

COLETA E PROCESSAMENTO DE EMBRIÕES / ÓVULOS

APÊNDICE 3.3.1 EMBRIÕES COLETADOS IN VIVO Artigo 3.3.1.1.

Objetivos do controle

Os objetivos do controle sanitário oficial de embriões coletados in vivo destinados ao trânsito internacional é garantir que sejam controlados organismos patogênicos específicos que podem estar associados aos embriões, e que se evite a transmissão de infecção para os animais receptores e sua progênie.

Artigo 3.3.1.2.

Condições aplicáveis à equipe de coleta de embriões

A equipe de coleta de embriões é um grupo de técnicos competentes que inclui ao menos um veterinário, e que executam a coleta, processamento e armazenamento dos embriões.

As seguintes condições se aplicam:

1. A equipe deve ser supervisionada por um veterinário.
2. O veterinário da equipe é responsável por todas as operações, que incluem a verificação da condição de saúde do animal doador, a manipulação higiênica e cirurgia das doadoras, e os procedimentos de higiene e desinfecção.
3. O veterinário da equipe deve ser especificamente aprovado para esta função por um veterinário oficial.
4. Os membros da equipe devem ser adequadamente treinados em técnicas e princípios de controle de doenças. Devem também ter padrões elevados de higiene pessoal a fim de evitar a introdução de infecções.
5. A equipe de coleta deve ter local e equipamento adequado para:
 - a. coletar embriões;
 - b. processar e tratar os embriões em um local permanente ou laboratório móvel;
 - c. armazenar embriões.Estes locais não têm necessariamente de ter a mesma localização.
6. A equipe de coleta deve manter um registro de suas atividades por um período mínimo de 2 anos após a exportação dos embriões para inspeção pela autoridade encarregada pela aprovação.
7. A equipe de coleta deve ser auditada pelo veterinário oficial no mínimo uma vez ao ano para garantir a conformidade com as práticas higiênicas de coleta, processamento e armazenamento dos embriões.
8. A equipe de coleta não deve trabalhar em uma zona infectada pela febre aftosa (exceto para a coleta de embriões bovinos in vivo), peste bovina, peste dos pequenos ruminantes, pleuropneumonia contagiosa bovina, peste eqüina africana, peste suína africana e peste suína clássica.

Artigo 3.3.1.3.

Condições aplicáveis aos laboratórios de processamento

O laboratório de processamento usado pela equipe de coleta de embriões pode ser móvel ou permanente. É um local no qual os embriões são retirados do meio de coleta, examinados e submetidos a quaisquer tratamentos requeridos, como lavagem antes do congelamento, armazenamento e quarentena na espera por resultados de testes diagnósticos.

Um laboratório permanente pode ser parte de uma unidade especificamente estruturada para coleta e processamento, ou pode ser uma parte adequadamente adaptada de um edifício já existente. Embora ele possa ser localizado no mesmo local onde os animais doadores são mantidos, em ambos os casos o laboratório deve ser fisicamente separado dos animais. Tanto o laboratório móvel quanto o laboratório permanente devem ter uma separação clara entre a área suja (de manipulação dos animais) e a área limpa (para o processamento).

Além disso:

1. o laboratório deve estar sob supervisão direta do veterinário da equipe e ser regularmente inspecionado pelo veterinário oficial.
2. enquanto os embriões para exportação são manipulados antes do seu armazenamento em ampolas, frascos ou palhetas, nenhum embrião de condição de saúde inferior não deve ser processado.
3. o laboratório deve ser protegido contra roedores e insetos.
4. o laboratório de processamento deve ser construído com materiais que permitam sua efetiva limpeza e desinfecção, que devem ocorrer após cada ocasião em que embriões sejam processados.
5. o laboratório não deve ser localizado em uma zona infectada pela febre aftosa (exceto para a coleta de embriões bovinos in vivo), peste bovina, peste dos pequenos ruminantes, pleuropneumonia contagiosa bovina, peste eqüina africana, peste suína africana e peste suína clássica.

Artigo 3.3.1.4.

Condições aplicáveis à introdução de animais doadores

1. Animais doadores

- a. A Autoridade Veterinária deve ter conhecimento e autoridade sobre o rebanho / plantel de origem dos animais doadores.
- b. No momento da coleta, os animais doadores devem ser inspecionados clinicamente por um veterinário responsável ante o veterinário da equipe, e este deve certificar que os animais estão livres de sinais clínicos de doenças não incluídas na Categoria 1 da classificação da IETS⁴.
- c. O rebanho de origem não deve, por 30 dias (60 dias para camelídeos) antes e depois da coleta de embriões, estar localizado em uma zona infectada pela febre aftosa (exceto para a coleta de embriões bovinos in vivo), peste bovina, peste dos pequenos ruminantes, pleuropneumonia contagiosa bovina, peste eqüina africana, peste suína africana e peste suína clássica.
- d. Os animais doadores não devem ter sido importados de outro país nos 60 dias anteriores, e devem fazer parte do rebanho de origem por no mínimo 30 dias antes da coleta.

2. Doadores de sêmen

- a. O sêmen utilizado para inseminar artificialmente as fêmeas doadoras deve ter sido produzido e processado de acordo com as cláusulas do Apêndice 3.2.1. ou 3.2.2., como apropriado.
- b. Se o doador do sêmen usado para inseminar as fêmeas doadoras não estiver mais vivo, e quando sua condição de saúde relacionada a alguma doença ou doenças infecciosas não for conhecida no momento da coleta de sêmen, podem ser requeridos exames adicionais para a fêmea doadora inseminada, após a coleta dos embriões, a fim de se confirmar que estas doenças infecciosas não foram transmitidas. Como alternativa, pode-se examinar uma alíquota do sêmen obtida na mesma data da coleta.
- c. Nos locais onde forem utilizados a monta natural ou sêmen fresco, os machos doadores devem cumprir os mesmos requerimentos de saúde das fêmeas doadoras.

⁴ Baseado em pesquisas disponíveis e informações de campo, o Subcomitê de Pesquisa da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) classificou algumas doenças baseado no seu risco relativo de disseminação através de embriões coletados in vivo, adequadamente processados e manipulados. O Apêndice 3.3.5. contém a lista das doenças classificadas pela IETS.

Artigo 3.3.1.5.

Administração de risco

Com relação à transmissão de doenças, a transferência de embriões coletados in vivo é um método de intercâmbio de material genético animal que apresenta risco muito baixo. Independente da espécie animal, há três fases no processo de transferência de embriões que determinam o nível de risco final:

1. A primeira fase, que é aplicável a doenças não incluídas na Categoria 1 da classificação da IETS4, envolve o potencial para a contaminação do embrião, e depende de:

- a. condição da doença no país e/ou zona exportadora;
- b. condição de saúde dos rebanhos / plantéis e das doadoras de quem os embriões foram coletados;
- c. características patogênicas do agente específico.

2. A segunda fase envolve a diminuição do risco pelo uso de procedimentos internacionalmente aceitos para o processamento de embriões, determinados no Manual da IETS4. Estes procedimentos incluem os seguintes fatores:

- a. os embriões devem ser lavados ao menos 10 vezes com diluições mínimas 1/100 entre cada lavagem, e deve se usar uma pipeta nova para a transferência dos embriões a cada lavagem.
- b. apenas embriões da mesma fêmea doadora devem ser lavados juntos.
- c. algumas vezes, se for necessária a inativação ou remoção de certos vírus (herpesvírus bovino tipo 1 e vírus da doença de Aujeszky, por exemplo), o procedimento padrão de lavagem deve ser modificado para incluir lavagens adicionais com tripsina, como descrito no Manual da IETS5.
- d. Após a lavagem, a zona pelúcida de cada embrião deve ser examinada ao longo de toda a sua superfície, em magnificação não menor que 50X, a fim de garantir que ela está intacta e livre de material aderido.

[NOTA: Todos os lotes de embriões devem ser acompanhados por um atestado assinado pelo veterinário da equipe, certificando que estes procedimentos de processamento foram executados].

3. A terceira fase, que é aplicável a doenças não incluídas na Categoria 1 da classificação da IETS, envolve a redução de risco gerada:

- a. pela vigilância das doadoras e dos rebanhos doadores após a coleta, baseada nos períodos de incubação das doenças em questão, a fim de se determinar retrospectivamente a condição de saúde das doadoras enquanto os embriões são mantidos armazenados (para espécies em que a criopreservação é possível) no país exportador;
- b. pelo exame dos líquidos de coleta (enxágüe) do embrião e de embriões não viáveis, ou de outras amostras, como sangue, para a presença de agentes específicos.

Artigo 3.3.1.6.

Condições aplicáveis à coleta e armazenamento dos embriões

1. Meio

Qualquer produto biológico de origem animal usado no meio e nas soluções de coleta, processamento, lavagem e armazenamento dos embriões deve estar livre de microorganismos patogênicos. O meio e as soluções usados na coleta, congelamento e armazenamento dos embriões devem ser esterilizados por métodos aprovados de acordo com o Manual da IETS5, e devem ser manipulados de forma a garantir a manutenção da sua esterilidade. Devem ser adicionados antibióticos ao meio de coleta, processamento, lavagem e armazenamento, como recomendado pelo Manual da IETS5.

2. Equipamento

- a. Todo o equipamento usado na coleta, manipulação, lavagem, congelamento e armazenamento dos embriões deve ser esterilizado antes do uso, como recomendado pelo Manual da IETS5.
- b. Equipamentos usados só devem ser transferidos entre países para serem usados novamente pela equipe de coleta de embriões se forem executados procedimentos de limpeza e desinfecção apropriados para o risco da doença em questão.

Artigo 3.3.1.7.

Exames e tratamentos opcionais

1. O país importador pode requerer o exame dos embriões e dos líquidos de coleta e lavagem. Os exames devem ser executados nestas amostras para confirmar a ausência de organismos patogênicos, ou para se verificar se o controle de qualidade da equipe de coleta é de um nível aceitável:

a. Embriões / oócitos

Onde embriões viáveis, com a zona pelúcida intacta, forem destinados à importação, todos os oócitos não fertilizados e embriões degenerados ou com a zona pelúcida comprometida coletados devem ser lavados, de acordo com o Manual da IETS5, e agrupados para possíveis exames. Apenas embriões / oócitos de uma única doadora devem ser processados simultaneamente.

b. Líquidos da coleta

Os líquidos da coleta devem ser colocados em frasco estéril com tampa e, se a quantidade for grande, devem ser mantidos em repouso por uma hora. O fluido sobrenadante deve então ser removido, e os 10-20 ml do fundo, junto com debris acumulados, decantados em um frasco estéril. Se for utilizado um filtro na coleta dos embriões / oócitos, então quaisquer debris que forem retidos no filtro devem ser enxaguados para dentro do fluido que for mantido.

c. Líquido obtido das lavagens

O líquido das quatro últimas lavagens dos embriões / oócitos (lavagens 7, 8, 9 e 10) deve ser agrupado para análise (Manual da IETS5).

d. Amostras

As amostras referidas acima devem ser armazenadas a 4°C e examinadas em 24 horas. Se isto não for possível, as amostras devem ser armazenadas congeladas a -70°C ou a temperaturas mais baixas.

2. Quando o tratamento dos embriões viáveis for modificado para incluir lavagens adicionais com a enzima tripsina (ver parágrafo 2c) no Artigo 3.3.1.5.), o procedimento deve ser executado de acordo com o Manual da IETS5. Deve se notar que este tratamento enzimático não é sempre benéfico, e não deve ser considerado como um desinfetante de uso geral. Ele pode ter efeitos adversos na viabilidade do embrião, como por exemplo, em embriões equinos, onde a cápsula embrionária pode ser danificada pela enzima.

Artigo 3.3.1.8.

Condições aplicáveis para o armazenamento, quarentena e transporte de embriões

1. Os embriões devem ser congelados em nitrogênio líquido, e então armazenados em nitrogênio líquido em tanques limpos e desinfetados.

2. Os embriões devem ser armazenados em ampolas, frascos ou palhetas estéreis e seladas, sob condições rigorosas de higiene, em local de armazenamento aprovado pela Autoridade Veterinária do país exportador, onde não haja risco de contaminação.

3. Apenas embriões de uma mesma doadora devem ser armazenados juntos na mesma ampola, frasco ou palheta.

4. As ampolas, frascos ou palhetas devem ser selados no momento do congelamento (ou antes da exportação, quando a criopreservação não for possível), e devem ser claramente identificados com etiquetas de acordo com o sistema padronizado recomendado no Manual da IETS5.

5. Os tanques com nitrogênio líquido devem ser lacrados sob supervisão do veterinário oficial antes do embarque no país exportador.

6. Os embriões não podem ser exportados até que os documentos de certificação veterinária apropriados estejam completos.

Artigo 3.3.1.9.

Condições específicas aplicáveis a embriões suínos

O rebanho de origem deve estar livre da doença vesicular suína, brucelose e encefalomielite por enterovírus.

[NOTA: O desenvolvimento de métodos efetivos de criopreservação para embriões suínos com zona pelúcida intacta ainda está em seus primeiros passos].

Artigo 3.3.1.10.

Condições específicas aplicáveis a embriões caprinos / ovinos

O rebanho de origem deve estar livre de sinais clínicos de varíola ovina, varíola caprina, brucelose e língua azul.

Artigo 3.3.1.11.

Condições específicas aplicáveis a embriões eqüinos

As recomendações são principalmente aplicáveis a embriões de animais continuamente residentes em populações eqüinas nacionais e, portanto, podem ser inadequadas para aqueles eqüinos normalmente envolvidos em eventos e competições internacionais. Por exemplo, em circunstâncias apropriadas, cavalos viajando com um certificado veterinário internacional (por exemplo, cavalos de competição) podem estar isentos destas condições, desde que haja um acordo bilateral entre as Autoridades Veterinárias.

Artigo 3.3.1.12.

Condições específicas aplicáveis a embriões de camelídeos

Embriões de camelídeos sul-americanos coletados da cavidade uterina por técnica convencional de enxágüe, não cirúrgica, entre 6,5 e 7 dias após a ovulação estão quase que invariavelmente no estágio de blastocisto eclodido, e, desta forma, a zona pelúcida já desapareceu. Como os embriões não entram no útero e não podem ser recuperados antes de 6,5 a 7 dias, não seria realista estipular que para camelídeos sul-americanos apenas embriões com zona pelúcida intacta poderiam ser usados para comércio internacional. Também deve ser notado não há estudos sobre a interação de patógenos envolvendo embriões de camelídeos sul-americanos.

O rebanho de origem deve estar livre de sinais clínicos de estomatite vesicular, língua azul, brucelose e tuberculose.

[NOTA: O desenvolvimento de métodos efetivos de criopreservação para embriões de camelídeos ainda está em seus primeiros passos].

Artigo 3.3.1.13.

Condições específicas aplicáveis a embriões de cervídeos

As recomendações se aplicam principalmente a embriões coletados de animais continuamente residentes em populações nacionais de cervídeos domésticos ou mantidos em cativeiro, e, portanto, podem ser consideradas inadequadas para cervídeos vivendo em ambiente selvagem ou em outras condições relacionadas a esforços de conservação da biodiversidade ou de germoplasma.

O rebanho de origem deve estar livre de sinais clínicos de brucelose e tuberculose.

APÊNDICE 3.3.2.

Embriões Bovinos Fecundados In Vitro / Oócitos Maturados In Vitro

Artigo 3.3.2.1.

Condições aplicáveis à equipe de produção de embriões

A equipe de produção de embriões é um grupo de técnicos competentes, que inclui ao menos um veterinário, e que executam a coleta e processamento de ovários / oócitos⁶ e a produção e armazenamento de embriões fertilizados in vitro (FIV). As seguintes condições se aplicam:

1. A equipe deve ser supervisionada por um veterinário.
2. O veterinário da equipe é responsável por todas as operações, que incluem a coleta higiênica dos ovários e oócitos e todos os outros procedimentos envolvidos na produção de embriões destinados ao trânsito internacional.
3. O veterinário da equipe deve ser especificamente aprovado por um veterinário oficial para executar esta função.
4. Os componentes da equipe devem ser adequadamente treinados em técnicas e princípios de controle de doenças. Devem também ter padrões elevados de higiene pessoal a fim de evitar a introdução de infecções.
5. A equipe de produção deve ter local e equipamento adequado para:
 - a. coletar oócitos;
 - b. processar oócitos e embriões;
 - c. armazenar embriões.
6. A equipe de produção deve manter um registro de suas atividades, por um período de no mínimo 2 anos após a exportação dos embriões, para inspeção pela autoridade encarregada pela aprovação.
7. A equipe de produção deve ser submetida à auditoria regular pelo veterinário oficial, a fim de garantir a conformidade com as práticas higiênicas de coleta e processamento dos oócitos e de produção e armazenamento dos embriões.
8. A equipe de produção não deve trabalhar em uma zona infectada pela febre aftosa e peste bovina.

Artigo 3.3.2.2.

Condições aplicáveis aos laboratórios de processamento

O laboratório de processamento é um local no qual os oócitos que foram recuperados dos ovários são então maturados e fertilizados, e os embriões são cultivados in vitro. Ele pode ser contíguo à área de recuperação dos oócitos ou pode ser ter uma localização separada. Os embriões produzidos desta forma podem estar sujeitos a outros tratamentos que possam ser requeridos, tais como lavagem antes do congelamento, armazenagem e quarentena no laboratório.

Além disso:

1. o laboratório deve estar sob supervisão direta do veterinário da equipe e ser regularmente inspecionado pelo veterinário oficial.
2. nenhum embrião de condição de saúde inferior deve ser recuperado ou processado no laboratório enquanto os embriões para exportação são produzidos, antes do seu armazenamento em ampolas, frascos ou palhetas.
3. o laboratório deve ser protegido contra roedores e insetos.

⁶ Nos locais onde se pretende transportar os oócitos maturados in vitro, também se aplicam as condições determinadas neste Apêndice.

4. o laboratório de processamento deve ser construído com materiais que permitam sua efetiva limpeza e desinfecção, que devem ocorrer após cada ocasião em que embriões sejam processados.

5. o laboratório não deve ser localizado em uma zona infectada pela febre e peste bovina.

Artigo 3.3.2.3.

Condições aplicáveis à introdução de animais doadores

Os oócitos para a produção de embriões de FIV são obtidos de doadoras de duas formas: coleta individual ou coleta por lotes. As recomendações sanitárias para as duas são diferentes.

A coleta individual normalmente envolve a aspiração dos oócitos dos ovários dos animais vivos, na fazenda onde animal doador reside, ou no laboratório. Ocasionalmente, os oócitos podem também ser recuperados de doadoras individuais vivas por aspiração dos ovários que foram retirados cirurgicamente. Se os oócitos forem recuperados de animais individuais vivos, estas doadoras devem seguir as recomendações determinadas no Artigo 3.3.1.4.

A limpeza e a esterilização do equipamento são especialmente importantes e devem ser executadas entre cada doadora, de acordo com os requerimentos do Manual de Procedimentos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS)⁵. A coleta por lotes normalmente envolve a remoção dos ovários dos animais abatidos em um abatedouro, mas pode ser feita através da remoção cirúrgica dos ovários de doadoras vivas; estes ovários então são transportados ao laboratório, onde os oócitos são removidos por aspiração. A coleta por lotes envolvendo ovários obtidos em abatedouro apresenta o inconveniente de dificultar a correlação entre os ovários transportados para o laboratório e as doadoras que foram abatidas. Mesmo assim, é um ponto crítico garantir que apenas tecidos saudáveis sejam obtidos e que eles sejam removidos das doadoras de maneira higiênica.

Além disso:

1. A Autoridade Veterinária deve ter conhecimento e autoridade sobre os rebanhos de origem dos animais doadores.
2. As fêmeas doadoras não devem ser originárias de uma zona infectada pela febre aftosa ou peste bovina, e a remoção de tecidos não deve ser feita em uma zona infectada pela febre aftosa ou peste bovina.
3. O abatedouro deve ser oficialmente aprovado e estar sob a supervisão de um veterinário cujas responsabilidades são garantir que se executem as inspeções ante-mortem e post-mortem de doadoras potenciais, e certificar que estas fêmeas estejam livres de sinais de doenças contagiosas de importância para bovinos.
4. As fêmeas doadoras não devem ter sido designadas para abate compulsório devido a presença de doença de notificação obrigatória, e outros animais de condição sanitária inferior não devem ser abatidos junto com as doadoras das quais os ovários e tecidos serão removidos.
5. Devem ser mantidos os registros da identidade e origem de todas as doadoras.
6. Os lotes de ovários não devem ser transportados para o laboratório de processamento antes das inspeções ante-mortem e postmortem das doadoras terem sido completadas satisfatoriamente.
7. O equipamento para a remoção e transporte dos ovários e outros tecidos deve ser limpo e esterilizado antes do uso, e usado exclusivamente para este fim.

Artigo 3.3.2.4.

Exame dos oócitos, embriões, sêmen e meio de cultura

A principal abordagem para se garantir que os embriões de FIV estejam livres de organismos patogênicos é o exame de oócitos / embriões não viáveis, assim como dos meios, líquidos e células de co-cultura.

Os exames podem ser usados para verificar se os procedimentos de controle de qualidade aplicados no laboratório de processamento são aceitáveis. Os exames podem ser executados nos seguintes materiais a fim de confirmar a ausência de organismos patogênicos que sejam de interesse para o país importador:

- a. oócitos / embriões não viáveis: devem ser agrupados para exame todos os oócitos / embriões não viáveis, em qualquer estágio da linha de produção dos lotes destinados à exportação;
- b. meio de maturação in vitro antes colocar oócitos em contato com sêmen, no processo de fertilização;
- c. meio de cultura de embriões, retirado imediatamente antes do armazenamento dos embriões.

Estas amostras devem ser armazenadas a 4°C e analisadas em 24 horas. Se isto não for possível, as amostras devem ser armazenadas a -70°C ou em temperatura mais baixa. No caso da recuperação de oócitos de animais individuais ou da coleta por lotes de doadoras vivas, deve se considerar o monitoramento de doenças relevantes através da análise da condição clínica e do exame das doadoras após a coleta.

Além disso:

1. O sêmen usado para fertilizar oócitos in vitro deve estar em conformidade com os requerimentos e padrões sanitários determinados no Apêndice 3.2.1.

Se o doador do sêmen usado para fertilizar os oócitos não estiver mais vivo, e quando a sua condição de saúde relacionada a alguma doença ou doenças infecciosas não for conhecida no momento da coleta de sêmen, podem ser requeridos exames adicionais para os embriões de FIV inutilizados, a fim de se confirmar que estas doenças infecciosas não foram transmitidas. Como alternativa, pode-se examinar uma alíquota do sêmen da mesma data da coleta.

2. Qualquer produto biológico de origem animal, inclusive células e componentes do meio de co-cultura, usados na recuperação, maturação, fertilização, cultura, lavagem e armazenamento deve estar livre de microorganismos patogênicos. O meio deve ser esterilizado por métodos aprovados de acordo com o Manual da IETS⁵, e deve ser manipulado de forma a garantir a manutenção da sua esterilidade. Devem ser adicionados antibióticos a todos os líquidos e meios, como recomendado pelo Manual da IETS⁵.

3. Todos os equipamentos usados para recuperar, manipular, cultivar, lavar, congelar e armazenar oócitos / embriões deve ser limpo e esterilizado antes do uso, como recomendado pelo Manual da IETS⁵.

Artigo 3.3.2.5.

Condições aplicáveis para o processamento, armazenamento, quarentena e transporte dos embriões / óvulos

1. Após o término do período de cultura, mas antes do congelamento, armazenagem e transporte, os embriões devem ser submetidos a lavagem e outros tratamentos similares àqueles especificados para embriões coletados in vivo, de acordo com o Manual da IETS⁵.

2. Apenas embriões da mesma doadora, no caso da recuperação de um animal individual, ou da mesma coleta por lote, devem ser lavados juntos.

3. A zona pelúcida de cada embrião deve ser examinada ao longo de toda a sua superfície, em magnificação não menor que 50X, a fim de garantir que ela está intacta.

- Os embriões de FIV devem ser armazenados em ampolas, frascos ou palhetas estéreis e selados, e então ser congelados em nitrogênio líquido ou outro agente crioprotetor, em tanques limpos e esterilizados, sob condições rigorosas de higiene, no local de armazenamento aprovado pela Autoridade Veterinária do país exportador, onde não pode haver risco de contaminação para os embriões.
- Apenas embriões da mesma doadora ou coleta por lote devem ser armazenados juntos na mesma ampola, frasco ou palheta.
- As ampolas, frascos ou palhetas devem ser selados no momento do congelamento e devem ser identificados com etiquetas de acordo com o Manual da IETS⁵.
- Os tanques com nitrogênio líquido devem ser lacrados antes do embarque no país exportador.
- Os embriões não podem ser exportados até que os documentos de certificação veterinária apropriados estejam completos.

Artigo 3.3.2.6.

Procedimento de micromanipulação

Quando os embriões forem micromanipulados, este procedimento deve ser feito após o término dos tratamentos descritos no Artigo 3.3.2.5. e deve ser conduzido de acordo com o Apêndice 3.3.3.

APÊNDICE 3.3.3.

Embriões Bovinos Micromanipulados

Artigo 3.3.3.1.

Introdução

O Apêndice 3.3.1. recomenda medidas de controle sanitário oficial para o trânsito internacional de embriões bovinos intactos coletados in vivo, e, da mesma forma, o Apêndice 3.3.2. recomenda medidas para embriões bovinos fertilizados in vitro / oócitos maturados in vitro. Nenhum destes apêndices discute embriões que tenham sido submetidos a biópsia, bissecção, injeção transgênica, injeção intracitoplasmática de esperma (ICSI), transplante de núcleo ou outras micromanipulações que rompam a integridade da zona pelúcida. Tais embriões serão considerados a partir daqui como “embriões micromanipulados”.

Deve se notar que a remoção completa das células da granulosa antes da micromanipulação de oócitos, zigotos e embriões é necessária para evitar que a condição sanitária dos mesmos não seja prejudicada. As seguintes condições se aplicam para que os embriões micromanipulados sejam objeto dos Apêndices mencionados acima:

Artigo 3.3.3.2.

- Antes de qualquer procedimento de micromanipulação que envolva o rompimento da zona pelúcida, todos os embriões / oócitos devem ser coletados e processados de acordo com as condições sanitárias determinadas no Apêndice 3.3.1. (embriões coletados in vivo) ou produzidos de acordo com as condições sanitárias determinadas no Apêndice 3.3.2. (embriões bovinos fertilizados in vitro / oócitos maturados in vitro).
- A responsabilidade pelos embriões / oócitos deve ser da equipe de coleta de embriões (embriões coletados in vivo) ou da equipe de produção de embriões (embriões bovinos fertilizados in vitro), e todos os processos de micromanipulação devem ser executados em um laboratório de processamento aprovado, sob a supervisão do veterinário certificado da equipe (ver Artigos 3.3.1.2. e 3.3.1.3., e Artigos 3.3.2.1. e 3.3.2.2., como apropriado).

3. Os animais doadores devem estar em conformidade com as condições determinadas no Artigo 3.3.1.4. (embriões coletados in vivo) ou Artigo 3.3.2.3. (embriões bovinos fertilizados in vitro / oócitos maturados in vitro), como apropriado. Os critérios para a análise de amostras a fim de garantir que os embriões estejam livres de organismos patogênicos estão determinados nos Artigos 3.3.1.5. e 3.3.2.4. respectivamente, e também devem ser respeitados.

4. Todos os embriões micromanipulados devem ser lavados de acordo com o Manual da IETS (1998)⁵, e devem ter a zona pelúcida intacta antes e depois das lavagens. Apenas embriões da mesma doadora, ou, no caso de alguns embriões produzidos in vitro (ver Apêndice 3.3.2.) do mesmo lote de coleta, devem ser lavados juntos. Após a lavagem, mas antes da micromanipulação, a zona pelúcida de cada embrião deve ser analisada ao longo de toda a sua superfície, em magnificação não menor que 50X, e deve se garantir que ela está intacta e livre de material aderido.

5. Se outras zonas pelúcida forem utilizadas, elas devem ser de origem bovina, e os embriões / oócitos das quais foram obtidas devem ser tratados da mesma maneira como se fossem embriões coletados in vivo ou produzidos in vitro destinados ao trânsito internacional.

Artigo 3.3.3.3.

Procedimentos de micromanipulação

O termo "micromanipulação" engloba vários procedimentos distintos, onde podem ser usados diferentes instrumentos microcirúrgicos especializados ou outros equipamentos. Entretanto, do ponto de vista da saúde animal, qualquer corte, penetração ou rompimento da zona pelúcida é uma ação que pode alterar a condição de saúde do embrião. A fim de manter a sua condição de saúde durante e após a micromanipulação, as seguintes condições se aplicam:

1. Meio

Qualquer produto biológico de origem animal, inclusive células e componentes do meio de co-cultura, usados na coleta dos embriões, oócitos e outras células, e na sua micromanipulação, cultura, lavagem e armazenamento deve estar livre de microorganismos patogênicos (inclusive os agentes causadores de encefalopatias espongiformes transmissíveis, algumas vezes chamados príons). Todos os meios e soluções devem ser esterilizados por métodos aprovados de acordo com o Manual da IETS⁵, e manipulados de forma a garantir a manutenção da sua esterilidade. Devem ser adicionados antibióticos a todos os líquidos e meios, como recomendado pelo Manual da IETS⁵.

2. Equipamento

O equipamento (por exemplo, instrumentos microcirúrgicos que têm contato direto com os embriões) deve ser para uso único (descartáveis após cada embrião) ou devem ser efetivamente esterilizados entre cada embrião, de acordo com as recomendações do Manual da IETS⁵.

3. Núcleos para transferência

- a. Para se transplantar núcleos derivados de embriões antes da eclosão (isto é, com a zona pelúcida intacta), os embriões de origem destes núcleos devem estar em conformidade com as condições deste Apêndice.
- b. Quando os núcleos forem derivados de outros tipos de células doadoras (por exemplo, embriões após a eclosão, células embrionárias, fetais e adultas, incluindo espermatozoides / espermátides para ICSI), o embrião de origem, e os métodos pelos quais eles são produzidos, incluindo cultura de células, devem estar em conformidade com os padrões de saúde animal recomendados em outros pontos deste Código Sanitário e do Manual Sanitário.
- c. Quando se pretender transplantar um núcleo para um oócito (para a ICSI), ou para oócitos anucleados (para transferência de núcleo), estes oócitos devem ser coletados, cultivados e manipulados de acordo com as recomendações deste Apêndice e /ou Apêndice 3.3.2.

Artigo 3.3.3.4.

Análises e tratamentos opcionais

O país importador pode requerer que se executem análises⁷ em certas amostras ou que os embriões sejam tratados a fim de

⁷ Se as amostras mencionadas acima, no ponto 3.3.3.4.1. do Artigo 3.3.3.4., forem analisadas para agentes patogênicos, devem ser usadas técnicas microbiológicas atuais para estes agentes, onde apropriado.

garantir a ausência de organismos patogênicos específicos

1. Amostras

As amostras a serem testadas devem incluir aquelas descritas no Artigo 3.3.1.7. e/ou no Artigo 3.3.2.4. Quando outras células, além de embriões com zona pelúcida intacta (por exemplo, células somáticas e espermáticas), forem usadas como doadoras de núcleos para o transplante, amostras ou culturas destas células doadoras também podem ser testadas.

2. Tratamentos

Pode-se requerer o tratamento dos embriões com a enzima tripsina ou outras substâncias conhecidas por inativar ou remover organismos patogênicos, e que não sejam prejudiciais ao embrião, mas estes também devem ser executados antes de qualquer micromanipulação, e de acordo com o Manual da IETS⁸.

Artigo 3.3.3.5.

Condições aplicáveis ao armazenamento, quarentena e transporte

Embriões micromanipulados devem ser armazenados, colocados em quarentena e transportados de acordo com as condições determinadas no Artigo 3.3.1.8. ou nos pontos 4, 5, 6, 7 e 8 do Artigo 3.3.2.5. Os documentos de certificação veterinária devem identificar todas as micromanipulações, além do local e momento em que foram executadas.

APÊNDICE 3.3.4.

Embriões / Óvulos de Roedores e Coelho de Laboratório

Artigo 3.3.4.1.

Condições aplicáveis à manutenção de colônias de animais de laboratório

A manutenção de colônias de animais de laboratório com genótipos específicos requer manejo reprodutivo intensivo, em local especializado. Os animais podem ser mantidos em um ambiente gnotobiótico, quer seja um sistema livre de germes (germfree) ou em sistema com “barreiras” (normalmente com microbiota definida), uma colônia convencional, ou uma colônia de condições microbiológicas não definidas.

Tanto no sistema germfree quando no sistema com barreiras, os animais são criados em ambiente controlado, de acordo com protocolos que visam eliminar as fontes potenciais de contaminação microbiológica. A diferença principal é que os animais mantidos no sistema com barreiras foram inoculados com microorganismos conhecidos (definidos)⁸, usando um coquetel de microbiota não patogênica, enquanto que animais germfree são mantidos livres tanto de microbiota patogênica quanto não patogênica.

Uma segunda categoria de animais são aqueles mantidos em colônias convencionais, fechadas, nas quais podem existir patógenos conhecidos. Nestes locais, protocolos menos rígidos de manejo são utilizados para controlar as fontes potenciais de contaminação, mas a implementação de precauções assépticas simples (por exemplo, a autoclavagem dos alimentos e do material para camas) permite que os animais sejam mantidos em um sistema microbiologicamente definido. Por último, os animais podem viver em ambientes com condições microbiológicas indefinidas (por exemplo, colônias não isoladas, animais criados soltos).

Os exames para doenças e os requerimentos para a manipulação de animais doadores / embriões podem, portanto, pertencer a três tipos diferentes, dependendo do tipo de colônia com que se lida, por exemplo, de microbiota definida, convencional ou indefinida.

A condição de saúde de todas as colônias deve ser confirmada trimestralmente por análises bacteriológicas, virológicas, parasitológicas, sorológicas e imunohistoquímicas em animais sentinelas pré-designados ou outros animais representativos da colônia (por exemplo, machos mais velhos que produziram várias ninhadas).

⁸ Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. Relatório da Federação Europeia de Associações de Ciência em Animais de Laboratório (FELASA), Grupo de Trabalho em Saúde Animal aceito pelo Corpo Administrativo da FELASA, Novembro (1992).

Artigo 3.3.4.2.

Condições aplicáveis à equipe de produção de embriões e ao laboratório

1. A equipe de produção de embriões deve ser composta de técnicos competentes supervisionados por um embriologista experiente que seja graduado (por exemplo, médico veterinário, mestre, doutor).
2. Os componentes da equipe devem ser treinados em princípios de controle de doenças e no uso de técnicas assépticas de manipulação de embriões. Os procedimentos sanitários no laboratório devem estar em conformidade com os requerimentos do Manual da IETS⁵.
3. A equipe de produção de embriões deve tomar todas as precauções necessárias para proteger da contaminação microbiológica o local onde ficam os animais, o laboratório e os equipamentos. Em particular, o potencial zoonótico de patógenos específicos deve ser identificado e compreendido por estes profissionais a fim de se evitar a contaminação das colônias através de vetores humanos, ou vice-versa. Devem ser estabelecidas restrições para prevenir o acesso livre de pessoas ao laboratório de manipulação de embriões, depois que estas foram expostas a outros locais.
4. Devem ser mantidos registros adequados para inspeção pelo embriologista chefe (isto é, o supervisor). Até que sejam desenvolvidos formulários de registro padronizados para os animais de laboratório, é responsabilidade de cada laboratório manter registros completos dos animais e embriões (isto é, dados de coleta de embriões, criopreservação). Onde aplicável, devem ser incorporadas informações do tipo mostrado nos formulários de registro da IETS⁵ para espécies de rebanho; dados tais como o sistema de avaliação da qualidade dos embriões, estágio de desenvolvimento morfológico no momento da criopreservação e identificação genotípica dos doadores devem ser claramente registrados.
5. É responsabilidade do embriologista chefe (isto é, supervisor do laboratório) garantir que os embriões sejam adequadamente armazenados em ampolas ou palhetas estéreis e seladas, que devem ser corretamente identificadas usando-se o formato padrão com dados sobre a espécie / genótipo do embrião, data da criopreservação, número de embriões e estágio de desenvolvimento, número da ampola ou palheta e indicação de qualquer procedimento (por exemplo, fertilização in vitro, micromanipulação) ou condição especializados (por exemplo, germfree, microbiologicamente definido)

Artigo 3.3.4.3.

Condições aplicáveis ao veterinário da equipe / instituto

1. O veterinário, certificado em cuidados para animais de laboratório ou acreditado nesta área de estudo, deve garantir que os procedimentos requeridos para a manutenção da conformidade sanitária das colônias sejam implementados, e que os resultados sejam revisados e adequadamente registrados antes do embarque dos embriões. Ele(a) também é responsável por garantir a manutenção de condições adequadas de manejo e higiene.
2. O veterinário é responsável por certificar que os procedimentos de manipulação dos embriões e as condições do laboratório sejam mantidas, de acordo com o Manual da IETS⁴.
3. O veterinário deve supervisionar todas as práticas de quarentena a fim de proteger a colônia da contaminação indesejada e disseminação de doenças, e para garantir a geração de resultados válidos.
4. O veterinário deve autorizar todos os carregamentos de embriões, garantindo que os documentos de certificação veterinária corretos e os registros de coleta de embriões sejam completados e incluídos nos carregamentos.

Artigo 3.3.4.4.

Programa de exames para os animais doadores

Animais sentinelas de cada colônia de doadores devem ser submetidos a pesquisa microbiana mensal de rotina. O exame para

⁹ Schiewe M.C., Hollifield V.M., Kasbohm L.A. & Schmidt P.M. (1995) - Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species. Theriogenology, 43, 97-104.

patógenos específicos depende da espécie e vai ser, sem dúvida alguma, também influenciado pela localização geográfica. Recomendações em relação a agentes microbianos a serem analisados em camundongos, ratos, ratos do algodão, hamsters, cobaias, gerbils e coelhos foram publicados em outra parte⁹.

Artigo 3.3.4.5.

Condições aplicáveis à manipulação dos embriões / animais

1. Condições microbiológicas definidas

- a. Animais germfree, e aqueles de condição microbiológica definida, mantida por barreiras, representam as fontes mais limpas de gametas, e os embriões recuperados destes animais podem ser considerados livres de patógenos.
- b. Como os animais são livres de patógenos e apresentam uma microbiota definida (normalmente baseada em análises mensais aleatórias de animais sentinelas), os procedimentos de dissecação do trato reprodutivo e isolamento dos embriões podem ser executados sob condições assépticas no laboratório, e não requerem o uso de cabines de segurança microbiológica.
- c. No entanto, devem ser seguidos procedimentos assépticos rigorosos, e, embora a lavagem dos embriões não seja essencial para protegê-los da contaminação pelo ar do laboratório, recomenda-se que os embriões passem por ao menos 3 lavagens. Em cada lavagem, os embriões devem ser suavemente agitados no meio, e o volume de lavagem deve constituir no mínimo 100 vezes o volume para o qual os embriões serão transferidos.
- d. Não se requer a análise microbiológica dos meios de lavagem ou enxágüe.

2. Condições convencionais

- a. Animais mantidos nestas condições geralmente representam colônias fechadas cuja condição de saúde deve ser regularmente verificada. Eles podem ter sido expostos a vários patógenos, podendo haver o isolamento de agentes infecciosos, títulos positivos para anticorpos ou mesmo doença clínica ativa. Entretanto, antes da coleta de embriões, tem de ser conhecida a condição de saúde dos animais para patógenos de importância.
- b. Os tratos reprodutivos (úteros, ovidutos e/ou ovários) devem ser removidos em sala separada e então levados ao laboratório de embriões. Estes procedimentos devem ser executados por técnicos diferentes ou, no mínimo, as roupas de proteção devem ser trocadas entre os dois locais.
Se os animais forem manipulados no laboratório, os tratos reprodutivos devem ser dissecados em cabine de segurança microbiológica. Isso vai ajudar a proteger o laboratório contra a possível disseminação de patógenos.
- c. Depois que os tratos reprodutivos forem removidos, a recuperação dos embriões deve ser feita sob condições assépticas. Os embriões devem ser inspecionados (>100x) para a presença de falhas na zona pelúcida, e apenas embriões com a zona intacta devem ser mantidos. Eles devem então ser lavados usando o procedimento padrão em 10 passos, descrito no Manual da IETS5. Esta diretriz pode não ser necessária no futuro, desde que seja obtida evidência científica suficiente em estudos de interação entre embriões e patógenos.
- d. Embriões coletados de animais que tenham títulos positivos de anticorpos ou outras evidências da presença de patógenos específicos só podem ser transferidos para uma nova colônia depois de quarentena, usando-se fêmeas receptoras de condição microbiologicamente definida. Como proteção adicional, se houver alguma incerteza sobre a condição de saúde da doadora ou dos embriões, as receptoras devem ser colocadas em quarentena. Em certas situações, onde os embriões podem ter sido expostos a infecções bacterianas (por exemplo, micoplasma), eles devem ser cultivados em um meio contendo antibióticos apropriados por 24 horas antes do congelamento, ou após o descongelamento, ou antes da transferência.
- e. Se os embriões não forem manipulados da maneira recomendada, isso deve ser indicado nos registros de embarque, e deve haver quarentena obrigatória para a fêmea receptora e os filhotes na instituição que os receber, até que sua condição de saúde seja confirmada. A fêmea receptora deve então ser testada para patógenos após o desmame, e a introdução da progênie na colônia deve ser feita apenas se os resultados das análises forem satisfatórios.

3. Condições microbiológicas indefinidas

- a. Estes animais são originários ou da natureza ou de colônias de condição de saúde desconhecida, e seus embriões requerem precauções máximas. A condição de saúde dos machos reprodutores e fêmeas doadoras deve ser determinada 15 dias antes e no dia da cruz (para machos) ou da coleta de embrião (para fêmeas). Como alternativa, os animais podem ser incorporados a uma colônia convencional, onde, com o passar do tempo, o

histórico de saúde pode ser documentado a fim de reduzir os requerimentos rigorosos de monitoramento e de manipulação dos embriões.

- b. Deve ser utilizada uma cabine de segurança biológica para a manipulação de todos os animais, tecidos e embriões.
- c. Uma alíquota do líquido de enxágüe de cada doadora, ou uma amostra de conjunto, deve ser testada para a presença de patógenos específicos de importância para o país importador e para o laboratório.
- d. Os embriões devem ser lavados de acordo com os protocolos do Manual da IETS5 (isto é, a lavagem em 10 passos, possivelmente incluindo tratamento com tripsina no caso de certos herpesvírus). Uma alíquota do meio das últimas quatro lavagens (agrupada) deve ser coletada e testada para patógenos.
- e. Embriões criopreservados devem ser armazenados no laboratório exportador até que as análises em tecidos e líquidos requeridas para doenças específicas sejam completadas. Todos os embriões destes animais devem ser transferidos a uma colônia via um sistema de quarentena, como discutido acima. Além da análise da fêmea receptora, todos os filhotes devem ser testados com 12 semanas de idade e/ou os indivíduos de gerações seguintes devem ser testados antes da sua introdução em colônias de reprodutores fora da estação de quarentena.

Artigo 3.3.4.6.

Circunstâncias experimentais especiais

Se os embriões forem criopreservados de acordo com procedimentos especializados de micromanipulação que envolvam a penetração da zona pelúcida, eles devem ser submetidos aos passos de lavagem requeridos (dependendo da condição da colônia) antes do tratamento. No caso da fertilização in vitro, deve se usar apenas espermatozoides lavados a fim de se minimizar a exposição a patógenos. Os embriões devem ser lavados novamente antes da criopreservação.

APÊNDICE 3.3.5.

Categorização Das Doenças E Agentes Patogênicos Segundo A Sociedade Internacional De Transferência De Embriões

Artigo 3.3.5.1.

Em 2004, o Subcomitê de Pesquisa do Comitê Consultivo de Saúde e Segurança da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) revisou novamente as informações de pesquisa e de campo disponíveis sobre doenças infecciosas estudadas com relação ao risco de transmissão via embriões coletados in vivo. Como resultado desta revisão, a IETS classificou as seguintes doenças e agentes patogênicos em quatro categorias. Esta classificação se aplica apenas a embriões coletados in vivo.

A seguinte metodologia foi seguida pelo Subcomitê de pesquisa a fim de classificar as doenças infecciosas com relação ao risco da sua transmissão:

1. Os procedimentos de pesquisa usados para manipular e processar os embriões estão de acordo com os critérios estabelecidos por A. Bielanski e W.C.D. Hare no Apêndice A do Manual da IETS⁵.
2. Os dados usados pelo Subcomitê para classificar e re-classificar as doenças devem ter sido publicados em artigos revisados por pares, em revistas científicas acreditadas. Isso deve ser feito para garantir que procedimentos científicos e resultados, assim como a interpretação destes resultados, tenham sido submetidos a outro nível de revisão.
3. As decisões relacionadas à classificação de doenças devem ser baseadas em um consenso determinado anualmente pelo Subcomitê. Devem ser registrados os nomes dos membros do Subcomitê que estejam presentes quando as decisões forem tomadas, assim como os nomes de outros profissionais cujas opiniões sejam solicitadas no processo de tomada de decisão.
4. As questões consideradas no processo de tomada de decisão incluem os seguintes pontos:
 - a. Qual é a natureza da doença? Por exemplo, seu agente causal é um patógeno uterino? Ele ocorre no sangue? Ele persiste em sangue? Existem portadores assintomáticos? Qual é a dose infectante mínima?

- b. O agente causal foi encontrado em ambiente de ovário / oviduto / útero (OOU)?
- c. A presença do agente causal no ambiente OOU é incidental ou é consequência da patogênese da doença?
- d. O agente causal foi encontrado em fluidos de enxágüe?
- e. O agente causal é capaz de penetrar ou atravessar a zona pelúcida (ZP) intacta?
- f. O agente causal pode ser removido pela lavagem do embrião?
- g. Tratamentos especiais (por exemplo, com tripsina) podem remover ou inativar o agente causal?
- h. Quantos embriões foram transferidos com ou sem a transmissão da doença?
- i. Qual é a evidência acumulada da não transmissão da doença na transferência de embriões?
- j. Qual é a evidência de que a doença poderia ser transmitida pela transferência de embriões?
- k. Resultados negativos (ou positivos) foram repetidos pelos mesmos pesquisadores ou por pesquisadores diferentes?
- l. Existe evidência acumulada para espécies animais diferentes assim como para diferentes tipos e cepas do agente causal?

Artigo 3.3.5.2.

Categoria 1

Doenças ou agentes patogênicos na Categoria 1 são aqueles para os quais existe evidência suficiente para mostrar que o risco de transmissão é desprezível, desde que os embriões sejam adequadamente manipulados entre a coleta e a transferência, de acordo com o Manual da IETS⁵. As seguintes doenças ou agentes patogênicos estão classificados na categoria

1:

- Língua azul (bovinos)
- Encefalopatia espongiiforme bovina (bovinos)
- Brucella abortus (bovinos)
- Leucose enzoótica bovina
- Febre aftosa (bovinos)
- Rinotraqueíte infecciosa bovina: é necessário o tratamento com tripsina
- Doença de Aujeszky (pseudorraiva) (suínos): é necessário o tratamento com tripsina.

Artigo 3.3.5.3.

Categoria 2

Doenças na Categoria 2 são aquelas para os quais existe evidência substancial para mostrar que o risco de transmissão é desprezível, desde que os embriões sejam adequadamente manipulados entre a coleta e a transferência, de acordo com o Manual da IETS⁵, mas para as quais são necessárias novas transferências para se confirmar os dados existentes.

As seguintes doenças estão classificados na categoria 2:

- Língua azul (ovinos)
- Peste suína clássica (cólera suína)
- Scrapie (ovinos).

Artigo 3.3.5.4.

Categoria 3

Doenças ou agentes patogênicos na Categoria 3 são aqueles para os quais existe evidência preliminar mostrando que o risco de transmissão é desprezível, desde que os embriões sejam adequadamente manipulados entre a coleta e a transferência, de acordo com o Manual da IETS⁵, mas são necessários dados experimentais adicionais in vivo e in vitro para que a confirmação dos achados preliminares.

As seguintes doenças ou agentes patogênicos estão classificados na categoria 3:

- Vírus da imunodeficiência bovina
- Encefalopatia espongiiforme bovina (caprinos)
- Diarréia bovina a vírus (bovinos)
- *Campylobacter fetus* (ovinos)
- Artrite / encefalite caprina
- Febre aftosa (suínos, ovinos e caprinos)
- *Haemophilus somnus* (bovinos)
- *Mycobacterium paratuberculosis* (bovinos)
- *Neospora caninum* (bovinos)
- Adenomatose pulmonar ovina
- Síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (SRRS)
- Peste bovina (bovinos)
- Doença vesicular suína.

Artigo 3.3.5.5.

Categoria 4

Doenças ou agentes patogênicos na Categoria 4 são aqueles para os quais foram feitos ou estão sendo feitos estudos que indicam:

1. que ainda não há conclusões possíveis com relação ao nível de risco de transmissão; ou
2. o risco de transmissão via transferência de embriões pode não ser desprezível, mesmo se os embriões forem adequadamente manipulados entre a coleta e a transferência, de acordo com o Manual da IETS⁵.

As seguintes doenças ou agentes patogênicos estão classificados na categoria 4:

- Peste suína africana
- Doença de Akabane (bovinos)
- Anaplasmoze bovina
- Língua azul (caprinos)
- Doença das fronteiras (ovinos)
- Herpesvírus bovino tipo 4
- Epididimite ovina (*Brucella ovis*)
- *Chlamydia psittaci* (bovinos, ovinos)
- Enterovírus (bovinos, suínos)
- *Escherichia coli* O9:K99 (bovinos)
- *Leptospira borgpetersenii* sorovar hardjobovis (bovinos)
- *Leptospira* sp. (suínos)
- Maedi-visna (ovinos)
- *Mycobacterium bovis* (bovinos)
- *Mycoplasma* spp. (suínos)
- Vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (bovinos)
- Parvovírus (suínos)
- Scrapie (caprinos)
- *Trichomonas foetus* (bovinos)
- Circovírus suíno (tipo 2) (suínos)
- *Ureaplasma/Mycoplasma* spp. (bovinos, caprinos)
- Estomatite vesicular (bovinos, suínos).