

Embryotransfer als Risiko für die Übertragung infektiöser Erkrankungen

Axel Wehrend

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit
Tierärztlicher Ambulanz

Einleitung

Die Gefahr, dass durch den Handel mit Embryonen Krankheiten übertragen werden, hat zu einer Reihe gesetzlicher Vorschriften geführt, die dieses Risiko minimieren. In diesem Zusammenhang ist auch die jüngste Reglementierung in Form der Entscheidung der Kommission vom 9. März 2005 zur Festlegung der Veterinärbedingungen und Veterinärbescheinigungen für die Einfuhr von Rinderembryonen in die Gemeinschaft zu sehen, durch die, nach Ablauf festgelegter Fristen, der Import von Embryonen, die von Bullen abstammen, die Antikörper gegen bestimmte Krankheitserreger besitzen, nicht mehr möglich ist. Bereits in den 60er Jahren wurde intensiv auf die Gefahr der grenzüberschreitenden Ausbreitung von Infektionserkrankungen durch Spermahandel hingewiesen. Mit der Zunahme des Embryotransfers war es logisch, dass auch diese Biotechnologie unter diesen Aspekten kritisch zu betrachten ist. Heute werden von offizieller Seite die Risiken der Übertragung von Infektionserkrankungen durch das Office International des Epizooties (OIE; <http://www.oie.int>) und der *International Embryo Transfer Society* (IETS; <http://www.iets.org>), die im engen Austausch miteinander stehen, wissenschaftlich betreut.

Kategorisierung von Krankheitserregern

Basierend auf der laufenden Auswertung wissenschaftlicher Untersuchung über die Gefahr der Übertragung von Mikroorganismen durch Embryotransfer werden Erreger in eine von vier möglichen Kategorien eingeteilt (Tabelle 1), die sich im Manual der IETS finden. Dabei handelt es sich nicht um eine statische Zuordnung, sondern eine Kategorisierung, die den aktuellen Erkenntnissen angepasst wird. Diese Veränderungen sind häufiger als die Neuauflagen des IETS-Manuals, so dass in diesem Zusammenhang auf den Internetlink des OIE hingewiesen werden muss, wo sich das jeweils gültige Update der Einteilung findet.

Die Kategorie 1 umfasst Erreger, über die genügend Erkenntnisse vorliegen, um zu der Aussage zu kommen, dass bei Anwendung der ebenfalls im IETS-Manual beschriebenen Behandlungen der Embryonen, die Gefahr einer Übertragung der Erkrankung zu vernachlässigen ist. In der Kategorie 2 finden sich Erkrankungen, bei denen zwar grundlegende Daten publiziert sind, um anzunehmen, dass bei Anwendung der im IETS-Manual beschriebenen Behandlungen die Gefahr einer Übertragung zu vernachlässigen ist, jedoch noch weitergehende Informationen fehlen. In der Kategorie 3 sind Krankheiten aufgenommen, für deren Übertragungsgefahr bisher nur vorläufige Ergebnisse vorliegen. In der Kategorie 4 sind Krankheiten und Erreger gelistet, über die noch zu wenige Daten vorliegen, um über die Gefahr einer Übertragung durch Embryotransfer Aussagen zu treffen.

Tabelle 1: Einteilung von Infektionskrankheiten und Erregern in die Kategorien 1-4 nach dem *Terrestrial Animal Health Code, Update 6.9.2004* (<http://www.oie.int>) und der Zusammenfassung der Sitzung des *Health and Safety Advisory Committee* der IETS am 9.1.2005. Diese Einteilung gilt nur für **In-vivo-Embryonen**.

Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4
Bluetongue (Rind) BSE (Rind) <i>Brucella abortus</i> (Rind) Enzootische Leukose (Rind) MKS (Rind) BHV-1 (Rind) Trypsin-Inkubation erforderlich AK (Schwein) Trypsin-Inkubation erforderlich	Bluetongue (Schaf) Klassische Schweinepest (Schwein) Skrapie (Schaf)	Bovines Immundefizienzvirus (Rind) BSE (Ziege) BVDV (Rind) <i>Campylobacter fetus</i> (Schaf) CAE (Ziege) MKS (Schwein, Schaf, Ziege) <i>Haemophilus somnus</i> (Rind) <i>Neospora caninum</i> (Rind) Lungenadenomatose (Schaf) PRRS (Schwein) Rinderpest (Rind) Vesikulärexanthem (Schwein) <i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i> (Rind)	Afrikanische Schweinepest (Schwein) Akabane-Krankheit (Rind) Anaplasmose (Rind) Bluetongue (Ziege) Border disease (Schaf) Bovines Herpesvirus-4 (Rind) <i>Brucella ovis</i> (Schaf) <i>Chlamydia psittaci</i> (Rind, Schaf) Enterovirus (Rind, Schwein) <i>Escherichia coli</i> 09:K99 (Rind) <i>Leptospira borgpetersenii</i> serovar <i>hardjobovis</i> (Rind) <i>Leptospira</i> sp. (Schwein) Maedi-Visna (Schaf) <i>Mycobacterium bovis</i> (Rind) <i>Mycoplasma</i> spp. (Schwein) Parainfluenza-3 Virus (Rind) Parvovirus (Schwein) Skrapie (Ziege) <i>Ureaplasma/Mycoplasma</i> spp. (Rind, Ziege) Vesikuläre Stomatitis (Rind, Schwein) Porcines Circovirus 2 (Schwein) <i>Trichomonas foetus</i> (Rind)

Anmerkungen zur grundsätzlichen Gefahr der Übertragung von Infektionserkrankungen durch Embryotransfer

Die Möglichkeiten der Krankheitsübertragung ergeben sich bei Gewinnung von Embryonen, wobei eine Kontamination bzw. Infektion

- der weiblichen Gameten
- der Samenzellen bzw. der Besamungsportion
- des Embryo im weiblichen Genitale vor der Spülung
- durch Instrumente, Material, Medien und Spülflüssigkeiten

möglich ist,

bei der Beurteilung, Lagerung und dem Transfer

- durch Instrumente, Material, flüssigem Stickstoff und Medien.

In der Literatur gibt es bisher einen Hinweis, dass es zu einer Infektion eines Bullen, der aus Embryotransfer stammt, mit dem BVD-Virus über einen infizierten Embryo gekommen ist (Drew et al., 2002). Bei dem betroffenen Bullen wurde zum erstenmal ein BVD-Virus Genotyp in England nachgewiesen, der hohe Ähnlichkeit mit einem nordamerikanischen Virustyp aufweist, von wo der Bulle als Embryo nach England

importiert wurde. Es konnte bei den epidemiologischen Nachforschungen keine andere potenzielle Infektionsquelle als der importierte Embryo gefunden werden.

Eine weitere Gefahr, auch wenn diese nicht direkt mit dem Embryotransfer in Verbindung steht, ist die Infektion des Embryos bzw. des Fetus durch das Trägartier. Dieser Infektionsweg trägt zwar nicht zu einer grenzüberschreitenden Ausbreitung von Infektionserkrankungen bei, sollte jedoch im Rahmen des praktischen Embryotransfers bedacht werden. So kann es bei Trägartieren, die Antikörper gegen *Neospora caninum* besitzen, zu einer diaplazentaren Infektion des Fetus kommen, der in den meisten Fällen infiziert aber ohne klinische Symptome geboren wird. Schares et al. (1998) gehen davon aus, dass in über 90% der Fälle von Trächtigkeiten seropositiver Kühe eine vertikale Infektion stattfindet.

Spendertier und Bulle als Infektionsquelle

Die Gefahr der Krankheitsübertragung durch das Spendertier muss durch eine sorgfältige klinische und serologische Untersuchung minimiert werden. Über die Bedeutung der Dokumentation der klinischen Untersuchung von Spendertiere wurde von Frau Dr. Kniep von der Osnabrücker Herdbuch e.G. in ihrem Erfahrungsbericht am 28.4.2005 über die EU-Inspektion 2005 bei der OHG am 10.2.2005 ausführlich berichtet.

Insbesondere Viren werden im Rahmen der Virämie, die häufig mit einem temporär gestörten Allgemeinbefinden oder zumindest einer Erhöhung der Körperinnentemperatur des betroffenen Tieres verbunden ist, im Sekret der Genitalorgane nachgewiesen. Um die Barriere der Spendertieruntersuchung für die Krankheitsübertragung zu erhöhen, sollte neben der aktuellen Untersuchung zumindest eine anamnestische Erhebung über den Gesundheitszustand der letzten 4 Wochen unter Berücksichtigung der Herdensituation erfolgen. Es gilt der Grundsatz, dass bei einem hohen Gesundheitszustand der Herde, insbesondere bei Abwesenheit spezifisch pathogener Keime, die Anfälligkeit der Herde steigt.

Bei erkrankten Spendertieren, bei denen es zu einer Kontamination der Embryonen gekommen ist, führen die Vorschläge zur Behandlung der Embryonen im IETS-Manual zu einer massiven Keimverdünnung/Keimentfernung bzw. zu einer Reduktion des Übertragungsrisikos. Zu diesen Behandlungen der Embryonen zählen unter anderem, dass nur Embryonen eines einzelnen Spendertieres in Gruppen gewaschen werden, wobei die Gruppengröße maximal zehn Embryonen betragen sollte. Weiterhin sind mindestens zehn Waschschrte einzuhalten, bei denen ein Pipettenwechsel zwischen den einzelnen Schritten durchzuführen ist.

Eine natürliche Barriere für eine Vielzahl von Infektionserregern bildet die intakte Zona pellucida. Anheftende Keime lassen sich durch Waschung und/oder durch eine Behandlung mit Trypsin entfernen. In Untersuchungen, bei denen dies nicht gelungen ist, wurden in der Regel die von der IETS vorgeschlagene Anzahl der Waschschrte nicht eingehalten und/oder eine Trypsinierung nicht durchgeführt (Stringfellow und Givens, 2000). Embryonen mit einer Zona pellucida, die nicht intakt ist, stellen ein erhöhtes Infektionsrisiko dar.

Das Übertragungsrisiko von Krankheiten durch Sperma ist ungleich höher als durch Embryonen. Diese Tatsache erklärt die hohen Gesundheitsanforderungen an Bullen auf Besamungsstationen. Zwar existieren nach Meinung des *Health and Safety Advisory Committee Report 2005* der IETS (<http://www.iets.org/pdf/hasacjan2005.pdf>) nur gesicherte Studien von Labortieren, dem Mann und dem Hengst, dass Virus in oder an Samenzellen vorhanden sein kann und durch den

Befruchtungsvorgang durch die intakte Zona pellucida transferiert wird, doch ist dieser Übertragungsweg nicht generell bei Rindern auszuschließen. Da der Nachweis von Virus der bovinen enzootischen Leukose, des BHV-1, des BVD-Virus und des Bluetongue-Virus im Sperma von subklinisch erkrankten Bullen gelang, besteht zumindest die theoretische Möglichkeit, dass bei Verwendung von Sperma derartiger Bullen, infizierte Embryonen entstehen könnten. Vor diesem Hintergrund erscheint die Verschärfung der Vorschriften für den Import von Embryonen durch die Entscheidung der Kommission vom 9. März 2005 zur Festlegung der Veterinärbedingungen und Veterinärbescheinigungen für die Einfuhr von Rinderembryonen in die Gemeinschaft logisch.

Tiefgefrierlagerung als Kontaminationsquelle

Im Rahmen der Tiefgefrierlagerung von Besamungsportionen und Embryonen kann es bei entsprechender Kontamination des flüssigen Stickstoffes auch zu einer Konservierung von pathogenen Mikroorganismen kommen (Bielanski et al., 2003). Die Vorschrift zur regelmässigen Desinfektion der Container ist daher sinnvoll, wobei bisher Untersuchungen ausstehen, welche Methode am besten dazu geeignet ist. Neben einer ausreichenden antimikrobiellen Wirkung ist auf eine gute Materialverträglichkeit und dem Ausschluss von Folgeschäden für das Gefriergut bei der nachfolgenden Lagerung zu achten.

Gefahr der Übertragung durch In-vitro-Produktion von Embryonen

Die Gefahr, dass durch Embryonen Infektionserkrankungen übertragen werden, wird nach In-vitro-Produktion grundsätzlich höher eingestuft, als bei in-vivo-produzierten Embryonen. Mit einer Reihe von Infektionserregern lassen sich Embryonen bei der Kultivierung nachhaltig infizieren, während dies bei der Gewinnung von Embryonen aus erkrankten Spenderkühen nicht gelingt (Stringfellow und Givens, 2000). Diese Ergebnisse müssen vor dem Hintergrund gesehen werden, dass laut *Report* des *Health and Safety Advisory Committee* der IETS vom 31.1.2005 (Thibier, 2005), die Anzahl von übertragenen in-vitro produzierten Embryonen im Jahr 2003 weltweit erstmals die Marke von 100000 überschritten hat. Mit zunehmender Verbreitung dieser Technik steigt folglich das Infektionsrisiko.

Bei der In-vitro-Produktion von Embryonen kommen als zusätzliche Kontaminations- bzw. Infektionsquellen

- Kulturmedien, bei Zusatz von fetalem Kälberserum und Follikelflüssigkeit
- Somatische Zellen zur Kokultivierung
- Kultivierungsgefäße u.ä.

in Frage.

Eine besondere Gefahr stellt die Gewinnung von Embryonen aus Ovarien, die vom Schlachthof stammen, dar. Hierbei erhöht sich aufgrund der besonderen epidemiologischen Bedeutung eines Schlachthofes (hohe Tierdichte, Stress, Tiere aus verschiedenen Beständen, teilweise zweifelhafter Gesundheitszustand der Schlachttiere) und der Zusammenfassung von Eizellen unterschiedlicher Tiere zu einer Behandlungsgruppe die Kontaminationsgefahr beträchtlich.

Jede Tätigkeit im Labor erfordert die Einhaltung von Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung und Kontrolle des Hygienestatus.

Embryotransfer zur Vermeidung von Infektionen

Bei den Angaben zur Übertragungsmöglichkeit von infektiösen Erkrankungen durch Embryotransfer handelt es sich in der Regel um ein potentielles Risiko. Auch wenn es zur Übertragung infizierter oder kontaminierter Embryo gekommen ist, stellt sich

die Frage, ob eine infektiöse Dosis auf diese Weise erreicht werden kann. Um diesen Aspekt objektiv beurteilen zu können, muss darauf hingewiesen werden, dass der Embryotransfer auch dazu dienen kann, von infizierten Elterntieren nichtinfizierte Nachkommen zu gewinnen, was in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden konnte (Beispiel: Baillargeon et al., 2001).

Ableitungen für die Praxis

- Die Übertragung von Infektionskrankheiten durch Embryotransfer ist eine potenzielle Gefahr, die insgesamt als gering einzuschätzen ist, jedoch im Rahmen des Im- und Exportes einen wichtigen Aspekt darstellt.
- Die im IETS-Manual dargestellten Behandlungsverfahren für Embryonen zwischen Gewinnung und Transfer sind bei In-vivo-Embryonen geeignet, eine Vielzahl von Erregern zu eliminieren (Kategorien 1-4).
- Die klinische und serologische Untersuchung der Spendertiere unter Berücksichtigung der Herdenanamnese, aus der das Tier stammt, ist ein wichtiger Schritt im Rahmen der Risikominderung. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind zu dokumentieren.
- Das Risiko einer Kontamination von Embryonen bei der In-vitro-Produktion wird als höher eingestuft, als bei in-vivo produzierten Embryonen.
- Der Stickstoffcontainer stellt eine potenzielle Kontaminationsquelle dar.
- Während der Gravidität kann es zu einer diaplazentaren Infektion des Embryo/Fetus kommen. Der Gesundheitszustand des Trägartieres (auch serologisch) ist ein Aspekt der unbedingte Beachtung verlangt.
- Die Überwachungsbehörden können nach derzeitiger Rechtslage einen Nachweis darüber verlangen, dass Medien, Spüllösungen und nichttransfertaugliche Embryonen auf Krankheitserreger untersucht worden sind.

Weitergehende Literatur

Baillargeon P et al.. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 218(11):1803-6.

Bielanski AF et al.. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 2003;46:146-152.

Drew TW et al.. BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet Rec* 2002; 151:551

Prince MJ et al.. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev Sci Tech OIE* 2003; 22:37-60.

Rall WF. Avoidance of microbial cross-contamination of cryopreserved gametes, embryos, cells and tissues during storage in liquid nitrogen. *Embryologists Newsletter* 2003; 6:1-7. (<http://embryologists.com/acrobat/vol6issue2.pdf>)

Schaes G et al.. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in the dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998; 80(2):87-98

Starvaggi Cucuzza A et al.. Sanitary controls in bovine IVF embryo production. Proceedings 18e Reunion AETE, Rolduc, 06-07, September 2002, 230.

Stringfellow DA, Givens MD. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. Theriogenology 2000; 53:85-94.

Thibier M, Stringfellow DA. Health and Safety Advisory Committee (HASAC) of the International Embryo Transfer Society (IETS) has managed critical challenges for two decades. Theriogenology 2003;59:1067-1078.

Wrathall AE. Disease control aspects of embryo transfer. Proceedings 18e Reunion AETE, Rolduc, 06-07 September 2002, 21-29.