



Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu
Výskumný ústav živočíšnej výroby
Oddelenie genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat



Eliminácia rizika infekcie pri prenose embryí zvierat

J. Pivko, E. Kubovičová, A. Makarevič, P. Grafenau, Ľ. Riha

Nitra, 2008

Recenzenti:

Doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc., SCPV- VÚŽV Nitra
Doc. MVDr. Peter Massányi, PhD., SPU Nitra

Pod'akovanie: Táto práca bola realizovaná v rámci riešenia projektu APVT-51-00260/02 „**Riziko prenosu vírusových chorôb IBR-IPV, BVD hovädzieho dobytká ranými embryami**“.

OBSAH

	strana
Úvod.....	4
1. Vírusy a iné patogénny.....	5
2. Morfológická charakteristika a hodnotenie embryí.....	6
2.1 Popis vývojových štádií embryí.....	6
2.2 Hodnotenie kvality embryí.....	8
2.3 Zásady pri výbere prenosuschopných embryí a prevencia	8
2.4 Použitie vhodných médií a prídavkov.....	9
2.5 Postupy odstránenia patogénov	10
2.5.1 Postup pri štandardnej metóde 10 – násobného premývania.....	11
2.5.2 Premývanie embryí v médiách s trypsínom.....	14
2.6 Mikrobiologická kontrola embryí a vyplavovacích médií.....	15
3. Záver.....	15
4. Použitá literatúra.....	16

Úvod

Výmena genetického materiálu medzi krajinami, alebo v rámci krajiny, bola spočiatku limitovaná na žijúce zvieratá a zmrazené semeno. Technologický pokrok priniesol v 70. rokoch minulého storočia metódy nechirurgického získavania, kryokonzervácie a prenosu preimplantačných bovinných embryí, čím vznikla alternatíva prenosu genetického materiálu medzi populáciami dobytka, ktorá má zjavné ekonomické a humánne výhody. Rozšírenie prenosu embryí a zmeny genetického materiálu v štádiu embrya však podmienili potrebu venovať väčšiu pozornosť bezpečnosti a redukcii zdravotného rizika pri prenose embryí. Zdravotné riziko spojené s prenosom embryí nie je závislé iba na biologickom materiály (semeno, oocyty), ale tiež na podmienkach prostredia, ktorým sú gaméty/embryá vystavené (kultivačné médiá, podmienky skladovania, prenos). Zabrániť prenosu patogénov z daryň na príjemkyne cestou embryotransféru si vyžaduje dodržanie opatrení týkajúcich sa ošetrovania embryí v čase medzi získaním a prenosom. Dôležité faktory ovplyvňujúce výsledok sú aseptické prostredie laboratória, používanie aseptickéj techniky a sterilných pomôcok. Rovnako významnú úlohu zohráva použitie roztokov a médií, u ktorých máme istotu, že nie sú kontaminované. Preto sa odporúča pridávať do médií a roztokov širokospektrálne antibiotiká, ktoré slúžia ako detergenty bakteriálnych patogénov alebo kontaminujúcich mikroorganizmov.

Zona pellucida embryí získaných *in vivo* sa považuje za účinnú bariéru voči mikroorganizmom. Premývanie takýchto embryí s intaktnou *zona pellucida* sa realizujú za účelom úplného odstránenia väčšiny preskúmaných bovinných patogénov, avšak v niektorých prípadoch je potrebné dodatočné premývanie embryí, za účelom zabránenia prenosu všetkých patogénov. Použitie trypsínu je príkladom pre dodatočné premývanie embryí v určitých situáciách (Echternkamp a kol., 1989). Tiež sa odporúča podrobiť mikrobiologickému vyšetreniu vyplavovaciu, kultivačnú a premývaciu tekutinu, neoplodnené a degenerované vajíčka a embryá, ktoré nie sú vhodné na prenos za účelom dôkazu patogénov. Intaktnosť *zona pellucida* je nevyhnutným predpokladom zabránenia prieniku patogénov. Jej narušenie môže byť príčinou infekcie embryí. Ultraštruktúrálna a imunofluorescenčná analýza odhalili rozsiahle poškodenia bunkových organel v prípade, ak bola suspenzia vírusu injikovaná pod *zona pellucida*, resp. ak bola *zona pellucida* z embryí odstránená (Makarevič a kol., 2007a, b., Pivko a kol., 2005, 2006).

Predložený materiál obsahuje základné odporúčania pre chovateľov dobytka a kolektívy realizujúce embryotransfér. Vychádza z dostupnej literatúry a výskumnej činnosti kolektívu pracovníkov Oddelenia genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat SCPV-

VÚŽV Nitra a pracovníkov schváleného pracoviska ŠV a PS SR v Bratislave pod registračným číslom ETT SR 01 zaradeného do zoznamu pracovísk pre prenos embryí v rámci EU. Autori predpokladajú, že všetky publikované odporúčania týkajúce sa hygienickej manipulácie s embryami *in vitro* budú chovateľom zvierat a kolektívom realizujúcim embryotransfér slúžiť ako návod pre zabránenie prenosu patogénov embryami a tým aj šírenia ochorení v chovoch.

1. Vírusy a iné patogénny

Úloha, ktorú môže hrať prenos embryí pri prenose patogénov sa skúmala z rozličných hľadísk. Skúmal sa potenciál pre vystavenie embryí pôsobeniu špecifických patogénov, povaha interakcie embryo - patogén a účinok premývania a ošetrovania trypsínom na interakciu embryo – patogén. Robili sa tiež pokusy s určovaním, či sú infekčné patogény prítomné vo vyplavovacom médiu, alebo či sú priamo spojené s embryami získanými od infikovaných daryň, ako aj s monitorovaním zdravotného stavu príjemkýň po prenose týchto embryí.

Zoznam infekčných agens predstavuje prehľad údajov z tých pokusov, ktoré zahŕňali epidemiologické aspekty prenosu embryí pri hovädzom dobytku, kozách, ovciach a ošípaných:

1. Vírusové patogény - Africká vírusová horúčka ošípaných (ASFV); Akabane vírus (AV); Bovinný herpes vírus (BHV-1); Bovinný herpes vírus (BHV-4); Vírus bovinnej leukémie (BLV); Bovinný parvovirus (BPV); Vírus modrého jazyka (BTV); Vírus bovinnej vírusovej hnačky (BVDV); Vírus artritídy a encefalitídy kôz (CAEV); Vírus slintačky a krívačky (FMDV); Vírus cholery ošípaných (HCV); Vírus infekčnej bovinnej rinotracheitídy (IBRV); Parvovirus prasníc (PPV); Vírus pseudobesnoty (PrV); Vírus moru hovädzieho dobytku (RPV); Vírus vezikulárnej choroby ošípaných (SVDV); Vírus vezikulárnej stomatitídy (VSV); Bovinná špongioformná encefalopatia (BSE).

2. Bakteriálne patogény - *Brucella abortus* (B. abortus), *Brucella ovis* (B. ovis); *Haemophilus somnus* (H. somnus); *Campylobacter fetus* (C. fetus), *Chlamydia psittaci* (Ch. psittaci) *Mycoplasma bovis* (M. bovis); *Mycoplasma bovis genitalium* (M. bovis gen); *Mycobacterium paratuberculosis* (M. paratub.); *Ureaplasma diversum* (U. diversum).

Doposiaľ vypracované tri postupy zabezpečujú produkciu embryí prostých špecifických patogénov: testovanie daryň, premývanie embryí, alebo kombinácia testovania a premývania. Vo väčšine publikovaných výskumných prácach sa dokumentuje nízke riziko

prenosu chorôb transférom embryí, avšak význam premývania embryí bol dokázaný. V súlade s tým boli vypracované IETS štandardné postupy premývania a ošetrovania trypsínom, ktoré potvrdil Office of International Epizootics vo svojom Medzinárodnom kódexe zdravia zvierat.

2. Morfológická charakteristika a hodnotenie embryí

2.1 Popis vývojových štádií embryí

Vývoj bovinných embryí sa začína oplodnením vajíčka po ovulácii, ktorá sa vyskytuje 24-48 hodín po začiatku ruje. Embryá vstupujú do lúmenu maternice medzi štvrtým až piatym dňom. Medzi šiestym až ôsmym dňom, vývoj embryí napreduje od ranej moruly až po expandovanú blastocystu (tabuľka 1).

Výplachom rohov maternice kráv a jalovíc vyplavovacím médiom získame skupinu embryí rôznych vývojových štádií a s rôznou životaschopnosťou, ktoré ohodnotíme pod stereomikroskopom pri 50 až 100-násobnom zväčšení. Hodnotením embryí určíme ich vývojové štádiá a kvalitu, pričom sa opierame o ich morfológickú charakteristiku a chronologickú vývojovú postupnosť v súlade s medzinárodným číselným kódom (1-9) (Tabuľka č. 1).

Tabuľka 1. Prehľad vývoja raných embryí kráv, ich umiestnenie v pohlavných orgánoch a označenie medzinárodným číselným kódom

Medzinárodný číselný kód	Deň po Oplodnení	Vývojové štádium embrya	Umiestnenie embrya v pohlavných orgánoch
1	1	1-bunkové vajíčko –zygota	ampula vajcovodu
2	2	2-bunkové embryo	ampula vajcovodu
2	3	4-bunkové embryo	ampula vajcovodu
2	4	8-bunkové embryo	isthmus vajcovodu, roh maternice
2	5	16-bunkové embryo	isthmus vajcovodu, roh maternice
3	5-6	raná morula	roh maternice
4	6	kompaktná morula	roh maternice
5	7	raná blastocysta	roh maternice
6	7-8	blastocysta	roh maternice
7	8-9	expandovaná blastocysta	roh maternice
8	9	voľná blastocysta	maternica
9	9-10	predĺžená blastocysta	maternica

Oplodnené vajíčko – zygota (prvý deň, kód 1) je charakterizované jednou bunkou s vylúčeným pólovým telieskom v perivitelinovom priestore s neporušenou *zona pellucida*.

2 až 16 buniek (druhý – piaty deň, kód 2), jednotlivé vývojové štádiá sú charakterizované pravidelným výskytom voľných blastomér v počte od dvoch až do 16 buniek.

Raná morula (piaty –šiesty deň, kód 3) sa všeobecne popisuje ako skupina buniek voľných blastomér. Jednotlivé blastoméry sú jedna od druhej zreteľne oddelené a zaberajú väčšiu časť priestoru, ktorý vytvára *zona pellucida*. Perivitelinový priestor je čistý a zreteľný. Vonkajší priemer raných embryí kráv je 150-190 µm vrátane *zona pellucida*, ktorá je hrubá približne 12-15 µm. Veľkosť embryí zostáva nezmenená od zygóty počnúc až po blastocystu. V štádiu expanzie raných embryí sa ich veľkosť zväčšuje.

Kompaktná morula (šiesty deň, kód 4), jednotlivé bunky – blastoméry, ktoré formujú v tomto štádiu kompaktnú masu moruly sú jedna pri druhej a splývajú. Proces kompaktizácie je ukončený. Perivitelinový priestor je čistý.

Raná blastocysta (siedmy deň, kód 5), rané embryo začína v tomto štádiu formovať blastocélovú dutinku v podobe excentricky sa formujúceho mechúrka. V tomto štádiu vývoja už môžu byť viditeľné rozdiely medzi trofoblastom a vnútornou bunkovou masou. Perivitelinový priestor je čistý (Obr. 12/1).

Blastocysta (siedmy – ôsmy deň, kód 6), v tomto štádiu nastáva diferenciácia vonkajšej vrstvy trofoblastu od tmavšej kompaktnejšej vnútornej masy buniek. Blastocélová dutinka je rozšírená a perivitelinový priestor je zúžený (Obr. 12/2).

Expandovaná blastocysta (ôsmy – deviaty deň, kód 7), vonkajší priemer embrya sa v tomto štádiu rýchlo zväčšuje (1,2 až 1,5-krát), perivitelinový priestor sa stráca za súčasného zužovania sa *zona pellucida* až na približne tretinu pôvodnej hrúbky. V tomto štádiu získané embryá často podliehajú kolapsu, čo je charakterizované úplnou, alebo čiastočnou stratou blastocélu. *Zona pellucida* zostáva neporušená (Obr. 12/3)

Voľná blastocysta (deviaty deň, kód 8), v tomto vývojovom štádiu embryá aktívne vystupujú zo *zona pellucida* a ostávajú voľné. Majú zreteľne diferencovaný a pravidelne utváraný trofoblast, v ktorom je uzavretý excentricky sa tvoriaci embryoblast a dobre vyvinutá blastocélová dutinka. Embryo pripomína svetlý, pravidelný, okrúhly mechúrik.

Predĺžená blastocysta (deviaty – desiaty deň, kód 9), v tomto vývojovom štádiu získané embryá sú bez *zona pellucida* a charakterizuje ich zvýšená proliferácia trofoblastu a morfológická premena oválneho tvaru na trubicovitý.

2.2 Hodnotenie kvality embryí

Kvalitu získaných jednotlivých vývojových štádií raných embryí určujeme na základe morfológických kritérií embryá zaraďujeme do štyroch tried a označujeme medzinárodným číselným kódom (1-4).

Vynikajúce embryo, kód 1 – embryo je životaschopné, okrúhleho tvaru, symetrické, bunky sú rovnakej veľkosti, sfarbenia a štruktúry, bez fragmentov v perivitelinovom priestore.

Dobré embryo, kód 2 – embryo je charakteristické výskytom niekoľkých fragmentov blastomér v perivitelinovom priestore a nepravidelným tvarom a výskytom vezikúl.

Zlé embryo, kód 3 – embryo je málo životaschopné, v perivitelinovom priestore sú prítomné fragmenty blastomér a tiež niekoľko degenerovaných buniek. Charakteristická je zvýšená tvorba vezikulácie (Obr. 13/3).

Degenerované, neživé embryo a neplodnené vajíčko kód 4 - embryo má početné fragmenty blastomér, degenerované bunky, bunky rôznej veľkosti obsahujú veľké početné vezikuly a podliehajú úplnej fragmentácii (Obr. 13/1 a 2)

2.3 Zásady pri výbere prenosuschopných embryí a prevencia prieniku patogénov

Rané embryá v období prenosu charakterizujeme ako embryá, ktoré prekonalí diferenciáciu a majú funkčné dve zárodočné vrstvy, blastocélovú dutinku a nepoškodenú *zona pellucida*. Zárodočné vrstvy sú tvorené bunkami trofoblastu a bunkami embryoblastu, ktoré sú základom pre budúce embryo a plod.

V období medzi získaním a prenosom je potrebné embryá starostlivo uchovávať, aby sa zabránilo sprievodnému prenosu patogénov. Pri manipulácii s embryami je nevyhnutné použiť aseptické techniky, sterilné roztoky a sterilné pomôcky. Pre zvýšenú bezpečnosť treba do roztokov, ktoré prichádzajú do kontaktu s embryami, pridať antibiotiká.

Zona pellucida je veľmi efektívna bariéra voči mikroorganizmom a vírusom. Premytím embryí, ktoré sú uzavreté v intaktnej *zona pellucida* štandardnou metódou, by sa mala väčšina známych bovinných patogénov odstrániť. V prípade, že aj po premytí sa na povrchu *zona pellucida* embryí vyskytujú zvyšky adherovaného materiálu, je potrebné tieto embryá dodatočne premývať v médiách s trypsínom. Pre efektívnu účinnosť sa musí premývanie s trypsínom vykonávať v súlade so štandardnými metódami.

Pri výbere vyplavených raných embryí určených pre prenos sú vo všeobecnosti uplatňované tieto zásady:

- 1) U hovädzieho dobytku (kravy, jalovice), malých hospodárskych zvierat (ovce, kozy), ošípaných a koní sú najúspešnejšie prenášané rané embryá v štádiách vývoja od ranej blastocysty až po blastocystu (medzinárodný kód 5 a 6).
- 2) Najlepšie výsledky sa dosahujú pri prenose čerstvých raných embryí zatriedených do prvej a druhej triedy kvality (medzinárodný kód 1 a 2).
- 3) Pri zmrazených embryách sa odporúča iba prenos embryí zaradených do prvej triedy kvality (medzinárodný kód 1).

2.4 Použitie vhodných médií a prídavkov

Dôležitým predpokladom hygienického uchovávaní a manipulácie s embryami je tiež výber vhodných médií a vyhodnocovanie embryí na prítomnosť patogénov.

Všetky médiá, roztoky, séra, enzýmy a kryoprotektívne látky, ktoré vstupujú do kontaktu s embryom musia byť zbavené kontaminujúcich látok a živých mikroorganizmov. Môžu sa zakúpiť ako hotové sterilné preparáty, alebo sa môžu pripraviť v laboratóriu. Ak sú zložky médií nakupované ako vhodné pre použitie sterilne pripravené, zvyčajne by mali pochádzať zo spoľahlivých zdrojov. Ak sterilizáciu robíme v laboratóriu, treba používať nasledovné zásady a postupy, ktoré sú podrobne popísané v práci Pivko a kol. (2000).

Vo všeobecnosti pre kompletné médiá platí, že ak sa skladujú pri 4 °C, sú použiteľné do dvoch týždňov. Niektoré médiá (napr. Minimálne esenciálne médium, Whittenovo médium, atď.) sa však môžu skladovať dlhšiu dobu. Zmeny pH skladovaných médií sú odozvou na zhoršenie niektorých zložiek média a škodlivé môže byť tiež vystavenie ultrafialovému a dennému svetlu. Niektoré komponenty (napr. L-glutamín, pyruvát) sa spontánne degradujú a treba ich do média pridávať tesne pred použitím. Naopak, soľ a zásobné roztoky neobsahujúce proteíny (t.j. sérum) sa s menšou pravdepodobnosťou kontaminujú a môžu byť skladované v chladničke pri 4 °C počas 1 až 6 mesiacov. Na prípravu základných roztokov solí a médií je potrebné používať deionizovanú vodu, ktorej dlhodobé skladovanie sa neodporúča.

U všetkých médií a kryoprotektívnych roztokov je potrebné odmerať pH a osmolaritu ešte pred sterilizáciou. Sterilita média je závislá od filtrácie (veľkosť pórov 0,22 μm) a skladovania v sterilných sklenených silikónovaných, borosilikónovaných, alebo plastických skúmavkách.

Sterilitu proteínových komponentov médií možno ťažko verifikovať. Osobitné riziko môže predstavovať sérum používané vo vyplavovacom, premývacom a kultivačnom médiu, preto je pri selekcii séra potrebná opatrnosť. Vhodné je použiť buď frakciu V bovinného

sérového albumínu (BSA), alebo gama žiarením sterilizované sérum. Séra sa musia zbaviť vírusov aj v prípade, že uznané produkty, schválené pre export, schválila importujúca krajina. Všeobecné použitie antibiotík ako dodatkov do vyplavovacích a kultivačných médií svedčí o kontrole patogénov, avšak v testoch na sterilitu médií sa ich prídavok neodporúča, pretože môžu maskovať prítomnosť utajených kontaminantov.

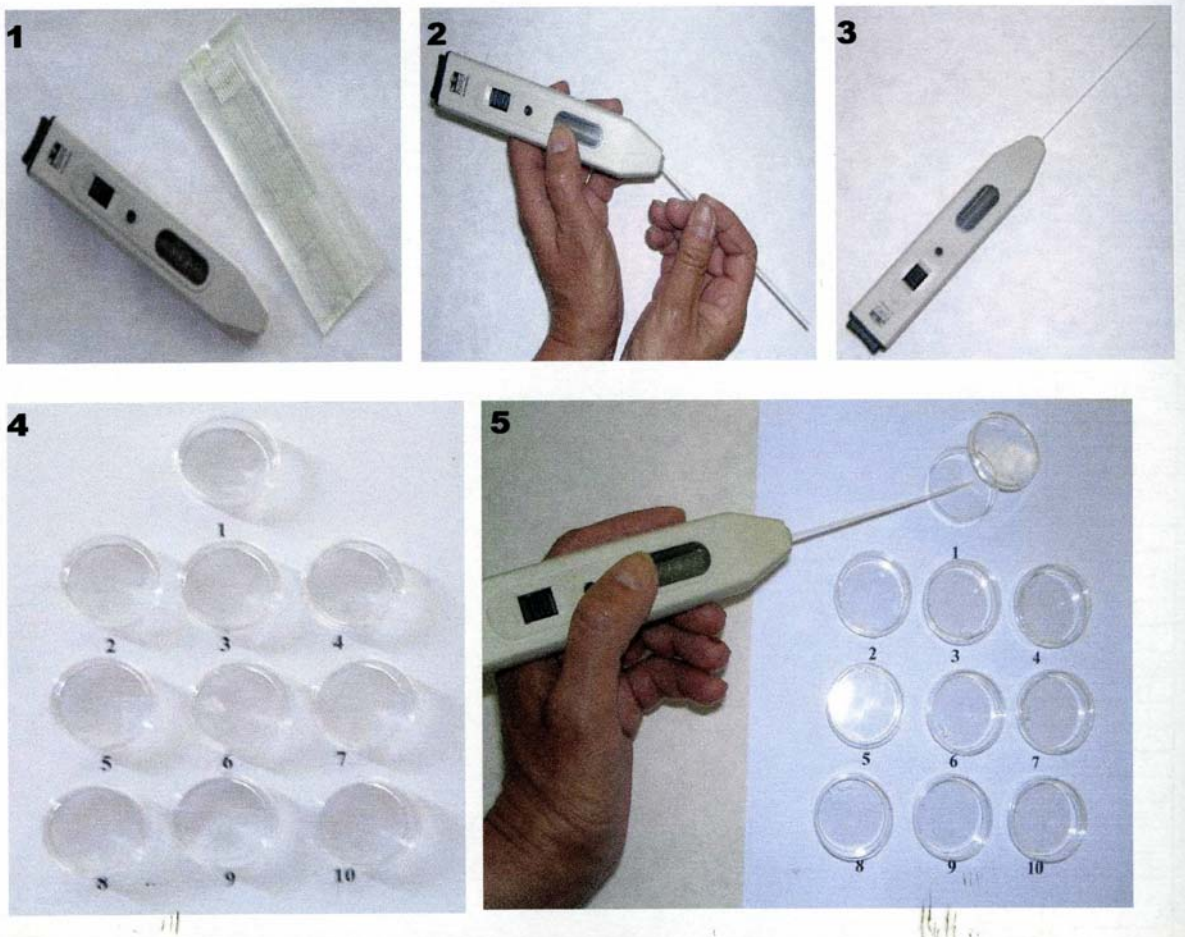
Všetky novopripravené médiá je potrebné otestovať na schopnosť podporovať vývoj embryí a na kontamináciu. Ako model môžu byť využité myšacie embryá. Treba mať však na pamäti, že embryá rozdielnych druhov majú rozdielne kultivačné požiadavky a senzitivitu na toxíny. Alternatívou odhadu kvality kultivačného média môže byť skúška motility spermii chrčka (HSMA), ktorá rýchlo (do hodiny) podáva informácie o kvalite vody a dodatkov v médiu ako aj o potenciálnej toxicite produktov, ktoré sa na prípravu média používajú.

2.5 Postupy odstránenia patogénov

Vlastné premývanie embryí sa považuje za efektívny spôsob odstránenia vysokej hladiny rôznych patogénov zo *zona pellucida* intaktných embryí. Iba embryá s intaktnou *zona pellucida* sa môžu efektívne premyť.

Odporúčaná (štandardná) metóda zahŕňa 10-násobné premytie embryí v skupinách po 10 alebo menej v petriho miskách s obsahom 2 ml kultivačného média. Pri premývaní je potrebné používať sterilné 20 µl mikropipety a meniť ich medzi každým premytím. Pipetovacie zariadenie a techniku treba používať tak, aby sa žiadna z pomôcok nedostala do kontaktu s premývacím médiom. Na obrázkoch 1 až 5 uvádzame vhodné pomôcky na manipuláciu s embryami a znázornenie štandardného postupu premývania.

Ak prenášame pri premývaní embryá v objeme 20 µl z jednej misky do druhej, dosiahneme riedenie 1:100 (t.j. do každej nasledujúcej misky prenesieme pri premývaní 1/100 objemu premývacieho roztoku z predchádzajúcej misky). Všetky embryá je potrebné v každej miske premývať jemným pipetovaním a dôležitá je tiež skutočnosť, že spoločne možno premývať iba embryá od jednej dárkyne..Spoločne možno premývať iba embryá od jednej dárkyne.



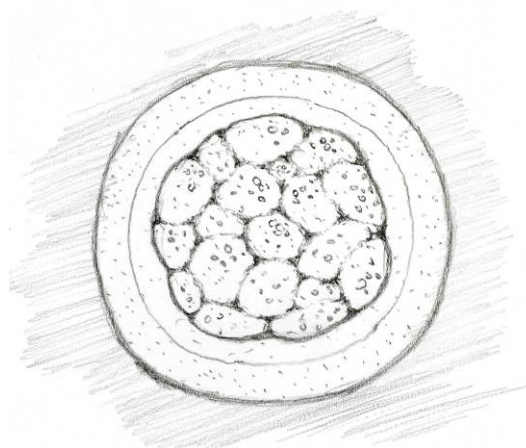
Pomôcky na premývanie embryí: 1-3 – pejetkovač s pipetami; 4–Petriho misky s premývacou tekutinou; 5 – znázornenie postupu štandardného (10 – násobného) premývania.

2.5.1 Štandardná metóda 10 –násobného premývania

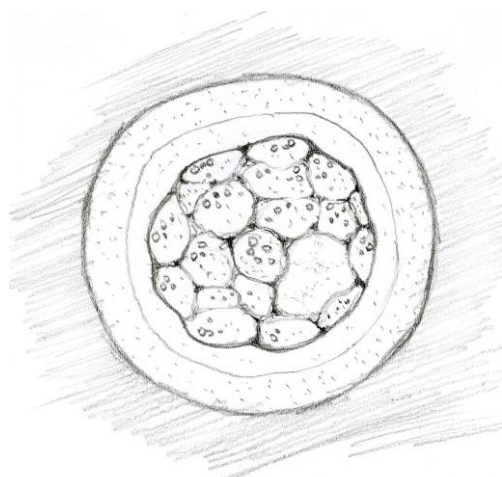
1. Pod stereomikroskopom (Obr. 6) pri zväčšení minimálne 100 x starostlivo prehliadnuť embryá po celom povrchu.
2. Zistiť, či embryá nemajú defekty *zona pellucida* (Obr.7-8) a nenachádza sa na jej povrchu adherovaný materiál (zvyšky hlienov a nečistôt) (Obr. 9) a ani na embryách bez *zona pellucida* (Obr. 11)
3. Adherovaný materiál mechanicky odstrániť z povrchu embryí pred premytím.
4. Embryá s defektami *zona pellucida*, (Obr. 10) resp. embryá z ktorých sa adherovaný materiál nedal odstrániť nie sú vhodné na prenos, treba ich vyradiť.
5. Embryá u ktorých sa zistí poškodená *zona pellucida* po premytí treba vyradiť azvyšné embryá opakovane premyť v čerstvých roztokoch.
6. Embryá je potrebné premyť minimálne 10 krát
7. Pri prenose embryí z jednej premývacej kvapky do druhej, použiť vždy novú sterilnú pipetu.



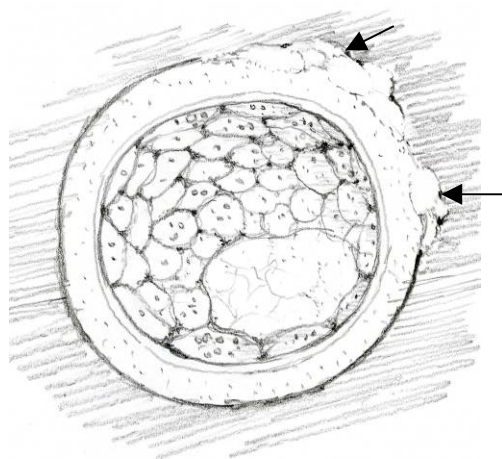
Obrázok 6 Svetelný stereomikroskop



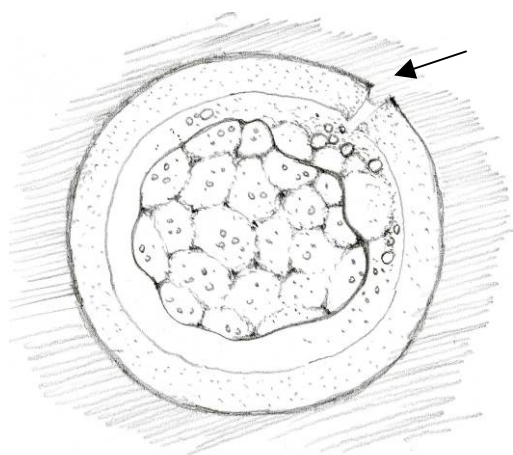
Obrázok 7 – Bovinná morula -
zona pellucida intaktná (kód 4)



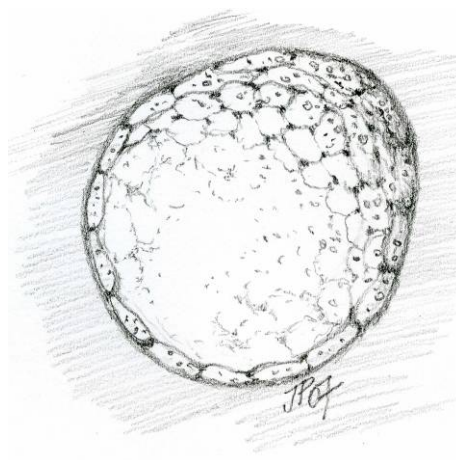
Obrázok 8–Včasná blastocysta –
zona pellucida intaktná (kód 5)



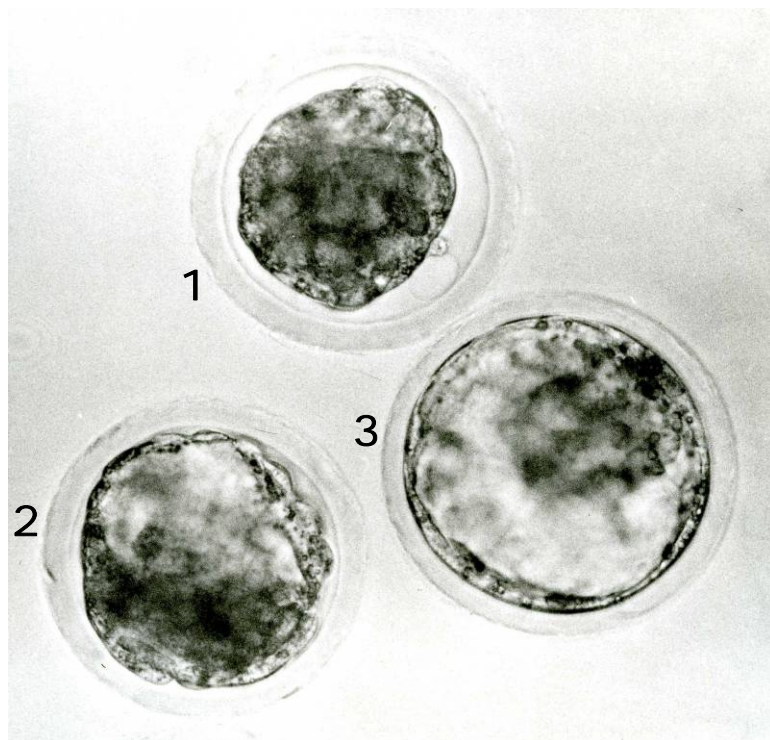
Obrázok 9 – Blastocysta s adherovaným
materiálom (šípky) na zona pellucida (kód 6)



Obrázok 10 – Morula s poškodenou zona
(šípka) pellucida (kód 4)



Obrázok 11 – Voľná blastocysta
(uvoľnená zo zona pellucida; kód – 8)



Obrázok 12 Bovinné embryá získané vyplavením rohov matrice klasifikované podľa ich vývoja vhodné na prenos (1 – Raná blastocysta; kód 5; 2 – Blastocysta; kód 6; 3 – Expandovaná blastocysta, kód 7)



Obrázok 13 Bovinné embryá získané vyplavením rohov matrice klasifikované podľa ich kvality – nevhodné na prenos (1 – Neoplodené vajíčko (kód 4) 2 – 16-bunkové boviné embryo – fragmentované (kód 4), 3 – Kompaktná morula – (kód 3).

2.5.2 Premývanie embryí v médiách s trypsínom

Premývanie intaktných *in vivo* derivovaných embryí s intaktnou *zona pellucida* v médiách s trypsínom sa ukázalo byť efektívne pre odstránenie cudzích bunkových elementov,

alebo inaktiváciu niektorých patogénov schopných priľnúť, alebo inak asociovať so *zona pellucida* embryí nachádzajúcich sa vo vajcovode a rohu maternice.

Ak neboli cudzie bunkové elementy a adherované nečistoty odstránené zo *zona pellucida* štandardným premývacím postupom (viď. vyššie) je potrebné, pri dodržaní všetkých ostatných zásad uvedených v štandardnom premývacom postupe, použiť premývanie embryí v médiách s trypsínom podľa nasledovného postupu:

1. Získané embryá dárkyň hodnotiť stereomikroskopom pri 50 až 100 násobnom zväčšení za účelom zistenia intaktnosti *zona pellucida* a bunkových zvyškov a nečistôt na jej povrchu
2. S embryami pracovať v skupinách maximálne po 10 embryí od každej dárkyne osobitne.
3. Skupinu embryí 5 krát premyť v pufovanom fosfátovom roztoku (PBS) bez Ca^{++} a Mg^{++} , pH 7,2-7,4 s obsahom širokospektrálnych antibiotík a 0,4% bovinného sérového albumínu.
4. Skupinu embryí 2 krát premyť po dobu 60 až 90 sekúnd, v roztoku PBS (bez Ca^{++} a Mg^{++}) s 0,25% trypsínom (pH 7,6-7,8). Dôležité je, aby bol trypsín skladovaný podľa návodu. Roztoky obsahujúce trypsín sa musia pripravovať čerstvé tesne pred použitím. Ak sa trypsínové roztoky skladujú dlhšie, rozmrazené strácajú enzymatickú aktivitu.
5. Po premytí v roztoku s trypsínom skupinu embryí 5 krát premyť v PBS s obsahom antibiotík (1% roztoku antibiotic-antimycotic, Gibco BRL, Lofar, Rakúsko) a 2% fetálneho teľacieho séra (Gibco BRL, Lofar, Rakúsko.). Roztok obsahujúci sérum sa používa na premývanie po ovplyvnení s trypsínom za účelom inaktivácie zostatkovej enzymatickej aktivity trypsínu.

2.6 Mikrobiologická kontrola embryí a vyplavovacích médií

Sterilitu embryí môžeme odvodzovať aj od zdravotného stavu dárkyň a plemenníkov, resp. testovaním ďalších vzoriek asociovaných s procedúrami získavania embryí. V prípade podozrenia na možnosť výskytu patogénnych agensov vo vyplavovacej tekutine odporúčame okrem štandardných premývacích metód aj mikrobiologickú a virologickú kontrolu fragmentovaných embryí a neoplođených vajíčok a vyplavovacích tekutín.

Po prefiltrovaní vyplavovacej tekutiny a získaní embryí, je potrebné vyplavovaciú tekutinu dať do sterilnej nádoby a 30 minút sedimentovať. Po tom, ako sú vhodné embryá odobrané, uložíme fragmentované embryá a neoplođené vajíčka spolu so sedimentovanými zvyškami vo vyplavovacej tekutine do sterilných skúmaviek a po ich označení dopravíme do príslušného regionálneho veterinárneho a potravinového ústavu.

Zdravotnú nezávadnosť premytých embryí nám môže potvrdiť tiež otestovanie roztokov z posledných premytí. Dôležité tiež je, aby boli vzorky po odobratí správne

spracované a skladované. Ak sú testované v ten istý deň, je potrebné ich skladovať pri 4 °C. V prípade ak sa testy nerobia v ten istý deň, je potrebné vzorky uskladniť pri teplote -70 °C, alebo nižšej až do doby, kedy sa budú testy realizovať.

3. Záver

Rýchle postupujúci vývoj v technológiách prenosu embryí môže mnohé zmeniť. Zmeny môžu nastať v postupoch prípravy embryí pred prenosom, v technológiách oplodnenia a kultivácie *in vitro*, resp. v zmene patogenity infekčných agensov. Všetky tieto inovácie môžu zvýšiť potenciálne riziko prenosu patogénov embryami. Preto je veľmi dôležité venovať pozornosť meniacim sa technológiám a ich exploatacii vo vzťahu k zdraviu našej populácie hospodárskych zvierat. Z tohto dôvodu je v súčasnej dobe správne využívanie otestovaných procedúr veľmi aktuálne a dôležité a bez výhrady v plnej miere závisí od etickej a technologickej vyspelosti tých, ktorí prenos embryí realizujú, či už vo výskume, alebo v praxi.

4. Použitá literatúra

1. Brock, K. Quality control for materials of animal origin used in embryo production and transfer. In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M.: Manual of the International Embryo Transfer Society, pp. 135-140, 1998.
2. Echtenkamp, S.E., Kappes, S.M., Maurer, R.R. (1989). Exposure of bovine embryos to trypsin during washing does not decrease embryonic survival. *Theriogenology*, 32, pp. 131-137.
3. Kubovičová, E., Pivko, J., Makarevič, A., Grafenau, P., Riha, L., Parkányi, V.: Vplyv herpesvírusu BHV-1 na vitalitu raných bovinných embryí *in vitro*. In: Reprodukčná medicína: Zborník z vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou: Košice, SR, 25. február 2005. Košice: LF UPJŠ a FN L. Pasteura, 2005, s. 83-84.
4. Kubovičová, E., Pivko, J., Makarevič, A., Grafenau, P., Parkányi, V., Riha, Ľ. - CHRENEK, P.: Vplyv bovine viral diarrhoea vírusu na vitalitu včasných embryí *in vitro*. In: *J. Farm Anim. Sci.: Ved. pr. VÚŽV v Nitre*, 38, 2005, s. 13-16.
5. Kubovičová, E., Pivko, J., Makarevič, A., Grafenau, P., Riha, Ľ., Parkányi, V.: Vplyv vírusov (BHV-1 a BVDV) na vitalitu včasných bovinných embryí *in vitro*. In: VI. Celoslovenský seminár z fyziológie živočíchov: Nitra, SR, 8.-9.6.2005: Zborník Nitra: SPU, 2005, s. 21-22.
6. Makarevich A.V., Pivko J., Kubovicova E., Chrenek P. Slezakova M., Louda F.: Development and viability of bovine pre-implantation embryos after the *in vitro* infection with bovine herpesvirus-1 (BHV-1): immunocytochemical and ultrastructural studies. *Zygote*, 15, 2007, 307-315.
7. Makarevich A.V., Pivko J., Kubovicova E., Chrenek P., Slezakova M. Viability and ultrastructural morphology of bovine pre-implantation embryos exposed to bovine herpesvirus-1 *in vitro*. *Int.Conf. Farm Anim. Reprod. „From Egg to Embryo“* (Rolduc,

- Kerkrade, The Netherland, May 27-31, 2007) Book of Abstr. p.85.
8. Pivko, J., Grafenau, P. Sokol, J. (2000). Prenos raných embryí zvierat. Garmond, Nitra, 212 s. (SBN: 80-7148-038-X)
 9. Pivko, J., Kubovičová, E., Makarevič, A. V., Parkányi, V., Grafenau, P., Riha, L.: Ultraštruktúrálly obraz boviných embryí po infekcii s *bovine viral diarrhoea* vírusom. In: J. Farm Anim. Sci.: Ved. pr. VÚŽV v Nitre, 38, 2005, s. 9-11.
 10. Pivko, J., Kubovičová, E., Makarevič, A.V., Parkányi, V., Grafenau, P., Riha, L., Zibrín, M., Kačmárik, J.: Infekcia raných boviných embryí vírusom BHV-1: ultraštruktúrálly obraz. In: Reprodukčná medicína: Zborník z vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou: Košice, SR, 25. február 2005. Košice: LF UPJŠ a FN L. Pasteura, 2005, s. 105-106.
 11. Pivko, J., Louda, F., Makarevič, A., Kubovičová, E., Hegedušová, Z., Lakomá, Z.: Bezpečnosť a zdravotné riziko pri prenose embryí hospodárskych zvierat: AGRO magazín, Pole Stáje Technika. Júl 2006 s. 28-30.
 12. Riddell, K.P., Stringfellow, D.A. (1989). The use of antibiotics in media for recovery, culture and storage of embryos. In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M.: Manual of the International Embryo Transfer Society, pp. 85-92.
 13. Riddell, K.P., Stringfellow, D.A., Gray, B.W., Riddell, M.G., Wright, J.C., Galik, P.K. (1993). Structural and viral asociation comparisons of bovine zona pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova. Theriogenology, 40, pp. 281-291.
 14. Schiewe, M. General hygiene and quality control practices in an embryo production laboratory. (1989). In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M.: Manual of the International Embryo Transfer Society, pp. 93-102.
 15. Singh, E.L., Hare, W.C.D., Thomas, F.C., Eaglesone, M.D., Bielanski, A. (1983). Embryo transfer as a means of controlling the transmisssion of viral infections. IV. Non-transmission of infectious bovine rhinotracheitis/vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. Theriogenology, 20, pp. 169-176.
 16. Stringfellow, D.A., Seidel, S.M. (1998). Manual of the International Embryo Transfer Society. Published April, 1998 by International Embryo Transfer Society 1111 North Dunlap Avenue; Savoy, Illinois, Illinois 61874, USA.
 17. Stringfellow, D.A., Lauerman, L.H., Nasti, K.B., Galik, P.K.(1990). Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. Theriogenology, 34, pp. 427-434.