucosa oral e nasal, diarreia que pode ser hemorrágica, dispneia, perda de lã, inflamação do rodete coronário, claudicação, degeneração da musculatura esquelética, anorexia, perda de peso, problemas reprodutivos e alterações na produção de lã, dentre outros (RADOSTITS et al., 2002). Adicionalmente, em ovinos afecções na boca, casco e tetas podem ser facilmente confundidas com outras doenças, tais como febre aftosa, estomatite vesicular, dermatite pustular contagiosa, *Poxvirus*, doença da fronteira, podridão das patas e actinobacilose, sendo, portanto o diagnóstico diferencial de fundamental importância (BRODIE et al., 1998).

A ocorrência da doença clínica tem sido demonstrada, principalmente, nos ovinos e cervídeos (COSTA et al., 2006), podendo apresentar altos índices de mortalidade e diminuição na produção, resultando em prejuízos econômicos significativos (CEBRA, 2004,p.430; EMBRAPA, 2006). O papel dos dípteros na epidemiologia da LA é tão importante que a doença

é impactada por fatores ecológicos que favorecem a sobrevivência dos insetos vetores como temperatura, umidade e características de solo. Historicamente, a distribuição global do vírus se situa entre as latitudes de aproximadamente 53°N e 34°S incluindo a recente expansão (desde 2006) mais ao norte da Europa atingindo todas as áreas com expressiva população de ruminantes (OIE, 2013). Mundialmente, o BTV está presente nas áreas entre as latitudes 40°N e 35°S, embora em algumas partes do oeste da América do Norte e China possa ser encontrado em áreas localizadas a 50°N (KIRKLAND et al., 2002). São reconhecidas as zonas endêmica, epidêmica e incursiva, assim divididas conforme a epidemiologia da doença. Na zona endêmica a infecção dos ruminantes pelo BTV é comum e a doença clínica é incomum, ocorrendo quando novas cepas ou quando ruminantes susceptíveis (trazidos de locais onde a infecção não é comum) são introduzidos na região. Na zona epidêmica a infecção e a doença clínica ocorrem em alguns períodos do ano, tendo um caráter focal, com surtos ocorrendo quando as condições climáticas favorecem a disseminação do vetor além de suas fronteiras comuns e ruminantes susceptíveis são infectados. As condições climáticas na zona incursiva não favorecem a reprodução dos Culicídeos, impedindo a perpetuação do vírus por longos períodos (EMBRAPA, 2006). Desta forma, os surtos que ocorrem nessas regiões estão relacionados geralmente ao carreamento do vetor infectado por meio do vento e subsequente reprodução durante o verão, desaparecendo no outono e inverno (GIBBS; GREINER, 1994; RADOSTIS et al. 2002; OSBURN, 2004). Surtos da doença ocorrem tipicamente quando ovinos susceptíveis são introduzidos em área endêmica ou quando mosquitos carregam o vírus de uma região endêmica para áreas adjacentes contendo populações de ovinos susceptíveis (EMBRAPA, 2006). Segundo Venditti (2009), na França a propagação do VLA-8 foi notificada em mais de 15.253 animais, apenas no sul do país a doença não foi detectada. A LA também reapareceu em 2007, na Bélgica (6.661 casos), Alemanha (11.487 casos) e nos Países Baixos (5.798 casos), e se propagou para Luxemburgo (1.315 casos), Dinamarca (01 caso), Suíça (05 casos) e Reino Unido (65 casos). No ano de 2007, um número significativo de animais infectados com VLA-8 de origem africana, foi importado para a Itália. Em janeiro de 2008 animais infectados foram detectados na Espanha e também na Irlanda do Norte, e o surto foi rapidamente contido pelo abate de todos os infectados e seus contactantes (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). Em 2008, a Austrália notificou sete casos (7/1024) de LA em bovinos sem manifestação clínica. Esse foi o primeiro relato de VLA-2 no país, sendo que as estirpes 1, 3, 7, 9, 15, 16, 20, 21 e 23 já haviam sido isoladas em bovinos na região Norte (OIE, 2013). Provavelmente como consequência das mudanças climáticas, tem se observado a detecção de novas estirpes do BTV nos Estados Unidos, em novas regiões, sendo estas estirpes de ocorrência detectada

primeiramente na Europa (JOHNSON et al., 2006). Nas Américas já foram isolados as estirpes 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14 e 17. Na América do Norte e regiões Caribenhas foram isolados as estirpes 2,10,11,13 e 17 (BARBER, 1979; GIBBS et al., 1983). Na América Central a estirpe predominante é o 1, mas já foram identificadas as estirpes 2, 3, 4, 6, 8,12, 14 e 17 (MO et al., 1994). Na América do Sul, o vírus já foi identificado no Peru, Colômbia, Venezuela, Argentina, Guiana, Suriname, Chile e Brasil, tendo sido isolado apenas no Brasil e Argentina. A primeira estirpe do BTV isolada no Brasil foi em 1980, onde oito de um total de 60 bovinos exportados do Brasil para os Estados Unidos desenvolveram anticorpos contra o VLA durante o período de quarentena e em um dos animais isolou-se a estirpe 4 (GROOCOOCK; CAMPBELL, 1982). A segunda estirpe isolada no Brasil foi o BTV-12 (CLAVIJO et al., 2000), de ovinos durante um surto de LA no Estado do Paraná, envolvendo 130 ovinos, quatro caprinos e 70 bovinos. Este mesmo sorotipo foi isolado em dois novos surtos também de ovinos, ocorridos em 2009, um em Viamão e o outro em Glorinha, ambos municípios do Estado do Rio Grande do Sul (ANTONIASSI et al., 2010), também no Brasil foi isolada a estirpe do BTV-4 em ovinos e caprinos com sinais clínicos da doença, provenientes dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo, respectivamente (LIMA, 2013). Na Argentina foi isolado apenas o BTV-4, de bovinos (LEGISA et al., 2013). Grande parte do território brasileiro encontra-se inserido dentro da zona enzoótica (GIBBS; GREINER,1994). Segundo Lobato (1999), a primeira referência de LA no Brasil data de 1978, quando foi reportada à Organização Mundial de Saúde Animal a primeira evidência sorológica da ocorrência dessa doença no país. Esse relato representou também a primeira evidência do BTV na América do Sul (LAGER, 2004). Diversos estudos sorológicos demonstram alta frequência da ocorrência de LA no Brasil (LOBATO, 2001; NOGUEIRA et al., 2008; VENDITTI, 2009; BERNARDES, 2011), entretanto são poucos os relatos de casos clínicos da doença no campo indicando que a enfermidade espalha-se pelos rebanhos do país, de forma silenciosa. As condições de temperatura e umidade em todo o Brasil favorecem a multiplicação e manutenção dos vetores, facilitando a endemicidade da doença. O LA está incluída na lista da OIE (2020) de enfermidades infecciosas cujas consequências socioeconômicas são graves e de importância sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos, gerando embargos e restrições por países importadores, além das perdas diretas em rebanhos afetados. Para movimentação de animais, que compõem o MERCOSUL (Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Venezuela), é obrigatória análise para pesquisa do BTV ou de anticorpos dos animais ou de seus produtos. O diagnóstico definitivo da LA só pode ser obtido por análise laboratorial, diretamente por meio de detecção do agente viral, por métodos moleculares, ou indiretamente, por meio de detecção de anticorpos específicos (OIE, 2020),

uma vez que a resposta sorológica em ruminantes aparece de 7 a 14 dias após infecção e geralmente persiste por toda a vida do animal.

3.3. Etiologia

O BTV pertence à família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, com mais de 27 sorotipos descritos, possui fita dupla de RNA. É transmitido por Culicídeos (ICTV, 2019).

O BTV possui proteínas imunogênicas, das 7 proteínas estruturais, a VP2 é a principal a estimular a resposta imune protetora. A partícula viral não é envelopada e possui aproximadamente 70nm de diâmetro, genoma de ácido ribonucleico de fita dupla com 10 segmentos, circundado por 3 camadas de proteínas concêntricas que formam o capsídeo. A camada interna é constituída pela proteína viral “3”(VP3) e contém três enzimas de superfície interna (VP1,VP4 e VP6). A camada média é composta por VP7 e a camada externa os grupos antigênicos VP2 e VP5 (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008; PINHEIRO et.al., 2013).

3.4. Transmissão

No Brasil, são conhecidas 75 espécies de culicídeos, e por serem pouco estudadas, não se sabe sobre a competência destes em transmitir o vírus, quando comparadas com outros grupos de insetos vetores, sendo poucas as Unidades Federativas com registros taxonômicos (BARROS et al., 2007; FELIPPE-BAUER et al., 2008). A principal forma de transmissão do BTV é através de picadas de fêmeas infectadas dos mosquitos do gênero Culicídeos (MELLOR et al., 2000), estes se infectam com o BTV quando ingerem sangue de um hospedeiro em período de viremia. A alimentação dos Culicoides ocorre no período noturno e as temperaturas ótimas para a atividade estão entre 13 e 35°C, sendo que elevados índices de temperatura e umidade são adequados para multiplicação do vetor, pois diminuem os tempos necessários para a conclusão de um ciclo ovariano, diminui o tempo de eclosão dos ovos e também de desenvolvimento das larvas (WITTMANN; BAYLIS,2000).

As condições climáticas brasileiras adequadas ao desenvolvimento dos vetores, e à alta frequência de bovinos e ovinos soropositivos para o BTV, indicam que a doença é endêmica em todas as regiões. Entretanto, são raros os relatos de manifestação clínica em ovinos e nunca relatado em bovinos, apesar de frequente detecção de animais virêmicos, tanto em ovinos, quanto em bovinos. Há poucos estudos de transmissão via transplacentária, pelo sêmen e embriões. A transmissão venérea do BTV foi relatada em vacas susceptíveis contaminadas por sêmen infectado. Entretanto, a presença do vírus no sêmen de touros é restrita ao período

virêmico, coincidindo normalmente com o pico da viremia (OSBURN, 1994; WRATHALL et al., 2006). A presença do vírus no sêmen bovino alertou para a possibilidade da transmissão venérea ser um fator epidemiologicamente importante para a doença, pois dessa forma o BTV se manteria de uma estação do vetor para a outra “overwintering”. Este fato foi o principal norteador das imposições das barreiras internacionais para a comercialização de animais e seus germoplasmas, com relação à LA (WRATHALL et al., 2006).

3.5. Patogenia

A patogenia da infecção pelo VLA é similar em ovinos e bovinos e muito provavelmente, em todas as espécies de ruminantes (LAENDER, 2002). Entretanto, existem diferenças na gravidade da doença em relação as estirpes e linhagens virais, espécie, raça, condição imunológica e idade do animal infectado.

3.6. Controle

O controle é baseado em quarentena, vacinação dos hospedeiros vertebrados, especialmente dos bovinos, controle do vetor, monitoramento e medidas de restrição de comércio. A vacinação já é bastante utilizada em alguns países como medida de controle, utilizando vacinas atenuadas, inativadas, ou com proteínas recombinantes (BREARD et al., 2004; SAVINI et al., 2008). Em alguns países estas vacinas estão disponíveis comercialmente, entretanto, sua atividade protetora é sorotipo-específica, ou seja, em regiões/países onde múltiplos sorotipos estão presentes, as vacinas, para serem eficazes, precisam conter os sorotipos identificados (SCHWARTZ-CORNIL et al., 2008). O passo fundamental para impedir a entrada do vírus em um país livre da LA é identificar quais sorotipos existem no país exportador e se existem Culicídeos competentes para esses sorotipos no país importador. Em regiões onde a LA é endêmica, a possibilidade de erradicação é praticamente nula, por este motivo, as medidas de controle baseiam-se na ação sobre o vetor, na vacinação e nas barreiras criadas para evitar a movimentação de animais e seus subprodutos (KONRAD et al., 2003). Na América do Sul, o controle da LA se dá por vigilância e notificação obrigatória da doença e controle de fronteiras (EMBRAPA,2006).

As principais perdas econômicas em decorrência da infecção pelo BTV em ovinos incluem considerada queda da produção de lã, carne e leite, diminuição da taxa de concepção além de abortos e malformações, distúrbios respiratórios e locomotores, associação de outras

doenças devido à imunossupressão, em alguns casos podendo ocorrer alta mortalidade (SINGER et al., 2001; MACLACHALAN et al., 2009).

A restrição internacional de movimentação animal e seus germoplasmas é outra causa importante de perda econômica relacionada ao BTV (BREARD et al., 2004; ARADAIB et al., 2005). As estimativas de perdas econômicas em decorrência da infecção pelo BTV variam de acordo com a espécie de ruminante e raça acometida, e também conforme o estado imunitário do rebanho, a virulência das estirpes virais, sorogrupos, região do país e época do ano. O comércio de animais e de material genético é imprescindível para manutenção ou aumento da produtividade pecuária. Entretanto, decisões envolvendo importações ou exportações são complicadas, pois envolvem acordos sanitários que podem oferecer riscos, mesmo que mínimos. Geralmente os países livres ou conhecedores da dinâmica da infecção pelo BTV restringem as exportações brasileiras com base em barreiras econômicas e sanitárias, proibindo a importação de quaisquer ruminantes de países onde a doença ocorra, visando desta forma evitar a introdução da doença ou de novos sorotipos (CARVALHO et al., 2007;p.416; OIE, 2013).

A comercialização de sêmen bovino para áreas de baixo risco de ocorrência de LA só é permitida após certificação de livre de BTV em sangue ou sêmen dos touros doadores (OIE, 2013). Por isso, medidas baseadas no conhecimento da epidemiologia molecular tornam-se imprescindíveis para vigilância epidemiológica do LA, no Brasil foram diagnosticados sorotipos de BTV-4, BTV-12, BTV-3, BTV- 14, BTV-18, BTV-19, BTV-22, BTV-17 (Silva, 2017) .

3.7. Diagnóstico

A reação em cadeia da polimerase tem sido uma ferramenta útil para o diagnóstico de BTV. As técnicas de PCR podem ser utilizadas não só para detectar a presença de ácido nucleico viral, mas também para detectar o tipo de *Orbivirus* e fornecer informações sobre o sorotipo e a possível fonte geográfica do BTV (LOBÃO et al., 2014). O diagnóstico precoce, mais sensível, específico e automatizado torna-se necessário e importante como recurso para evitar a propagação da doença, e evitar gastos com tratamentos, focos epidemiológicos e medidas de controle, bem como restrições econômicas. Além disso, permite análises, em curto período de tempo, para certificação de grande número de animais e produtos de origem animal, como sêmen e embriões destinados ao comércio nacional e internacional. Considerando a importância da doença e carência de estudos que contemplem a epidemiologia das estirpes do BTV

existentes no Brasil é de extrema importância para a caracterização molecular e genética do vírus, por meio de sequenciamento e análise filogenética para avaliar a evolução dos vírus isolados no Brasil nas últimas décadas (Coleção de amostras mantida no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico).

Os estudos filogenéticos são fundamentais para avaliar a situação epidemiológica nas regiões do país, além de contribuir para os trabalhos futuros para seleção de cepas vacinais e se necessário imunização contra as estirpes circulantes. O conhecimento contribui com a tomada de decisão para o controle sanitário, impedindo os riscos de introdução de novos sorotipos, minimizando o impacto negativo da doença e facilitando o intercâmbio de produtos de origem animal. Além disso permitirá o desenvolvimento e aprimoramento de novas ferramentas de diagnóstico, desenvolvimento de reagentes (sondas e “primers”) utilizados nos métodos diagnósticos moleculares, capazes de identificar as estirpes atuais, permitindo o estudo da biodiversidade da evolução viral e, assim, acompanhar os eventos de transmissão e fontes de infecção. Estudos sobre a doença são essenciais, pois visam fornecer subsídios para a vigilância sanitária (situação epidemiológica e caracterização dos sorotipos existentes), entretanto, é fundamental desenvolver uma avaliação dos fatores de risco para o controle epidemiológico da LA, sendo fundamental correlacionar a presença do vetor competente próximo as regiões em que há propriedades com animais positivos para LA, com as características ambientais (umidade, temperatura, pluviometria) e a prevalência da enfermidade, e assim compreender o ciclo biológico do vetor, da população e da dinâmica do vetor nestas regiões. Por se tratar de doença endêmica no Brasil, causada por muitos sorotipos, é fundamental estabelecer um protocolo para certificação de embriões livres de BTV para disponibilizar às autoridades sanitárias, facilitando abertura de mercado internacional de embriões PIVE. Este protocolo é necessário para dar as garantias sanitárias exigidas pelos usuários desse setor e contribuirá significativamente no aumento da produtividade de embriões PIVE.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada seguindo os princípios éticos em experimentação animal adotados pela sociedade Brasileira da Ciência em animais de laboratório (SBCAL/COBEA) e que foi aprovado pelo Comitê de Bioética do Instituto Biológico, sob número 141/15 - renovado.



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 141/15 sobre o Projeto: “Padronização e validação de PCR em tempo real para certificação sanitária de embriões de bovinos produzidos *in vitro*”, sob a responsabilidade de Liria Hiromi Okuda e Edviges Maristela Pituco, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo aprovado pela CEUA-IB em 24 de março de 2015 e renovado em 27 de março de 2019.

São Paulo, 27 de março de 2019


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CEUA-IB

4.1. PRODUÇÃO “*in vitro*” DE EMBRIÕES (PIVE)

4.1.1. Obtenção dos oócitos

Os oócitos utilizados no experimento foram obtidos de vacas de abatedouro, localizado no interior do Estado de São Paulo, na cidade de Bariri. Os ovários foram removidos cerca de 20 minutos após a morte do animal, no momento da evisceração e depositados em frascos isotérmicos. Os folículos foram aspirados com seringa de 10 mL e agulha calibre 18G, contendo 0,5 mL de solução de PBS. O fluido folicular aspirado foi transferido para tubo cônico de polipropileno de 50 mL e decantado por 15 min para a separação dos oócitos.

Ainda no abatedouro, o sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro, e visualizado em microscópio estereoscópico, com aumento de 20 a 80 vezes para proceder à seleção dos oócitos.

4.1.2. Seleção dos oócitos

Foram selecionados para a maturação, por volta de 1000 oócitos de *cumulus* compacto, com pelo menos três a quatro camadas de células do cumulus, e ooplasma de granulação uniforme (Grau 1, 2 e 3), estes ficaram subdivididos em 9 grupos experimentais, sendo um controle, contendo em média 100 estruturas por grupo. Cada grupo foi subdividido em 4 gotas, contendo em média 25 oócitos (subgrupos/oócitos), com a finalidade de verificação da repetição do resultado.

4.1.3. Maturação “*in vitro*” dos oócitos

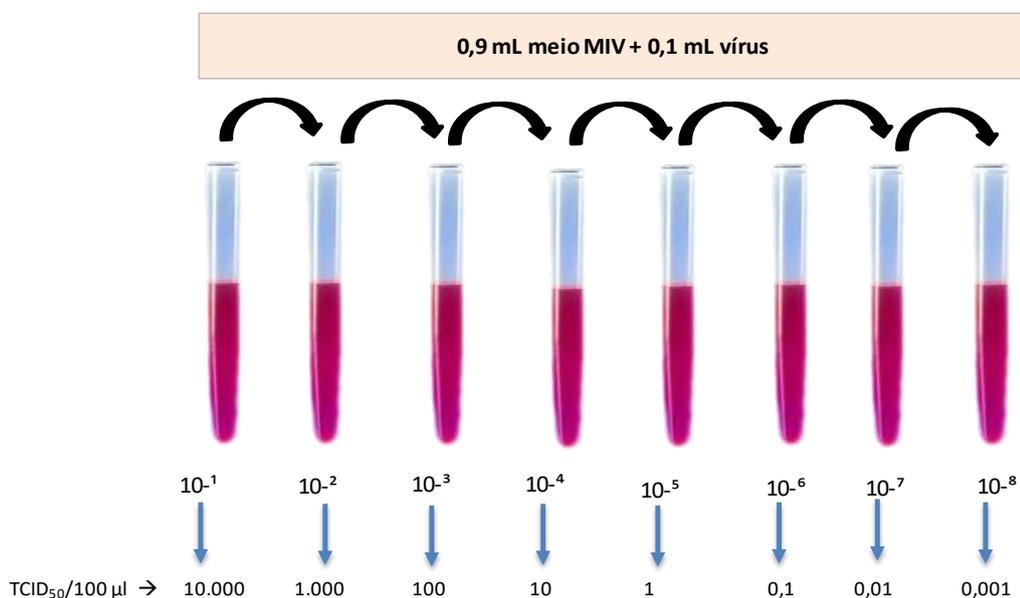
Depois de selecionados, os oócitos foram encaminhados ao Laboratório de Viroses de Bovídeos em tubos de ensaio contendo meio de maturação. No laboratório, os oócitos foram transferidos para placas de maturação, contendo em média 25 oócitos por microgota de 100 µL de meio MIV contaminado com o BTV (meio de maturação+ diluição viral), cobertas com 4 mL de óleo mineral, aquecidas previamente em incubadora por 1 hora em temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. As placas contendo os oócitos foram incubadas nas mesmas condições anteriores durante 20 à 24h. Ao final do processo de maturação, foram classificados conforme sua morfologia, considerados clivados formando até 4 células ou mais, sendo estes fertilizados, prosseguindo no processo, e os não clivados, sendo coletados para exame.

4.1.4. Exposição dos oócitos ao vírus da língua azul (BTV-4)

O experimento foi identificado como 6, dividido em 09 grupos experimentais numerados de 39 a 47, os oócitos foram expostos ao sorotipo BTV-4 passagem 4ª VERO 15/07/2014, título $10^5/100\mu\text{L}$.

A infecção experimental com BTV-4 foi realizada na fase de maturação oocitária (Dia - 1) com diferentes diluições do vírus em MIV (10^{-1} a 10^{-8}), conforme ilustrado na figura 1 . Em cada experimento foi incluído um grupo controle, ou seja, não infectado.

Figura 1: Representação esquemática das diluições seriadas utilizadas e doses teciduais infectantes respectivas às diluições BTV-4 com título 10^5 .



4.1.5. Fertilização *in vitro* dos oócitos bovinos

A FIV foi realizada após 20 à 24 hs de maturação dos oócitos (D-1), em gotas de 100 µL de meio TALP-FIV. Os oócitos que estavam maturando nas gotas com meio MIV contaminado (grupo experimental infectado) e não contaminado (grupo controle), foram lavados em gotas de 200 µL de meio TL e outra gota de 200 µL de meio FIV, e em seguida transferidos para as gotas de 90 µL com meio FIV, em outra placa (placa FIV), já estabilizadas por no mínimo uma hora, na incubadora. Ao mesmo tempo que os oócitos eram lavados, foram colhidas amostras com os restos celulares juntamente com o meio MIV de cada gota da placa de MIV (amostras identificadas com nº grupo, MIV e nº da gota), para análises de BTV-4 por RT-qPCR.

Após os oócitos serem lavados, a FIV foi realizada (após 20 a 24h de maturação *in vitro*) em gotas de 90 μL de meio FIV, contendo meio TALP com 30 $\mu\text{g/mL}$ de heparina (Sigma H-3149), 18 μM de penicilamina (Sigma P 4875), 10 μM de hipotaurina (Sigma H-1384) e 1,8 μM de epinefrina (Sigma E-4250)], contendo 0,2mM de piruvato de sódio, 83,4 $\mu\text{g/mL}$ de amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA, cobertas com óleo mineral.

O sêmen, congelado em palhetas de 0,5 mL, foi aquecido em água a 35°C por 30seg e preparado por centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma P-4937), de 45 e 90%, a primeira centrifugação foi a 9000 xg por 5 minutos, e após centrifugação removeu-se o sobrenadante deixando apenas o pellet formado, então, adicionou-se 1 mL de meio FIV e submeteu-se a nova centrifugação, a 5000 xg por 3 minutos. Após a segunda centrifugação, diluiu-se o pellet de sêmen com meio FIV de acordo com a quantidade de gotas a serem fecundadas.

A concentração final foi ajustada para 25 x 10⁶ espermatozoides móveis/mL com meio TALP-FIV. Posteriormente, cerca de 8 μL do sêmen diluído foram adicionados às gotas contendo de 20 a 25 oócitos, obtendo-se a concentração final de 2 x 10⁵ espermatozoides vivos/gota (2 x 10⁶/mL), resultando em 8-10 x 10³ de espermatozoides por oócito. O período de co-incubação foi de 18 a 20h, em incubadora à temperatura de 38,5°C, 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

4.1.6. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o término da incubação com os espermatozoides, as células do cumulus foram removidas através do processo de desnudamento com a pipeta e os prováveis zigotos foram lavados em 3 gotas: a primeira com 200 μL de TL, a segunda com 100 μL de TL+ 100 μL de Meio SOF e a última gota com 200 μL de meio SOF. Esta última gota de lavagem com meio SOF foi colhida (amostras identificadas como CIVLAV, n° do grupo seguido do n° da gota), juntamente com os restos celulares que sobraram da placa de FIV (amostras identificadas com n° grupo, FIV e n° da gota), para análises de BTV-4 por RT-qPCR.

Os prováveis zigotos após desnudados e lavados, foram transferidos para placa de poliestireno de CIV contendo microgotas de 100 μL de meio SOF suplementado com 2,5% SFB, 0,5% de BSA, 0,20 mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4 $\mu\text{g/mL}$ de amicacina (Cristalia). As gotas foram cobertas com 4 mL de óleo mineral e o cultivo foi realizado em atmosfera com 5% de CO₂ + 5% de O₂ + 90% de N₂, e umidade saturada, à temperatura de 38,5°C, durante 7 dias, para atingirem o estágio de blastocisto.

Após 48 horas do CIV, foi realizado o 1º “feeding” ou 1ª troca de meio, retirando-se 50 µL do meio SOF e adicionando-se a mesma quantidade de meio recém-preparado, momento também onde é feito a contagem de clivagem em relação aos prováveis zigotos cultivados (taxa de clivagem). Os 50 µL do meio SOF removido foram colhidos (amostras identificadas como nº do grupo, 1º feeding seguido do nº da gota) para análises de RT-qPCR.

Novamente após 48 horas foi realizado o 2º “feeding” ou segunda troca de meio, retirando novamente 50 µL do meio SOF e adicionando-se a mesma quantidade de meio recém-preparado (SOF 2º “feeding”). Também foram colhidas amostras dos 50 µL do meio SOF retirados (amostras identificadas como nº do grupo 2º feeding seguido do nº da gota) para análises de BTV-4 por RT-qPCR.

Os embriões dos grupos controle e expostos foram avaliados durante todo o processo de desenvolvimento, com objetivo de analisar o efeito do BTV-4 no embrião e possíveis alterações morfológicas. A análise da viabilidade foi realizada por meio da avaliação da taxa de clivagem e do desenvolvimento embrionário até o 7º dia de desenvolvimento, na presença ou ausência do patógeno.

No 7º dia de cultivo, foi contabilizado a quantidade de embriões viáveis, em diferentes estágios de evolução, embriões degenerados e estruturas atrasadas e degeneradas que ainda existiam, sendo estes classificados de acordo com os requisitos apresentados no quadro 1. Após contabilizar os dados da PIV de embriões, foram colhidos embriões e estruturas degeneradas que sobraram da placa de CIV (amostras identificadas como TEDEG nº do grupo seguido pelo nº da gota), assim como os embriões viáveis que foram lavados (TELAV nº do grupo seguido pelo nº da gota). Apenas os embriões que apresentavam a zona pelúcida íntegra, foram lavados com 10 gotas de lavagens sequenciais de 200 µL/cada de meio HSOF e duas gotas de tripsina a 0,25% (permanecendo 45 segundos em cada gota) seguindo protocolos de lavagens da IETS, a fim de tentar eliminar o BTV-4 que poderiam ainda estar presentes nesta fase.

4.1.7. Amostras colhidas para pesquisa do BTV-4 durante a PIVE

Foram colhidas em todas as etapas da PIVE de embriões, para garantir monitoramento desde a contaminação experimental pelos agentes (D0) até o final do processo (D8). Na figura 2, estão descritas todas as etapas realizadas e os momentos onde foram colhidas amostras para posterior análise. E no quadro 1, estão descritas número de amostras colhidas por etapa dos experimentos.

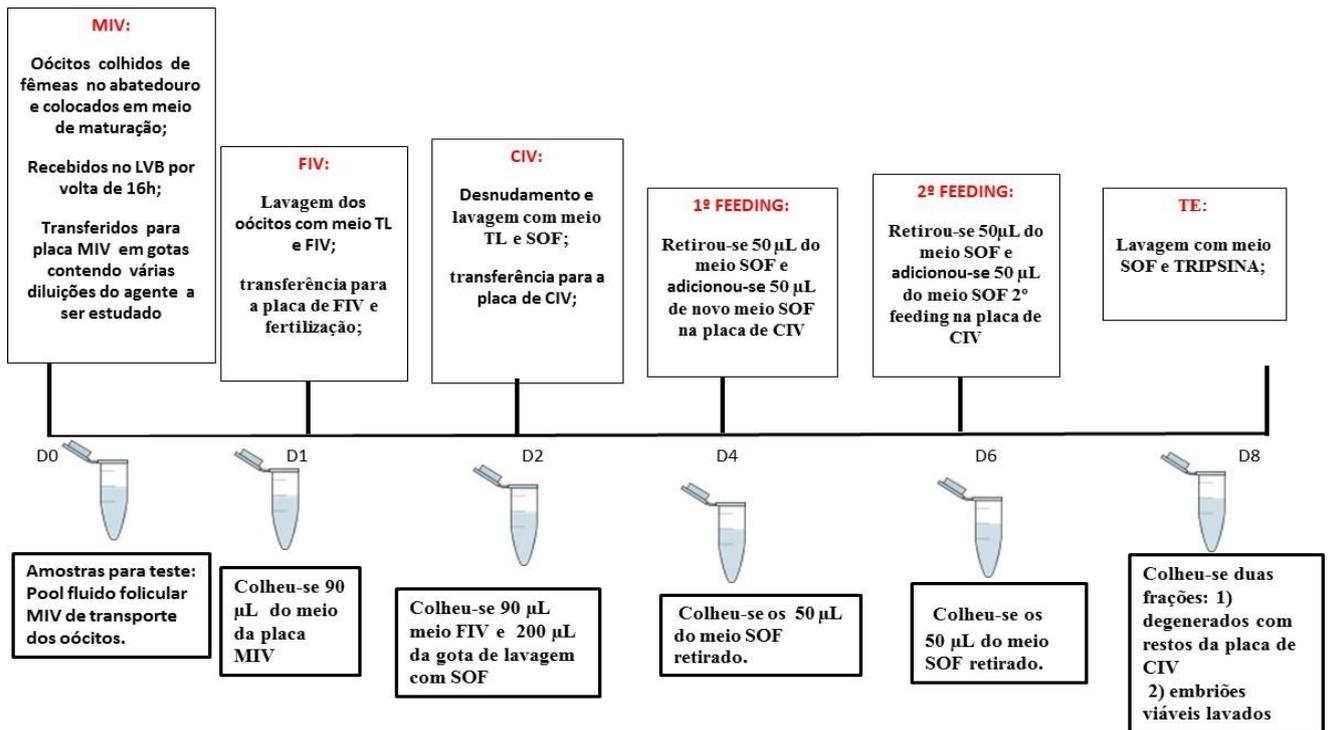


Figura 2: Etapas do processo da PIVE e as amostras colhidas em cada etapa, de acordo com o dia do experimento (D0 ao D8).

Quadro 1: Distribuição dos grupos utilizados no experimento, infecção experimental com BTV-4 de acordo com as diluições e doses infectantes.

Experimento 6: BTV-4		
Grupos	Diluição	TCID ₅₀ /100µL
	Solução estoque	10 ⁵ (100.000)
39	Grupo controle	Grupo controle
40	10 ⁻¹	10 ⁴ (10.000)
41	10 ⁻²	10 ³ (1000)
42	10 ⁻³	10 ² (100)
43	10 ⁻⁴	10 ¹ (10)
44	10 ⁻⁵	10 ⁰ (1)
45	10 ⁻⁶	10 ⁻¹ (0,1)
46	10 ⁻⁷	10 ⁻² (0,01)
47	10 ⁻⁸	10 ⁻³ (0,01)

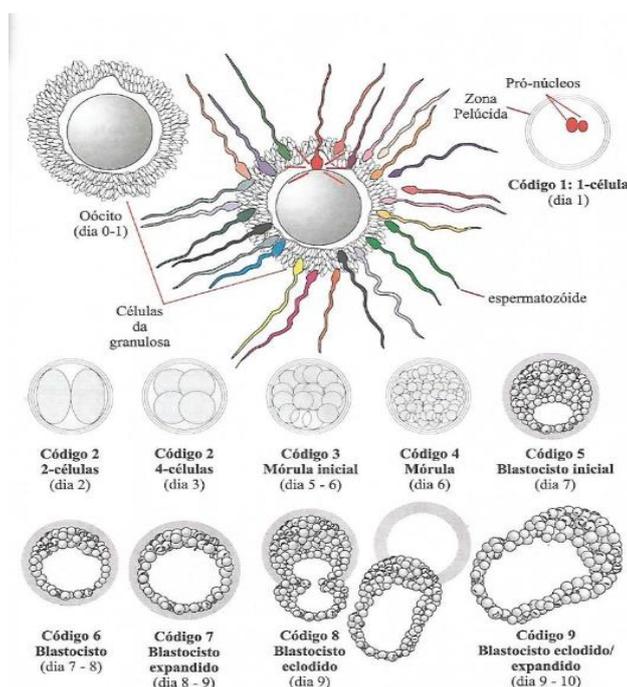
4.1.8. Avaliação da morfologia e viabilidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos ao BTV

A avaliação dos embriões dos grupos controle (não expostos) e expostos ao BTV-4 foi realizada em microscópio óptico em aumento mínimo 50X, com objetivo de verificar alterações morfológicas no embrião. A avaliação da viabilidade foi realizada por meio da taxa de clivagem e do desenvolvimento embrionário até o 7º dia de desenvolvimento (D7), em grupos experimentais contaminados com o BTV e o grupo controle. Os embriões foram classificados de acordo com sua fase de desenvolvimento e qualidade morfológica em uma escala de 1 a 4, sendo grau 1 de excelente qualidade, grau 2 de moderada qualidade, grau 3 de qualidade regular e grau 4 mortos ou degenerados (Quadro 2 e figura 4,5,6).

Quadro 2: Classificação dos embriões e estruturas em relação a qualidade, segundo recomendações da IETS (1999)

Grau	Classificação da qualidade embrionária
1	Excelente: embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.
2	Bom: embriões com um número maior de alterações morfológicas ou extrusões celulares, apresentando mais de 50% da massa celular íntegra e mostra sinais de desenvolvimento
3	Regular: embriões apresentam menos de 50% da massa celular íntegra e mostra sinais de desenvolvimento, dificultando a classificação das células viáveis
4	Morto ou degenerado: oócitos não fecundados e embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados, apresentando sinais de degeneração celular, fragmentação e alteração de cor.

Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento de embrião bovino, demonstrando suas diferentes fases (zigoto, mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto eclodindo e blastocisto eclodido)



Fonte: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal** (2001). Transferência e criopreservação de embriões bovinos. Horst-Dieter Reichenbach, Marcos Antonio Lemos de Oliveira, Paulo Fernandes de Lima, Antônio Santana dos Santos Filho, Joaquim Corrêa de Oliveira Andrade. p.133.

Na figura 4, é possível observar o *cumulus* do oócito compacto apresentando o grau 1, na figura 5 se observa um bom desenvolvimento do embrião, apresentando grau 2, na figura 6 mostra sinais de degenerações, apresentando grau 3.

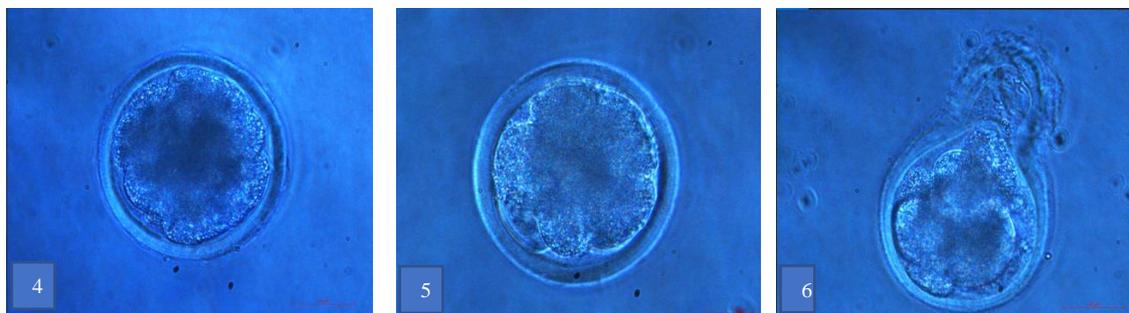


Figura 4:G39 BTV controle D6_40x grau 1; **Figura 5:** G39 BTV controle D6_40x.grau 2; **Figura 6:** G39 BTV controle D6_40x.grau 3

4.2 Análise por PCR

Análise dos insumos de origem animal utilizados na PIVE.

Todos os insumos foram testados para vários agentes para certificação de livres antes do uso e evitar que outras contaminações pudessem interferir no experimento.

O sêmen utilizado para todos os experimentos pertencia a um mesmo touro da raça Nelore, e todas as doses pertenciam a uma única partida de sêmen. Esta partida foi testada por diagnóstico molecular e apresentou-se negativa para BVDV, BTV, BoHV-1 e BLV.

Os vinte pools de fluidos foliculares (FFO), colhidos no abatedouro a partir de diversos ovários, foram todos negativos por análise molecular, para BoHV-1, BVDV, BTV, BLV e *N. caninum*.

4.2.1. Extração do material genético

Para obtenção do RNA viral do vírus da BTV, foi utilizado inicialmente o reagente TRizol[®] (Ambion) e posteriormente o sistema automatizado de extração por meio de BEADS magnéticas - Thermo Scientific King Fischer Flex segundo recomendações do fabricante.

4.2.2. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos e sonda utilizados foram os descritos por Schroeder et al. (2013), e pertencem à região altamente conservada da proteína não estrutural do gene NS3 do BTV. As sequências dos oligonucleotídeos e sonda foram analisadas pelo BLAST (“Basic Local Alignment Search Too”), para confirmação da identidade com as sequências dos 29 sorotipos do vírus BTV depositadas no Genbank.

4.2.3 Amplificação

Para a realização da RT-qPCR foi utilizado o equipamento “Light Cycler” 480 (Roche), disponível no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo. Na RT-qPCR foi utilizado o sistema TaqMan, com filtro de detecção FAM, feita com os kits comerciais da Applied Biosystems™ - VetMAX™ Bluetongue Virus (BTV), Reagents, VetMAX™ Plus Multiplex One Step RT-PCR Kit, e o kit VetMAX™ Bluetongue Virus (BTV) Controls, no qual estão inclusos respectivamente os “primers” e as sondas, a enzima, e o controle interno positivo. O kit foi padronizado para detecção de todos os sorotipos do BTV.

A RT-qPCR para BTV detecta em uma única reação os 27 tipos desse vírus. Para tanto empregou-se o sistema TaqMan, com filtro de detecção FAM, utilizando o kit Lightcycler 480 RNA Hydrolisys Probes Master (Roche®).

Quadro 3: Preparo da mistura de reagentes para RT-qPCR para BTV e volume do RNA e controles.

Reagente	Concentração final	Volume (µL)
Lightcycler 480 RNA Master Hydrolisys Probes 2,7 x	1X	7,4
Activator (Mn)	-	1,3
Enhancer	-	1
<i>Primer</i> BTV Pan senso (10 pmol/µL)/cada agente	05µM	1
<i>Primer</i> BTV Pan anti-senso (10 pmol/µL)/cada agente	05µM	1
Sonda BTV Pan (10pmol/µL)	0,5µM	1
NFW	-	2,3
RNA e controles	-	5

Quadro 4: Ciclo de amplificação para BTV na RT-qPCR.

	TARGET (°C)	ACQUISITION MODE	HOLD	RAMP RATE	CICLOS
TRANSCRIÇÃO REVERSA	63	NONE	00:03:00	4.4	1
DESNATURAÇÃO	95	NONE	00:00:30	4.4	1
AMPLIFICAÇÃO	95	NONE	00:00:15	4.4	45 CICLOS
	60	NONE	00:00:45	2.2	
	72	SINGLE	00:00:01	4.4	
RESFRIAMENTO	40	NONE	00:00:10	2.2	1

Os critérios para o resultado estão descritos abaixo:

- Negativo: $C_p > 40$
- Inconclusivo: $37 > C_p < 40$
- Positivo: $C_p < 36$.

Quadro 5. Interpretação dos resultados

Detecção do BTV	Detecção do IPC BTV	Interpretação
$C_t < 40$	$C_t < 40$ ou $C_t > 40$	BTV detectado
$C_t > 40$	$C_t < 40$	BTV não detectado
$C_t > 40$	$C_t > 40$	Não válido

Na interpretação dos resultados é determinado positivo para BTV quando $C_t < 40$ no PCR e $C_t < 40$ ou $C_t > 40$ na detecção do IPC, o BTV não é detectado quando o $C_t > 40$ e o IPC $C_t < 40$ e é considerado não válido quando $C_t > 40$ para detecção de BTV e $C_t > 40$ para detecção de IPC. O IPC garante que as células foram extraídas

4.2.4. Condições de reação

A técnica foi realizada de acordo com as instruções do kit comercial “LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes” (Roche). A reação foi realizada para um total de 20 µL contendo 7,4 µL “LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes” 2,7X, 1,3 µL de “Activator” 50 mM, 1,0 µL de “Enhancer” 20X, 1,0 µL de cada oligonucleotídeo a 10 mM, 0,5 µL da TaqMan “probe” para BTV a 10mM, 5,8 µL de H2O PCR-grade. Por fim foi acrescentado 2 µL de RNA.

4.3. Análise estatística

As taxas de clivagem e de blastocistos (baseadas no número inicial de oócitos) foram analisadas usando método de variância ANOVA, usando programa estatístico XLSTAT (Addisonft SARL, NEW YORK, NY). As diluições virais foram utilizadas como uma variável fixa e foram feitas múltiplas comparações pelo teste de Duncan. Os dados foram considerados significativos com $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação morfológica durante a PIVE, subgrupos 39 a 47

Na avaliação morfológica, após o período de maturação, os oócitos do grupo controle (G39) apresentaram expansão uniforme das células do *cumulus*, classificada como moderada à alta, formando uma densa camada ao redor dos oócitos dificultando até mesmo a visualização do ooplasma, que apresentou coloração castanha e aspecto uniforme.

Os oócitos expostos às diluições 10^{-1} e 10^{-2} (G40 e G41) no período de maturação, não apresentaram expansão uniforme das células do *cumulus*, classificada como irregular, com aumento do espaço entre as células do *cumulus*, aparência arredondada e granulosa das células do *cumulus* e ooplasma de coloração escura.

Nos grupos G42 ao G47, observou-se um aumento moderado do espaço entre as células do *cumulus*, aparência arredondada e granulosa das células do *cumulus* e ooplasma de coloração escura.

No momento do 1º *feeding*, no grupo controle observaram-se clivagens simétricas, com ooplasma uniforme.

Nos grupos expostos (G40 ao G47), observou-se a presença de granulações no interior do citoplasma e clivagens assimétricas.

Após o 7º dia de desenvolvimento, o grupo controle apresentou poucos embriões de grau 1, e maior quantidade de embriões de grau 2, com presença de irregularidades moderadas na massa embrionária, porém viável.

Nos grupos expostos as diluições 10^{-1} e 10^{-2} (G40 e G41), observaram-se uma grande quantidade de embriões com botão embrionário pequeno e presença de granulações no interior da massa embrionária (Grau 3) e muitas estruturas atrasadas, em processo de degeneração (Grau 4) (quadro 2, Gráficos 1 e 2).

Os grupos expostos (42 ao G47) apresentaram embriões de grau 2 (poucas irregularidades – viável) e grau 3 (inviáveis), figura 7.

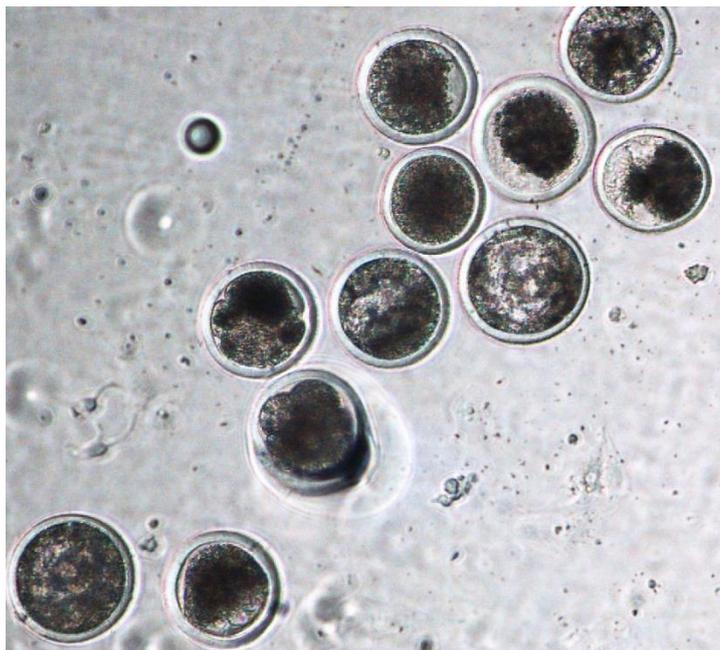


Figura 7: Embriões de grau 3, em D8, na diluição 10^{-8} .

5.2. Avaliação da viabilidade de embriões bovinos PIVE

A avaliação da viabilidade foi verificada por alterações na taxa de clivagem (CLIV: n° total de estruturas clivadas/n° de prováveis zigotos cultivados), e desenvolvimento dos embriões (n° total de embriões/n° de prováveis zigotos cultivados), Quadro 7, Gráfico 1 e Gráfico 2.

Quadro 6: Número/porcentagem de estruturas contabilizadas durante a PIVE do experimento 6 dos grupos 39 ao 47, e classificação destas em D8.

		Qualidade														Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas		
		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões						Grau 1	Grau 2	Grau 3			Grau 4	
							Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be							
GRUPO 39 - controle	Gota 1	16	14	2	11	3	4	0	5	0	0	0	0	0	4	5	7	4	12
	Gota 2	18	16	2	12	4	3	0	5	0	0	0	0	0	5	3	10	5	13
	Gota 3	14	14	0	11	3	2	1	4	0	1	0	1	4	3	6	5	5	9
	Gota 4	15	13	2	10	3	6	0	1	0	0	0	0	4	3	8	4	4	11
	Gota 5	14	11	3	8	3	6	0	0	0	0	0	0	4	2	8	4	4	10
	Gota 6	14	11	3	9	2	7	0	0	0	0	0	2	2	3	7	4	4	10
Total		91	79	12	61	18	28	1	15	0	1	0	3	23	19	46	26	65	
%		100%	87%	13%	67%	20%	31%	1%	16%	0%	1%	0%	3%	25%	21%	51%	29%	71%	

		Qualidade														Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas	
		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões						Grau 1	Grau 2	Grau 3			Grau 4
							Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be						
GRUPO 40 - 10-1	Gota 1	17	14	3	12	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	15	0	17
	Gota 2	14	14	0	13	1	0	0	5	0	0	0	0	0	5	9	0	14
	Gota 3	14	11	3	9	2	1	0	2	0	0	0	0	0	3	11	0	14
	Gota 4	12	11	1	9	2	3	0	1	0	0	0	0	1	3	8	1	11
	Gota 5	16	15	1	13	2	1	0	4	0	0	0	0	1	4	11	1	15
	Gota 6	16	15	1	14	1	0	0	7	0	0	0	0	1	6	9	1	15
Total		89	80	9	70	10	5	0	21	0	0	0	0	3	23	63	3	86
%		100%	90%	10%	79%	11%	6%	0%	24%	0%	0%	0%	0%	3%	26%	71%	3%	97%

		Qualidade														Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas	
		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões						Grau 1	Grau 2	Grau 3			Grau 4
							Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be						
GRUPO 41 - 10-2	Gota 1	15	11	4	8	3	0	0	2	1	0	0	0	1	2	12	1	14
	Gota 2	19	17	2	16	1	0	0	6	0	0	0	0	1	5	13	1	18
	Gota 3	15	12	3	8	4	0	0	3	0	0	0	0	0	3	12	0	15
	Gota 4	16	14	2	13	1	1	0	3	1	0	0	0	3	2	11	3	13
	Gota 5	15	13	2	13	0	0	0	6	0	0	0	0	1	5	9	1	14
	Gota 6	15	14	1	13	1	3	0	3	0	0	0	0	3	3	9	3	12
Total		95	81	14	71	10	4	0	23	2	0	0	0	9	20	66	9	86
%		100%	85%	15%	75%	11%	4%	0%	24%	2%	0%	0%	0%	9%	21%	69%	9%	91%

		Qualidade														Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas	
		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões						Grau 1	Grau 2	Grau 3			Grau 4
							Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be						
GRUPO 42 - 10-3	Gota 1	16	15	1	12	3	0	0	1	0	0	0	0	0	1	15	0	16
	Gota 2	15	13	2	12	1	0	0	8	0	0	0	0	3	5	7	3	12
	Gota 3	15	10	5	9	1	0	0	2	0	0	0	0	1	1	13	1	14
	Gota 4	14	13	1	12	1	0	0	8	0	0	0	0	3	5	6	3	11
	Gota 5	15	14	1	13	1	0	0	4	0	0	0	0	2	2	11	2	13
	Gota 6	19	14	5	11	3	0	0	5	1	0	0	0	3	3	13	3	16
Total		94	79	15	69	10	0	0	28	1	0	0	0	12	17	65	12	82
%		100%	84%	16%	73%	11%	0%	0%	30%	1%	0%	0%	0%	13%	18%	69%	13%	87%

								Qualidade											
		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas
GRUPO 43 - 10-4	Gota 1	15	10	5	6	4		1	0	4	0	0	0	0	0	5	10	0	15
	Gota 2	17	13	4	12	1		1	0	7	0	0	0	0	1	7	9	1	16
	Gota 3	15	14	1	13	1		0	0	10	0	0	0	0	4	6	5	4	11
	Gota 4	16	14	2	12	2		0	0	8	0	1	0	0	4	5	7	4	12
	Gota 5	15	15	0	14	1		1	0	8	0	0	0	0	4	5	6	4	11
	Gota 6	17	15	2	14	1		4	0	6	0	0	0	0	5	5	7	5	12
Total		95	81	14	71	10	7	0	43	0	1	0	0	18	33	44	18	77	
%		100%	85%	15%	75%	11%	7%	0%	45%	0%	1%	0%	0%	19%	35%	46%	19%	81%	

		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas
GRUPO 44 - 10-5	Gota 1	15	8	7	6	2		0	0	1	0	0	0	0	1	0	14	1	14
	Gota 2	16	8	8	5	3		0	0	2	0	0	0	0	0	2	14	0	16
	Gota 3	15	12	3	10	2		1	0	6	0	0	0	0	4	3	8	4	11
	Gota 4	14	8	6	6	2		0	0	3	0	0	0	0	1	2	11	1	13
	Gota 5	21	12	9	9	3		0	0	6	0	0	0	0	2	4	15	2	19
	Gota 6	16	11	5	11	0		1	0	5	0	0	0	0	1	5	10	1	15
Total		97	59	38	47	12	2	0	23	0	0	0	0	9	16	72	9	88	
%		100%	61%	39%	48%	12%	2%	0%	24%	0%	0%	0%	0%	9%	16%	74%	9%	91%	

		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas
GRUPO 45 - 10-6	Gota 1	15	10	5	10	0		0	0	5	0	0	0	0	3	2	10	3	12
	Gota 2	16	9	7	7	2		1	0	5	0	0	0	1	4	1	10	5	11
	Gota 3	17	8	9	7	1		1	1	1	0	0	0	0	1	2	14	1	16
	Gota 4	14	12	2	11	1		2	0	6	0	0	0	0	3	5	6	3	11
	Gota 5	16	10	6	10	0		0	0	6	0	0	0	0	1	5	10	1	15
	Gota 6	15	10	5	10	0		0	0	5	0	0	0	0	4	1	10	4	11
Total		93	59	34	55	4	4	1	28	0	0	0	1	16	16	60	17	76	
%		100%	63%	37%	59%	4%	4%	1%	30%	0%	0%	0%	1%	17%	17%	65%	18%	82%	

		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas
GRUPO 46 - 10-7	Gota 1	14	7	7	7	0		2	0	2	0	0	0	0	4	0	10	4	10
	Gota 2	15	8	7	6	2		0	0	6	0	0	0	0	2	4	9	2	13
	Gota 3	15	11	4	7	4		1	0	4	0	0	0	0	4	1	10	4	11
	Gota 4	15	7	8	7	0		0	0	2	0	0	0	1	0	1	13	1	14
	Gota 5	18	13	5	9	4		1	0	5	0	0	0	0	4	2	12	4	14
	Gota 6	21	10	11	7	3		0	0	4	0	0	0	0	2	2	17	2	19
Total		98	56	42	43	13	4	0	23	0	0	0	1	16	10	71	17	81	
%		100%	57%	43%	44%	13%	4%	0%	23%	0%	0%	0%	1%	16%	10%	72%	17%	83%	

		CIV	CLIV	não clivados	≥4 células	≤4 células	embriões	Mo	Bi	Bl	Bx	Bn	Be	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Total de embriões viáveis	Grau 3 e 4: não fecundados, estruturas degeneradas
GRUPO 47 - 10-8	Gota 1	20	12	8	9	3		0	0	6	0	0	0	1	1	4	14	2	18
	Gota 2	11	6	5	3	3		0	0	3	0	0	0	0	1	2	8	1	10
	Gota 3	18	8	10	7	1		1	0	4	0	0	0	0	3	2	13	3	15
	Gota 4	14	8	6	7	1		1	0	2	0	0	0	0	2	1	11	2	12
	Gota 5	18	13	5	10	3		4	0	1	0	0	0	0	4	1	13	4	14
	Gota 6	17	12	5	7	5		3	0	1	0	0	0	0	2	2	13	2	15
Total		98	59	39	43	16	9	0	17	0	0	0	1	13	12	72	14	84	
%		100%	60%	40%	44%	16%	9%	0%	17%	0%	0%	0%	1%	13%	12%	73%	14%	86%	

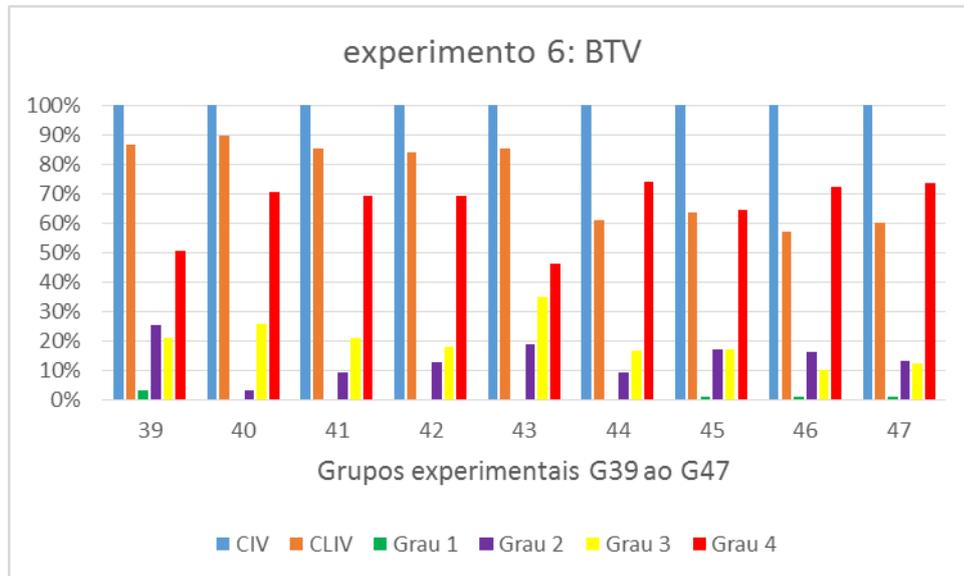


Gráfico 1: Classificação/porcentagem a partir de zigotos cultivados (CIV), em estruturas clivadas (CLIV) e diferentes estágios de desenvolvimento, dos grupos 39 ao 47, experimento

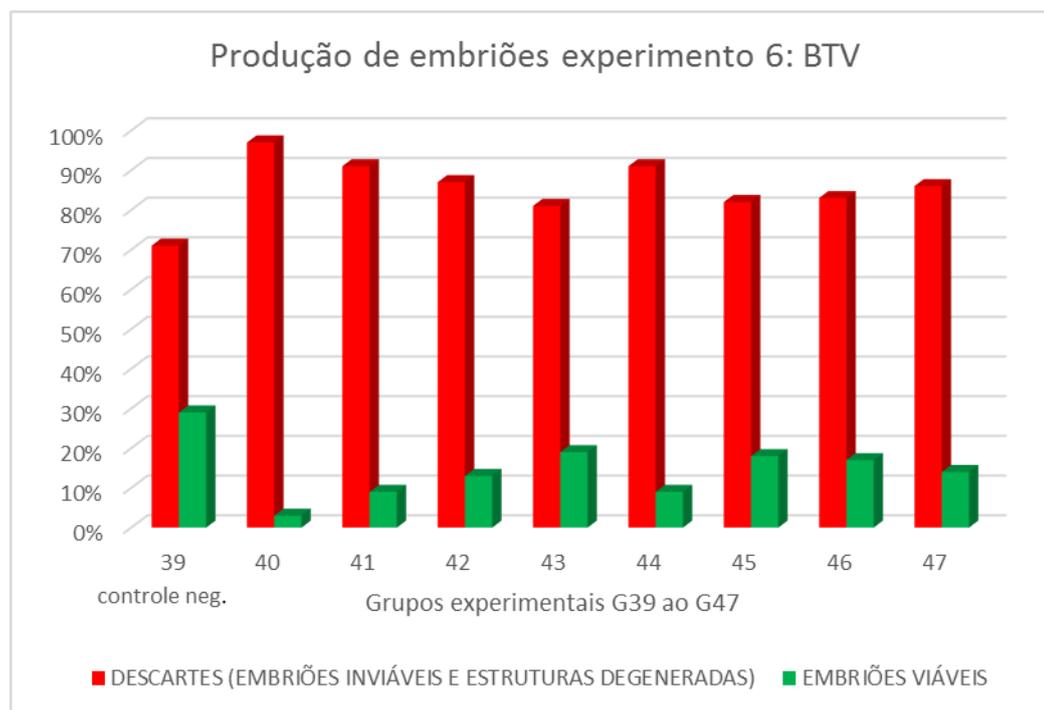


Gráfico 2: Porcentual de embriões viáveis e estruturas de descarte, dos grupos 39 ao 47

As amostras foram submetidas a extração por BEADS magnéticas, para a obtenção do RNA e submetidas ao teste de RT-qPCR (one-step) para gene NS3 do BTV e posteriormente a transcrição reversa, seguida por uma RT-qPCR.

Os testes padronizados foram realizados com amostras de oócitos e embriões infectados experimentalmente com BTV. Eles foram infectados em diferentes doses (10^{-1} a 10^{-8}) para avaliar seus efeitos.

Os resultados demonstraram a amplificação do fragmento, validando assim o protocolo desenvolvido pela RT-qPCR. Através desse diagnóstico foi possível observar se os embriões estavam contaminados.

O diagnóstico por RT-qPCR foi escolhido por possuir vantagens, quando comparado ao convencional, devido executar o ensaio em um menor tempo; ser de fácil realização, sendo necessária apenas uma reação, diminuir a chance de contaminação das amostras e possuir maior sensibilidade em relação à RT-PCR convencional.

5.3. RT-PCR

5.3.1. Amplificação

A amplificação do material genético foi realizada utilizando-se os primers descritos no Manual da OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial animals (OIE, 2019).

Quadro 7: Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR para BTV-4

Agente	Nome dos primers e sondas com a sequência de nucleotídeos de cada um
BTV-4	BTVpan R (5'-ACR TCA CGA AAC GCT TC-3')
	BTVpan F (5'-TGG AYA AAG CGA TGT CAA A -3')
	BTVpan/probe (5'-/56- FAM/ARG CTG CAT /ZEN/ TCG CAT CGT ACG C/3IABkFQ/ -3')

5.3.2. RT-PCR em tempo real

Foi realizada RT-qPCR para detecção do BTV no Laboratório de Viroses de Bovideos do Instituto Biológico utilizando-se o equipamento LightCycler 480 II (Roche®), utilizando-se o kit Promega® 15 µL MIX (10 µL de GoTaq probe, 0,5 µL de Script RTmix 1step, 2 NFW Nuclease Free Water, 1 µL de Primer BTVpan F à 10pmol, 1 µL de Primer BTVpan R à 10pmol, 0,5 µL de Probe BTVpan 10 µM), Os produtos foram amplificados em termociclador LIGHT CYCLER 480, realizando ciclos de 45°C/15 minutos, 95°C/ 2 minutos, (95 °C/15 seg, 60 °C/45)/45 ciclos, 40°C “inffinite hold”.

Inicialmente 10 µL das amostras foram submetidas à desnaturação (95 °C/ 5 minutos) e, posteriormente transferidas para placa de RT-qPCR (MicroAmp® Optical 9-Well Reaction Plate), no qual foi submetida a realização da técnica de RT-qPCR para BTV (Kit MIX BTV NS3) em equipamento LVB RT 02 QUANTSTUDIO 12K utilizando-se o kit da Thermo Fisher (20 µL do MIX BTV NS3, 5 µL de amostra) e os produtos foram amplificados em (60 °C/45 segundos)/40 ciclos realizando para transcrição reversa 45°C/10 minutos, desnaturação 95°C/ 10 minutos, amplificação (95 °C/15 seg, 60 °C/45)/40 ciclos.

Na tabela 1, estão apresentados os resultados de detecção do BTV-4 por RT-qPCR. Constatou-se que as diluições 10^{-1} à 10^{-5} foram positivas, sendo que a diluição 10^{-6} foi considerada o valor de corte da reação (consideradas amostras inconclusivas), as diluições 10^{-7} e 10^{-8} foram consideradas negativas.

Tabela 1: Resultados de RT-qPCR das diferentes diluições de BTV-4, extraídos por Trizol.

Diluições	Número de alíquotas	Resultado RT-PCR	Cq	RT-qPCR	
				Quantificação (número de cópias)	Resultado
10 ⁻¹	2	POS	27,84	1,86E+05	POS
10 ⁻²	2	POS	28,54	1,13+05	POS
10 ⁻³	2	POS	31,57	1,35E+04	POS
10 ⁻⁴	2	POS	34,98	1,22E+0,3	POS
10 ⁻⁵	2	POS	36,83	3,34E+0,2	POS
10 ⁻⁶	2	NEG	40	3,59E+0,1	ponto de corte
10 ⁻⁷	2	NEG	NEG	-	NEG
10 ⁻⁸	2	NEG	NEG	-	NEG

Pela tabela 2 é possível observar os resultados obtidos pelo Vet MAX™ BTV NS3 All Genotypes Kit, no qual todos os grupos controles obtiveram resultados negativos, no grupo MIV foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} , no grupo SBMIV foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} , no grupo FIV foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} , no grupo CIVLAV foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-5} , no grupo 1^o feeding foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-5} , no grupo 2^o feeding foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} , no grupo TE Lavagem foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} , no grupo TE Degenerado foi possível detectar resultado positivo de 10^{-1} à 10^{-6} .

Tabela 2: Resultado da RT-qPCR nas amostras obtidas durante o processo de PIVE, extraídas por BEADS Magnéticas.

Grupo	BTV	IPC	Resultados
MIV controle	Indeterminado	26,659	Negativo
MIV 10^{-1}	32,954	28,186	Positivo
MIV 10^{-2}	32,975	27,579	Positivo
MIV 10^{-3}	32,430	27,174	Positivo
MIV 10^{-4}	33,718	33,879	Positivo
MIV 10^{-5}	35,165	25,061	Positivo
MIV 10^{-6}	35,675	24,875	Positivo
MIV 10^{-7}	Indeterminado	23,210	Negativo
MIV 10^{-8}	Indeterminado	23,091	Negativo
SBMIV controle	Indeterminado	27,539	Negativo
SBMIV 10^{-1}	34,156	29,204	Positivo
SBMIV 10^{-2}	34,309	Indeterminado	Positivo
SBMIV 10^{-3}	35,695	Indeterminado	Positivo
SBMIV 10^{-4}	34,352	28,035	Positivo
SBMIV 10^{-5}	35,970	28,162	Positivo
SBMIV 10^{-6}	37,551	29,117	Positivo
SBMIV 10^{-7}	Indeterminado	32,985	Negativo
SBMIV 10^{-8}	Indeterminado	29,301	Negativo
FIV controle	Indeterminado	28,183	Negativo
FIV 10^{-1}	25,253	28,649	Positivo
FIV 10^{-2}	24,412	26,439	Positivo
FIV 10^{-3}	24,693	27,111	Positivo
FIV 10^{-4}	29,403	23,271	Positivo
FIV 10^{-5}	32,141	Indeterminado	Positivo
FIV 10^{-6}	37,605	23,293	Positivo
FIV 10^{-7}	Indeterminado	23,266	Negativo
FIV 10^{-8}	Indeterminado	22,900	Negativo
CIVLAV controle	Indeterminado	32,902	Negativo
CIVLAV 10^{-1}	32,957	32,138	Positivo
CIVLAV 10^{-2}	33,568	32,221	Positivo
CIVLAV 10^{-3}	27,811	36,508	Positivo

CIVLAV 10⁻⁴	23,448	25,925	Positivo
CIVLAV 10⁻⁵	23,820	25,749	Positivo
CIVLAV 10⁻⁶	19,702	Indeterminado	Negativo
CIVLAV 10⁻⁷	Indeterminado	30,713	Negativo
CIVLAV 10⁻⁸	Indeterminado	35,382	Negativo
1ºfeeding controle	Indeterminado	28,183	Negativo
1ºfeeding 10⁻¹	33,473	Indeterminado	Positivo
1ºfeeding 10⁻²	31,481	31,964	Positivo
1ºfeeding 10⁻³	28,987	Indeterminado	Positivo
1ºfeeding 10⁻⁴	29,542	30,360	Positivo
1ºfeeding 10⁻⁵	29,853	30,752	Positivo
1ºfeeding 10⁻⁶	31,722	27,961	Positivo
1ºfeeding 10⁻⁷	Indeterminado	28,544	Negativo
1ºfeeding 10⁻⁸	Indeterminado	34,728	Negativo
2ºfeeding controle	Indeterminado	30,153	Negativo
2ºfeeding 10⁻¹	25,253	27,649	Positivo
2ºfeeding 10⁻²	28,805	Indeterminado	Positivo
2ºfeeding 10⁻³	29,455	Indeterminado	Positivo
2ºfeeding 10⁻⁴	30,761	28,529	Positivo
2ºfeeding 10⁻⁵	33,758	28,590	Positivo
2ºfeeding 10⁻⁶	34,444	27,002	Positivo
2ºfeeding 10⁻⁷	Indeterminado	26,989	Positivo
2ºfeeding 10⁻⁸	Indeterminado	35,578	Negativo
TE lavagem controle	Indeterminado	32,490	Negativo
TE lavagem 10⁻¹	28,866	22,667	Positivo
TE lavagem 10⁻²	25,976	22,423	Positivo
TE lavagem 10⁻³	29,403	23,271	Positivo
TE lavagem 10⁻⁴	34,245	23,989	Positivo
TE lavagem 10⁻⁵	35,872	Indeterminado	Positivo
TE lavagem 10⁻⁶	36,978	Indeterminado	Positivo
TE lavagem 10⁻⁷	Indeterminado	32,713	Negativo
TE lavagem 10⁻⁸	Indeterminado	34,728	Negativo
TE degenerado controle	Indeterminado	30,808	Negativo
TE degenerado 10⁻¹	35,532	29,248	Positivo
TE degenerado 10⁻²	34,741	29,969	Positivo
TE degenerado 10⁻³	34,459	30,653	Positivo
TE degenerado 10⁻⁴	35,942	30,832	Positivo
TE degenerado 10⁻⁵	36,719	29,786	Positivo
TE degenerado 10⁻⁶	37,864	29,918	Positivo
TE degenerado 10⁻⁷	Indeterminado	30,149	Negativo
TE degenerado 10⁻⁸	Indeterminado	31,122	Negativo

Através da análise dos resultados é possível observar que o diagnóstico por RT-qPCR realizado pela VetMAX™BTB NS3 All Genotypes Kit, no qual foram extraídos por BEADS Magnéticas, o sistema automatizado destacou-se pelo desempenho, com menor tempo para realização desta etapa quando comparado com extração pelo TRizol®. Outra vantagem do

equipamento é a remoção de impurezas, fazendo com que o vírus seja melhor detectável pelo método do PCR, além de um menor risco de contaminação entre as amostras.

Tabela 3: Resultado da RT-qPCR nos embriões viáveis com ZP íntegra, os grupos experimentais foram subdivididos em lavados com e lavados sem tripsina, preconizadas pelo IETS.

Amostras	Grupo	lavagem	Cq	Resultados
TE LAV G39 01	G39- controle negativo	10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G39 02			40	NEG
TE LAV G39 03			NEG	
TE LAV G39 04			NEG	
TE LAV G39 05			NEG	
TE LAV G39 06			NEG	
TE LAV G40 01	Grupo 40- 10 ⁻¹	10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G40 02			40	NEG
TE LAV G40 03			39,58	NEG
TE LAV G40 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G40 05			40	NEG
TE LAV G40 06			NEG	
TE LAV G41 01	Grupo 41- 10 ⁻²	10 gotas de lavagem com HSOF	40	NEG
TE LAV G41 02			NEG	
TE LAV G41 03			40	NEG
TE LAV G41 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	39,54	NEG
TE LAV G41 05			39,35	NEG
TE LAV G41 06			NEG	
TE LAV G42 01	Grupo 42- 10 ⁻³	10 gotas de lavagem com HSOF	40	NEG
TE LAV G42 02			36,85	POS
TE LAV G42 03			NEG	
TE LAV G42 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G42 05			40	NEG
TE LAV G42 06			40	NEG
TE LAV G43 01	Grupo 43- 10 ⁻⁴	10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G43 02			40	NEG
TE LAV G43 03			NEG	
TE LAV G43 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G43 05			NEG	
TE LAV G43 06			NEG	
TE LAV G44 01	Grupo 44- 10 ⁻⁵	10 gotas de lavagem com HSOF	38,18	POS
TE LAV G44 02			40	NEG
TE LAV G44 03			NEG	
TE LAV G44 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G44 05			NEG	
TE LAV G44 06			NEG	
TE LAV G45 01	Grupo 45- 10 ⁻⁶		NEG	
TE LAV G45 02			40	NEG

TE LAV G45 03		10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G45 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G45 05			NEG	
TE LAV G45 06			NEG	
TE LAV G46 01	Grupo 46- 10^{-7}	10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G46 02			NEG	
TE LAV G46 03			NEG	
TE LAV G46 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G46 05			39,01	NEG
TE LAV G46 06			NEG	
TE LAV G47 01	Grupo 47- 10^{-8}	10 gotas de lavagem com HSOF	NEG	
TE LAV G47 02			NEG	
TE LAV G47 03			NEG	
TE LAV G47 04		8 gotas de lavagem com HSOF + 2 de tripsina	NEG	
TE LAV G47 05			NEG	
TE LAV G47 06			NEG	

5.1. Análise estatística

Em relação as análises estatísticas, a dose viral apresentou efeito significativo sobre a taxa de clivagem ($P < 0.001$) em relação ao grupo controle, sendo observada diminuição na taxa de clivagem nas concentrações mais baixas. Também foi observado efeito significativo no desenvolvimento de embriões de acordo com as concentrações virais ($P < 0.001$), na dose 10^{-1} TCID₅₀/100 μ L a taxa de embriões viáveis apresenta a maior redução significativa, sendo observado na tabela 3 diminuição de embriões viáveis em todos os grupos infectado experimentalmente

Tabela 4: Desenvolvimento de embriões a partir de oócitos expostos ao sorotipo 4 do BTV durante o processo de maturação.

Concentração viral	Prováveis		Embriões viáveis (%)
	zigotos cultivados (CIV)	CLIV (%)	
0	91	79 (86.8 \pm 3.2%) ^a	26 (28.6 \pm 1.5%) ^a
10 ⁻¹	89	80 (89.9 \pm 3.3%) ^a	3 (3.4 \pm 1.6%) ^c
10 ⁻²	95	81 (85.3 \pm 2.9%) ^a	9 (9.5 \pm 3.3%) ^{b,c}
10 ⁻³	94	79 (84.0 \pm 4.7%) ^a	12 (12.8 \pm 3.4%) ^{b,c}
10 ⁻⁴	95	81 (85.3 \pm 4.9%) ^a	18 (18.9 \pm 5.1%) ^{a,b}
10 ⁻⁵	97	59 (60.8 \pm 4.6%) ^b	9 (9.3 \pm 3.7%) ^{b,c}
10 ⁻⁶	93	59 (63.4 \pm 5.3%) ^b	17 (18.3 \pm 4.3%) ^{a,b}
10 ⁻⁷	98	56 (57.1 \pm 5.0%) ^b	17 (17.3 \pm 3.8%) ^b
10 ⁻⁸	98	59 (60.2 \pm 4.2%) ^b	14 (14.3 \pm 2.0%) ^{b,c}

^{a,b,c} $P < 0.05$

6. DISCUSSÃO

O Brasil é um grande exportador mundial de insumos (oócitos, embriões, espermatozoides) e carne, para alcançar grandes produções se tornou líder mundial de produção *in vitro* de embriões bovinos, produzindo animais de alto potencial genético. As biotecnologias precisam estar adequadas com a sanidade animal e obter diagnósticos livres de diversas doenças.

O primeiro diagnóstico que comprovou a presença do BTV no Brasil, foi no início da década de 80, ao longo desses anos muitos estudos de soroprevalência tem sido realizado, identificando uma elevada prevalência de ovinos e bovinos reagentes ao BTV no estado de São Paulo (Silva, 2017).

O Brasil se apresenta endêmico para o BTV e em decorrência disso o estudo é de extrema importância para certificarmos que insumos serão exportados livres, possibilitando que rebanhos de excelente genética possam conquistar novos mercados, sendo aprovados através das certificações sanitárias.

As biotécnicas da reprodução animal são ferramentas fundamentais para o avanço tecnológico da pecuária, pois possibilitam a expansão e seleção do material genético adequado para o melhoramento genético. O Brasil utiliza e dissemina muito esta tecnologia e é o maior produtor de embriões bovinos por fertilização *in vitro* do mundo.

O BTV pode estar presente na PIVE, via insumos, como o SFB e o sêmen. Não há estudos que comprovem se o BTV, uma vez presente no processo da PIVE, é carregado do embrião à receptora, ou se faz com que o bezerro e/ou a receptora se tornem infectados. Por isso, há barreiras sanitárias para embriões, impostas por países importadores livres desse vírus, para não terem o risco de introduzir material biológico infectado ou com potencial transmissão. No momento, não existem muitos dados científicos que evidenciam o potencial risco de disseminação do BTV, devido a isso barreiras sanitárias são impostas como uma forma de prevenção das criações.

O BTV é uma doença da lista da OIE, devido à sua grande importância econômica e epidemiológica é fundamental que haja uma biossegurança para evitar sua disseminação pelo mundo. No atual estudo, em decorrência disso foram contaminados embriões bovinos com diferentes concentrações do vírus e observado seu desenvolvimento. Conforme podemos observar na tabela 1, o BTV foi detectado na RT-qPCR nos grupos experimentais infectados com as diluições virais 10^{-1} a 10^{-5} , nos grupos com as menores doses infectantes os resultados foram inconclusivos (10^{-6}) e negativos 10^{-7} a 10^{-8} .

Foram avaliados os embriões bovinos infectados com o BTV para mostrar se após a lavagem preconizada pelo IETS o vírus seria eliminado. Baseado na tabela 4, podemos observar que o protocolo de lavagem, foi ineficiente para remover o vírus do embrião.

O trabalho apresentou embriões infectados com o BTV com desenvolvimento comprometido, no quadro 6 é possível observar que os embriões submetidos a altas concentrações apresentam um número maior de embriões com estruturas degeneradas. A concentração 10^{-1} apresenta 91% da taxa de embriões com grau 3 e 4 (regular e ruim, respectivamente), enquanto que o grupo controle apresenta 81% de embriões com grau 3 e 4. Esses resultados discordam dos resultados apresentados por Singh (1984), quando demonstrou que o BTV nas concentrações 10^{-2} a 10^{-7} pfu/mL não penetrou na zona pelúcida e não afetou o desenvolvimento do embrião (IETS, 2007).

Em outro estudo, concluiu-se que o vírus BTV-17 contaminou os oócitos utilizados na produção de embriões *in vitro*, mesmo estes tendo a zona pelúcida intacta, as 10 lavagens de protocolo do IETS não foram suficientes para que o vírus fosse eliminado dos embriões (MARQUES, 2012).

O diagnóstico por qRT-PCR foi escolhido por possuir vantagens, quando comparado ao convencional, devido executar o ensaio em um menor tempo; ser de fácil realização, sendo necessária apenas uma reação, diminuir a chance de contaminação das amostras e possuir maior sensibilidade em relação ao RT-PCR convencional.

Flannery e colaboradores (2018) detectaram BTV, através do PCR para o controle de animais positivos, no qual foi observado a capacidade de detectar o vírus em diferentes viremias e ajudar no controle da epidemiologia da doença, utilizando-se o kit comercial ThermoFisher VetMAX™ BTV NS3 que possui uma ótima sensibilidade analítica. Os resultados foram consistentes com o atual estudo, no qual foram identificados o vírus em diferentes concentrações.

No presente estudo é possível comparar os diagnósticos das amostras extraídas por TRizol® e BEADS magnéticas, sendo avaliadas através do RT-PCR. Ao observar a tabela 1 (TRizol®) é possível observar que nas diluições de 10^{-1} a 10^{-5} foi identificada a presença do vírus BTV, sendo inconclusivo para 10^{-6} e negativo nas diluições de 10^{-7} e 10^{-8} .

Nas amostras extraídas por BEADS magnéticas é possível observar que nas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} foi detectado o BTV, e nas diluições de 10^{-7} a 10^{-8} não foi diagnosticada a presença do vírus, sendo considerado negativo. A amostra extraída com TRizol® na concentração 10^{-6} foi considerada inconclusiva, o resultado na extração por BEADS foi diagnosticado positivo, como pode ser verificado na tabela 2. O método por BEADS Magnéticas apresentou mais

sensibilidade analítica. Esse resultado apresenta concordância com Zhao e colaboradores (2015) no qual comparou os dois métodos e identificou que o método de extração por BEADS magnéticas não deixa impurezas, com isso o diagnóstico se torna mais preciso, portanto nesse estudo foi possível detectar o vírus em diluições maiores, como pode ser observado na tabela 2.

Vale ressaltar que nas amostras nomeadas como TELAV, que representam as amostras de embriões viáveis com ZP íntegra que foram lavados em grupos de no máximo 10 embriões, colhidas no último dia de cultivo, foram todas negativas para BTV-4. Houve diferença entre as gotas lavadas com apenas meio SOF e gotas que foram lavadas com meio SOF e tripsina, sendo as gotas 01 e 04 lavadas apenas com meio SOF foram positivas e as gotas 02 e 03 com meio SOF e tripsina foram negativas. Esses dados indicam uma tendência de valor de Ct menor no grupo de embriões que não foram lavados com tripsina, do que os lavados com tripsina. (Tabela 4).

6. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o BTV-4 provocou efeitos negativos na PIVE, como aumento de embriões degenerados ou mortos, com comprometimento da massa celular e com atraso no desenvolvimento.

O procedimento de lavagem recomendados no Manual da IETS não foi suficiente para eliminar o vírus.

Portanto, sugere-se incluir nos protocolos além das lavagens, testes em amostras colhidas durante o processo PIVE para certificação de partidas de embriões livres de BTV como medida sanitária para produção de embriões saudáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/Sumario2019.aspx>>. Acesso em 30 ago.2019.

ACEVEDO, A. M.; HINOJOSA, Y.; RELOVA, D.; PERERA, C.L. Bluetongue virus: a know virus, a current threat. **Revista de Salud Animal**, v. 38, n. 1, p.52-59, 2016.

ANTONIASSI, N. A. B. **Aspectos clínicos e patológicos da infecção pelo vírus da língua azul em ovinos no Estado do Rio Grande do Sul**. 2010. Dissertação de mestrado – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

ARADAIB, I.E.; MOHAMED, M.E.H.; ABDALLA, T.M.; SARR, J.; ABDALLA, M.A.;YOUSOF, M.A.M.; HASSAN, Y.A.; KARRAR, A.R.E. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.111, p.145-150, 2005.

BARBER, T. L. Temporal appearance and species of origin of bluetongue virus serotypes in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.29, n.7, p.1654-1656, 1979.

BARROS, V.L.L.; MARINHO, R.M.; REBELO, J.M.M.Ocorrência de espécies de Culicoides Latreille (Diptera,Ceratopogonidae) na área metropolitana de São Luís, Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.23, n.11, p.2789-2790, 2007.

BERNARDES, N.T.C.G. **Soroprevalência da língua azul em bovinos do Estado de São Paulo, Brasil**, 2001. 59f. 2011. Dissertação (Mestrado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

BREARD, E.; HAMBLIN, C.; HAMMOUMI, S.; SAILLEAU, C.; DAUPHIN, G.; ZIENTARA, S. The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. **Research in Veterinary Science**, v.77, p.1-8,2004.

BRITO, M.F. **Aspectos reprodutivos e biotecnologias aplicadas a espécie bubalina**. Tese de doutorado em Reprodução Animal, 2017- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

BRODIE, S.J.; WILSON, W.C.; O’HEARN, P.M.; MUTHUI, D.; DIEM, K.; PEARSON, L.D. The effects of pharmacological and lentivirus-induced immune suppression on orbivirus pathogenesis: assessment of virusburden in blood monocytes and tissues by reverse transcriptionin situ PCR. **Journal of Virology**, v.72, p.5599-5609, 1998.

CARVALHO, L.F.R; DE MELO, C.B.; DRUMMOND V.O. Procedimentos para exportação e importação de material genético pelo Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.415-422, 2007.

CEBRA, C.; CEBRA, M. Enfermidades dos sistemas hematológico, imunológico e linfático (doenças multissistêmicas). In: D.G.PUGH (Ed). **Clínica de Ovinos e Caprinos**, São Paulo: Roca, 2004. p.430.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA-SILVA, M.; TAILOR-RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. Isolation of Bluetongue Virus Serotype 12 from an Outbreak of the Disease in South America. **The Veterinary Record**, v.151, p.301-302, 2002.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMENN, G.P.; LEITE, R.C.; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.2, p.273-275, 2006.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal . Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Epidemiologia do Vírus da Língua Azul em Rebanhos Bovinos**. Doc. 85 . Corumbá, MS. 2006. p.1-23.

FAO, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, 2017. Disponível em <http://www.agrodebate.com.br/_conteudo/2013/07/noticias/9692-fao-mantem-brasil-como-um-dos-maiores-exportadores-de-carne-bovina.html>. Acesso em: 15.Dez.2017.

FELIPPE-BAUER, M.L.; VERAS,R.; CASTELLÓN, E.G.; MOREIRA, N.A. A new Culicoides from the Amazonian region, Brazil (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.1, p.35-37, 2000.

FELIPPE-BAUER, M.L.; CÁCERES, A.; SILVA, C.S.; VALDERRAMA-BAZAN, W.; ANTERO GONZALES- PEREZ, A.; COSTA, J.M. New records of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) from Peruvian Amazonian region. **Biota Neotropica**, v.8, n.2, 2008.

FLANNERY, J.; RAJKO-NENOW, P.; HICKS, H.; GUBBINS, S.; BATTEN, C. Evaluating the most appropriate pooling ratio for EDTA blood samples to detect Bluetongue vírus using real-time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v.217, p.58-63, 2018.

GALUPPO, A. G.; D´ANGELO M.; MIYASHIRO, S.; SCARCELLI, E.; SENEDEZI, M. L. P.; MELO, G. M.; SOUZA, R. J. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos à *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, p. 277-282, 2006.

GIBBS, E.P.; GREINER, E.C. The epidemiology of bluetongue. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.17, p.207-220, 1994.

GIBBS, E.P.J.; GREINER, E.C.; TAYLOR, W.P.; BARBER, T.L.; HOUSE, H.A.; PEARSON, J.E. Isolation of bluetongue virus serotype 2 from cattle in Florida. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, p.2226-2228, 1983.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.46, p.160-164, 1982.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS,V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal** (2001). Transferência e criopreservação de embriões bovinos. Horst-

Dieter Reichenbach, Marcos Antonio Lemos de Oliveira, Paulo Fernandes de Lima, Antônio Santana dos Santos Filho, Joaquim Corrêa de Oliveira Andrade. p.133
 .São Paulo:Livraria Varela. p.133, 2001

HUTCHEON, D. Malarial catarrhal fever of sheep. **Vet. Rec.** 14, 629–633, 1902.

ICTV. International Committee on taxonomy on viruses. 2019.

Disponível em <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=19740118&src=NCBI&ictv_id=19740118%>. Acesso em 1.Set.2019.

IETS, 1999. INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Health and safety advisory committee research up-date Trough November 30, 2007.

JOHNSON, D.J.; OSTLUND, E.N.; STALLKNECHT, D.E.; GOEKJIAN, V.H.; JENKINS-MOORE, M.; HARRIS,S.C. First report of bluetongue virus serotype 1 isolated from a white-jhtailed deer in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.398-401, 2006.

JUNQUEIRA, J. R. C.; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, p. 289-298, 2006.

KAWANAMI, A.E. **Vírus da língua azul em cervídeos neotropicais e bovídeos domésticos**. Tese (doutorado) apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- Unesp, campus Jaboticabal, realizada no Departamento de Patologia Animal, 99f, 2016.

KIRKLAND, P.D., ZHANG, N., HAWKES, R.A., LI, Z., ZHANG, F., DAVIS, R.J., SANDERS, D.A., LI, H., ZHANG, K., BEN, J., HE, G.F., HORNITZKY, C.L., HUNT, N.T. Studies on the epidemiology of bluetongue virus in China. **Epidemiology Investigation**, v.128, p.257-63, 2002.

KONRAD, P.A; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associações com problemas reprodutivos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiiana**, v.10, p.42-51, 2003.

LAENDER, J.O. **Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise de evidência clínica e sorológica e identificação de Culicoides sp.** 2002. 2002. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LAENDER, J.O.; RIBEIRO, E.S.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Levantamento das espécies de Culicoides latreille,1809 (diptera: ceratopogonidae) encontradas nas mesorregiões Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri, Minas Gerais, Brasil. **Entomología y Vectores**, v.11, p.145-157, 2004.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in south America overview of viruses, vectores, surveillance and unique features. **Veterinaria Italiana**, v.40, n.3, p-89-93, 2004.

LEGISA D.; GONZALEZ, F.; DE STEFANO, G.; PEREDA, A.; DUS SANTOS, MJ. Phylogenetic analysis of bluetongue virus serotype 4 field isolates from Argentina. **Journal of General Virology**, v.94, n.3, p.652-662, 2013.

LIMA, M. S. **Caracterização do vírus da língua azul em ovinos, caprinos e cervídeos no Brasil**. 119f. 2013. Dissertação (Mestrado), Instituto Biológico, São Paulo, 2013

LOBATO, Z.I.P.; BARCELOS, M.A.C.; LIMA, F. et al. Língua azul em ovinos e caprinos da região mineira da SUDENE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 4., 2001, Campo Grande. Anais... Campo Grande: Associação Brasileira de Buiatria, 2001. p.165.

LOBATO, Z.I.P. Língua Azul: A doença nos bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V.23, N.4,P.515-523, 1999.

LOBATO, Z. I. P.; GUEDES, M. I. M. C.; MATOS, A. C. D. Bluetongue and other orbiviruses in South America: gaps and challenges. **Veterinaria Italiana**, v. 51, n. 4, p. 253-262, 2015.

LOBÃO, F.M.; MELO, C.B; MENDONÇA, C.E.D.; LEITE,R.C; McMANUS, C.; KREWER, C.C.; UZÊDA, R.S. Língua Azul em ovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.38, n.2, p.69-74, 2014.

MACLACHLAN, N.J.; DREW, C.P.; DARPEL, K.E.; WORWA, G. The pathology and pathogenesis of bluetongue. **Journal of Comparative Pathology**, v.141, p.1-16, 2009

MACLACHLAN, N. J.; MAYO, C. E. Potencial strategies for control of bluetongue, a globally emerging, Culicoides-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antiviral Research*, v. 99, p. 79-90, 2013.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Sala%20de%20Imprensa/Publica%C3%A7%C3%B5es/graficos_portugues_corrigido2.pdf> Acesso em: 11 dez 2017.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2017 Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/brasil-vai-iniciar-exportacao-de-embrioes-bovinos-in-vitro-para-colombia>.> Acesso em: 21 dez . 2017.

MARQUES, A.R.C.N.B. **Avaliação da eficácia das lavagens sanitárias em embriões de bovino produzidos in vitro e infectados com o serótipo 17 do vírus da língua azul**. 91f. 2012. Dissertação (mestrado). Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MELLOR, P.S. Culicoides: vectors, climate change and disease risk. **Veterinary Bulletin**, v.66, n.4, p.301-306,1996.

MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors. **Annual Review of Entomology Journal**, v. 45, n.3, p.07-40, 2000.

MO, C.L.; THOMPSON, L.H.; HOMAN, E.J.; OVIEDO, M.T.; GREINER, E.C.; GONZALEZ, J.; SAENZ, M.R. Bluetongue virus isolations from vectors and ruminants in Central America and the Caribbean. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.211-215, 1994.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.414-421, 2010.

NOGUEIRA, A.H.C.; CARDOSO, T.C.; PITUCO, E.M., DE STEFANO, E., CHIEBAO, D.P., CURCI, V.C.L.M. Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Língua azul (BTV) em ovinos da região Noroeste do Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto, 20. São Paulo, 2008. **O Biológico**, v.69, p.115, 2008.

OIE. World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial animals. Paris. <<https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>> Acesso em: 25 julho 2019.

OIE. World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Code, 2020. Disponível em: < <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/>> Acesso em: 10 jun, 2020.

OMC. Organização Mundial do Comércio. Acordo sobre a aplicação de Medidas e Fitossanitárias (SPS). In: Resultados da rodada do Uruguai de negociações multilaterais de comércio: textos legais. Acordo Geral de Tarifas e Comércio. Genebra:OMC, 1994, p.69-84.

OSBURN, B.I. Third international symposium on bluetongue. **Veterinaria Italiana**, v.40, n.3, 2004.

PARRA, B. C.; PARRA, B. S.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; BUENO, A. P. Aspectos sanitários na transferência de embriões de bovinos. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano VI, nº10, 2008.

PERRY, G.. **IETS 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals International Embryo Transfer Society (IETS)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.iets.org/pdf/comm_data/julnho2020.pdf>.

PINHEIRO, R.R.; SOUZA, T.S.; FEITOSA, A.L.V.L.; ARAGÃO, M.A.C.; LIMA, C.C.V; COSTA, J.N.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M.F.S.; BRITO, R.L.L. Frequência de anticorpos contra o vírus da língua azul em ovinos do estado do Ceará, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol.80, n.1, 2013.

PINTO, V.S.C. **Impacto da diarreia viral bovina na produção in vitro de embriões bovinos**. 113f. 2016. Dissertação (mestrado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RONDEROS, M. M.; SPINELLI, G.R.; LAGER, I.; DIAZ, F. La importância sanitária de los jejenes del género *Culicoides* (Díptera: Ceratopogonidae) em la Argentina. *Entomología y vectores*, v.10, n.4, p.601-612, 2003.

SANTOS, V.S.P. **Impacto da Leucose Enzoótica Bovina na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 59f, 2018. Dissertação (mestrado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo

SARAIVA, J.F., PICANÇO SOUTO, R.N.; FERREIRA, R.M.A. Flebotomíneos (Díptera: Phlebotomidae) coletados em um assentamento rural no estado do Amapá, Brasil. *Biota Amazônia*, v.1, n.1, p.59-63, 2011.

SAVINI, G.N.; JAMES MACLACHLAN, N.J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ZIENTARA, S. Vaccines against bluetongue in Europe. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Diseases**, v.31, p.101-120, 2008.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.P.C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BREARD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. **Veterinary Research**, v.39, n.5, p.46, 2008.

SILVA, T.G. **Prevalência e caracterização espacial de sorotipos do vírus da língua azul em bovinos**. 140f. 2017. Tese (Doutorado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

SILVA, C.S.; FELIPPE-BAUER, M.L.; ALMENIDA, E.H.G.; FIGUEIREDO, L.R. *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. I. Região Norte: Município de Campo dos Goytacazes. *Entomologia y Vectores*, v.8, n.3, p.349-358, 2001.

SINGER, R.S.; MACLACHLAN, N.J.; CARPENTER, T.E. Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus-infected cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.9-43, 2001.

SINGH, E.L. Disease transmission: embryo-pathogen interactions in cattle. Proc 10th Int Cong Anim Reprod AI. Urbana-Champaign, 1984; IV:IX-17 to IX-24.

SMITH, B.P. **Medicina Interna de Grandes Animais**, Barueri, S.P., 3ª edição, Manole, 2006, p.702.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da sociedade internacional de transferências de embriões: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias**. 3ª. Ed. Uberlândia. Sociedade Brasileira de Transferência de embriões, 1999.

THEILER, A. Bluetongue in sheep. In: TRANSVAAL. Directory of Agriculture Annual Report for 1904-5. p. 110, 1906

VENDITTI, L.L.R. **Infecção pelo vírus da língua azul em ovinos e bovinos na região Sudeste do Brasil**. 77f. 2009. Dissertação (Mestrado), Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas a reprodução bovina: generalidades. Faculdade Integral Diferencial-FACID. Teresina-PI. **Ciência Animal**, v.22, n.1, p.55-65, 2012.

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

WRATHALL, A.E.; SUTMÖLLER, P. Potencial da transferência de embriões para controlar a transmissão de doenças. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed., Savoy IL: IETS, 1998. p.17-46. v. 96, n. 2, p.145-155, 2003.

WITTMANN, E.J.; BAYLIS, M. Climate change: effects on Culicoides transmitted viruses and implications for the UK. **Veterinary Journal**, v.160, p.107-117, 2000.

ZHAO, X.; ZHOU, Q.; ZHANG, L.; YAN, W.; SUN, N.; LIANG, X.; DENG, C. Comparison of three magnetic-beads-based RNA extraction methods for detection of cucumber green mottle mosaic virus by real-time RT-PCR. **Archives of Virology**, v.160, p.1791 a 1796, 2015.