

**Aus dem Institut für Tierzucht und Tierverhalten, Mariensee, der
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig und dem
Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover**

**Die Übertragbarkeit des „Klassischen Schweinepestvirus“
durch *in vivo* und *in vitro* produzierte porcine Embryonen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

**vorgelegt von
Ellen Schüürmann
aus Isselburg**

Hannover 2001

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med. vet. D. Rath

1. Gutachter: Prof. Dr.med.vet. D. Rath
2. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr.med.vet. E. große Beilage

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2001

Meinen Eltern gewidmet

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muß sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.

Johann Wolfgang von Goethe

aus: Italienische Reise

16.03.1787

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung | 13 |
| 2 | Literaturübersicht | 15 |
| 2.1 | Die Klassische Schweinepest | 15 |
| 2.1.1 | Epidemiologie | 15 |
| 2.1.2 | Taxonomie..... | 16 |
| 2.1.3 | Viruscharakterisierung | 16 |
| 2.1.3.1 | Morphologie und Genomorganisation..... | 16 |
| 2.1.3.2 | Die Eigenschaften des Klassischen Schweinepestvirus..... | 17 |
| 2.1.4 | Pathogenese | 17 |
| 2.1.5 | Übertragung..... | 18 |
| 2.1.6 | Klinik und Pathologie | 19 |
| 2.1.7 | Kreuzreaktivität | 21 |
| 2.2 | Entwicklung und Struktur präimplantatorischer Embryonen | 22 |
| 2.2.1 | Struktur eines Embryos | 22 |
| 2.2.2 | Die Zona Pellucida | 24 |
| 2.2.2.1 | Definition..... | 24 |
| 2.2.2.2 | Die Struktur der Zona pellucida | 24 |
| 2.2.2.3 | Die Glykoproteine der Zona pellucida..... | 25 |
| 2.2.3 | Vergleich der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Entwicklung von Embryonen..... | 28 |
| 2.3 | Kontamination von Embryonen mit Viren..... | 30 |
| 2.3.1 | Kontaminationsquellen und -ursprung..... | 30 |
| 2.3.1.1 | Spendertiere | 32 |
| 2.3.1.2 | Empfängertiere | 32 |
| 2.3.1.3 | Zusätze | 33 |
| 2.3.2 | Technik zur Handhabung von Embryonen zwischen Gewinnung und Transfer | 33 |
| 2.4 | <i>In-vitro</i> -Kultivierung von Embryonen mit Viren..... | 35 |
| 2.4.1 | Interaktion von Viren und bovinen Embryonen..... | 35 |
| 2.4.2 | Interaktion von Viren und porzinen Embryonen..... | 38 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 3 | Material und Methoden..... | 42 |
| 3.1 | Embryonenerzeugung..... | 42 |
| 3.1.1 | <i>In-Vivo</i> -Erzeugung von frühen Embryonalstadien | 42 |
| 3.1.2 | <i>In-vitro</i> Erstellung von Embryonen..... | 43 |
| 3.1.2.1 | Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe..... | 43 |
| 3.1.2.2 | <i>In-Vitro</i> -Maturation der unreifen Oozyten..... | 44 |
| 3.1.2.3 | <i>In-Vitro</i> -Fertilisation..... | 45 |
| 3.1.2.3.1 | Vorbereitung der Oozyten..... | 45 |
| 3.1.2.3.2 | Vorbereitung der Spermien und <i>In-Vitro</i> -Befruchtung..... | 45 |
| 3.2 | Virologische Methoden | 46 |
| 3.2.1 | Zellkultur | 46 |
| 3.2.2 | Zellpassage und Vermehrung..... | 46 |
| 3.2.2.1 | Zellkulturüberstand | 47 |
| 3.2.3 | KSP-Virus..... | 47 |
| 3.2.3.1 | Virusvermehrung | 47 |
| 3.2.3.2 | Virustitration..... | 48 |
| 3.2.3.2.1 | Rücktitration..... | 48 |
| 3.2.4 | Virusnachweis | 48 |
| 3.2.4.1 | Direkte Immunfärbung (AEC-Färbung)..... | 48 |
| 3.2.4.1.1 | Auswertung der direkten Immunfärbung und Beurteilung der Virusinfektion..... | 49 |
| 3.3 | Versuchsaufbau..... | 50 |
| 3.3.1 | Infektion von <i>in vitro</i> produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida..... | 51 |
| 3.3.2 | Infektion von <i>in vivo</i> produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida..... | 52 |
| 3.3.3 | Infektion von <i>in vitro</i> produzierten porzinen Embryonen nach Ablösung der Zona pellucida | 54 |
| 3.3.4 | Statistische Auswertung | 56 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4 | Ergebnisse | 57 |
| 4.1 | Vorversuch: Titerverlauf des KSP-Virus im Embryo- kulturmedium NCSU 23 in Abwesenheit empfänglicher Zellen..... | 57 |
| 4.2 | KSPV-Empfänglichkeit von <i>in vitro</i> produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida..... | 58 |
| 4.3 | KSPV-Empfänglichkeit von <i>in vivo</i> produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida..... | 60 |
| 4.4 | Beeinflussung der Entwicklungsfähigkeit von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> produzierten Embryonen durch das KSPV | 63 |
| 4.5 | KSPV-Infektion von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen nach Ablösung der Zona pellucida..... | 65 |
| 4.6 | KSPV-Infektion von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida bei einer verkürzten Inkubationszeit (48h) | 67 |

| | | |
|------|--|-----|
| 5 | Diskussion..... | 68 |
| 5.1 | Virustiter..... | 68 |
| 5.2 | Infektion von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> produzierten porzinen Embryonen mit dem KSPV | 69 |
| 5.3 | Infektion von <i>in vitro</i> produzierten porzinen Embryonen ohne Zona pellucida mit dem KSPV | 73 |
| 5.4 | Einfluß des KSPV auf die Entwicklung von <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> erstellten Embryonen | 74 |
| 5.5 | Schlußfolgerungen..... | 79 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 81 |
| 7 | Summary..... | 83 |
| 8 | Samenvatting | 85 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 87 |
| 10 | Anhang..... | 108 |
| 10.1 | Medienzusammensetzung..... | 108 |
| 11 | Verzeichnis der Abbildungen..... | 114 |
| 12 | Verzeichnis der Tabellen..... | 115 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| Abb. | <u>Ab</u> bildung |
| AEC | 3- <u>A</u> mino-9- <u>E</u> thyl <u>c</u> arbazol |
| Aqua bidest. | <u>A</u> qua <u>b</u> idestillata |
| ASPV | <u>A</u> frikanisches <u>S</u> chweine <u>p</u> est <u>V</u> irus |
| ATV | <u>A</u> adjusted- <u>T</u> rypsin- <u>V</u> ersen |
| BDV | <u>B</u> order <u>D</u> isease <u>V</u> irus |
| BFAV | <u>B</u> undes <u>f</u> orschungs <u>a</u> nstalt für <u>V</u> iruskrankheiten |
| BHV-1 | <u>B</u> ovines <u>H</u> erpes <u>v</u> irus-1 |
| BSA | <u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin |
| BVD | <u>B</u> ovine <u>V</u> irus <u>D</u> iarrhöe |
| BVDV | <u>B</u> ovines <u>V</u> irus <u>D</u> iarrhöe <u>V</u> irus |
| BZ | <u>B</u> lastozysten |
| BWR | Blastozystenrate |
| °C | Grad <u>C</u> elsius |
| cp | <u>c</u> ytopathic |
| db-cAMP | <u>d</u> ibutryl- <u>c</u> Adenosin <u>m</u> onophoshat |
| EDTA | <u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etra- <u>A</u> cetate (Äthylendiamintetraessigsäure) |
| EDULB | <u>E</u> agle's Minimum Essential Medium modifiziert nach <u>D</u> ulbecco und Freeman |
| EM | <u>E</u> lektronen <u>m</u> ikroskop |
| EMEM | <u>E</u> agle's <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium |
| ER | <u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum |
| EU | <u>E</u> uropean <u>U</u> nion |
| FFU | <u>F</u> ocus <u>f</u> orming <u>u</u> nit |
| FKS | <u>F</u> oetales (fetales) <u>K</u> älber <u>S</u> erum |
| FSH | <u>F</u> ollikel <u>S</u> timulierendes <u>H</u> ormon |
| g | <u>G</u> ramm |

| | |
|-------------------|---|
| GV | <u>G</u> erminal <u>V</u> esicle |
| h | engl. <u>h</u> our, Stunde |
| hCG | <u>h</u> uman <u>C</u> horionic <u>G</u> onadotropin |
| I.E. | <u>I</u> nternationale <u>E</u> inheit |
| IBR | <u>I</u> nfektiöse <u>B</u> ovine <u>R</u> hinotracheitis |
| IETS | <u>I</u> nternational <u>E</u> mbryo <u>T</u> ransfer <u>S</u> ociety |
| IPV | <u>I</u> nfektiöse <u>P</u> ustulovaginitis |
| IVF | <u>I</u> n- <u>V</u> itro- <u>F</u> ertilisation |
| IVM | <u>I</u> n- <u>V</u> itro- <u>M</u> aturation |
| IVP | <u>I</u> n- <u>V</u> itro- <u>P</u> roduktion |
| k | <u>K</u> ilo (10^3) |
| Kap. | <u>K</u> apitel |
| Kat.-Nr. | <u>K</u> atalog- <u>N</u> ummer |
| kDa | <u>k</u> ilo <u>D</u> alton |
| KID ₅₀ | <u>K</u> ultur <u>i</u> nfektiöse <u>D</u> osis 50 |
| KOK | <u>K</u> umulus- <u>O</u> ozyten- <u>K</u> omplex |
| KSP | <u>K</u> lassische <u>S</u> chweinepest |
| KSPV | <u>K</u> lassisches <u>S</u> chweinepest <u>V</u> irus |
| l | <u>L</u> iter |
| log | <u>l</u> ogarithmus |
| m | <u>m</u> illi ($x 10^{-3}$) |
| MDBK | <u>M</u> adin <u>D</u> arvy <u>B</u> ovine <u>K</u> idney |
| mKRB | <u>m</u> odifizierte <u>K</u> rebs- <u>R</u> inger- <u>B</u> icarbonat- (Lösung) |
| MKS | <u>M</u> aul- und <u>K</u> lauenseuche |
| n | Anzahl |
| NaCl | <u>N</u> atrium <u>C</u> hlorid |
| nAK | <u>n</u> eutralisierende <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper |
| ncp | <u>n</u> on <u>c</u> ytopathic |
| NCSU | <u>N</u> orth <u>C</u> arolina <u>S</u> tate <u>U</u> niversity |
| NHS | <u>N</u> eben <u>h</u> odens <u>s</u> chwanz |

| | |
|----------------|---|
| nm | <u>N</u> ano(10 ⁻⁹) <u>m</u> eter |
| p.i. | <u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem |
| PBS | <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| pfu | <u>p</u> laque <u>f</u> orming <u>u</u> nit |
| PK (15) A | <u>P</u> orcine <u>K</u> idney (15) <u>A</u> msterdam |
| PMSG | <u>P</u> regnant <u>M</u> are's <u>S</u> erum <u>G</u> onadotropin |
| PPV | <u>P</u> orzines <u>P</u> arvo <u>v</u> irus |
| PRRS | <u>P</u> orcine <u>R</u> eproductive and <u>R</u> espiratory <u>S</u> yndrom |
| RNA | <u>R</u> ibon <u>u</u> kleinsäure (Ribonuclein <u>a</u> cid) |
| RT-PCR | <u>R</u> everse- <u>T</u> ranskriptase <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaktion |
| SEM | <u>S</u> canning <u>E</u> lectron <u>M</u> icroscopy |
| SHV | <u>S</u> uide (Porzine) <u>H</u> erpes <u>v</u> irus |
| μ | mikro (x 10 ⁻⁶) |
| VE-Wasser | <u>v</u> ollentmineralisiertes Wasser |
| vs | <u>v</u> ersus |
| VSKV | <u>V</u> irus der <u>V</u> esikulären <u>S</u> chweine <u>k</u> rankheit |
| VSV | <u>V</u> esikuläres <u>S</u> tomatitis <u>V</u> irus |
| Wdh. | <u>W</u> ieder <u>h</u> olung |
| xg | multipliziert mit 9,81 m/s ² (Erdbeschleunigung) |
| ZP | <u>Z</u> ona <u>P</u> ellucida |
| χ ² | Chi-quadrat |

1 Einleitung

Die Klassische Schweinepest (KSP) ist eine international anzeigepflichtige Infektionskrankheit der Haus- und Wildschweine und sie ist eine der wirtschaftlich bedeutsamsten Tierseuchen. Die volkswirtschaftlichen Verluste allein während der Ausbrüche 1993-1995 beliefen sich in Deutschland auf 122 Mio. DM (MÜLLER 1998).

Als Ursachen der Primärausbrüche sind in erster Linie die Verfütterung von nicht ausreichend erhitzten Speiseabfällen und der direkte oder indirekte Kontakt zum Schwarzwild zu nennen (KRASSNIG u. SCHULLER 1993; KADEN et al. 1994; TEUFFERT et al. 1997; TEUFFERT et al. 1998; FRITZEMEYER et al. 2000). Die Weiterverbreitung der KSP erfolgt durch den Handel mit infizierten Tieren, direkte Nachbarschaft zu einem infektiösen Herd, Personen- und Fahrzeugverkehr (VALDER 1984; AHL 1994; KADEN et al. 1994; TEUFFERT et al. 1997, TEUFFERT et al. 1998 b; FRITZEMEYER et al. 2000).

Die Ausbrüche der KSP 1997 in den EU-Mitgliedsstaaten Deutschland, Italien, Spanien und den Niederlanden haben gezeigt, daß immer noch nicht alle Übertragungswege der KSP geklärt sind. 1997 war in einer holländischen Besamungsstation KSP diagnostiziert worden. Sperma der infizierten Tiere war schon weitreichend verschickt worden. Bis zum Ausbruch der KSP 1997 waren Versuche zur Übertragung mittels Sperma noch nie durchgeführt worden. FLÖGEL et al. (2000) und DE SMIT et al. (2000) stellten fest, daß das Klassische Schweinepestvirus (KSPV) in geringer Menge im Sperma ausgeschieden wird. Die Übertragung der KSP mittels artifizieller Insemination ist demnach möglich. Die Gefahr, die KSP durch den Spermahandel in KSP-freie Länder, wie beispielsweise Australien oder die USA etc., einzuschleppen, besteht.

Die Entwicklung in der Biotechnologie ist mittlerweile so weit fortgeschritten, daß der unchirurgische Embryotransfer beim Schwein in Kürze in die Praxis eingeführt wird. Damit steigt die Gefahr, Tierseuchen durch den Export von Embryonen in KSP-freie Länder zu verbreiten. Untersuchungen bezüglich der Übertragung von Infektionskrankheiten mittels Embryonen liegen beim Schwein nur im begrenzten

Umfang vor. DULAC u. SINGH (1988) untersuchten porcine *in vivo* erstellte Embryonen auf ihre Empfänglichkeit für KSP. Untersuchungen für *in vitro* produzierte Embryonen liegen bislang nicht vor.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob unterschiedlich produzierte porcine Embryonen für das KSPV empfänglich sind. Untersucht werden sollten komplett *in vivo* erstellte und komplett *in vitro* produzierte Schweineembryonen. Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

Bestehen Unterschiede in der Empfänglichkeit für das KSPV zwischen den unterschiedlich erstellten Embryonen?

Wird die Entwicklung der Embryonen durch das Virus beeinflusst und besteht dabei ein Unterschied zwischen den *in vivo* und *in vitro* erstellten Embryonen?

Weiterhin sollte im positiven Fall geklärt werden, ob das KSPV in den Embryo eindringt oder ob es sich nur außen an die Zona pellucida anheftet.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Klassische Schweinepest

2.1.1 Epidemiologie

Die Klassische Schweinepest (KSP) wurde im 19. Jahrhundert erstmalig in Ohio/USA beschrieben. Ihre Ausbreitung erfolgte vermutlich mit der Besiedlung der USA. In den sechziger Jahren des neunzehnten Jahrhunderts wurde die KSP nach England verschleppt und gelangte über Skandinavien in das restliche Europa (MAHNEL u. MAYR 1974). Ihre Verbreitung erfolgte weltweit, allerdings gelten einige Länder seit der Durchführung intensiver Bekämpfungsmaßnahmen als frei von der KSP. Zu den KSP-freien Ländern gehören beispielsweise neben Nordamerika und Australien, die meisten EU-Mitgliedsstaaten (FAO-OIE-WHO 1997).

Stand früher die hohe Verlustrate der infizierten Tiere von 90 % im Vordergrund, so sind es heutzutage die wirtschaftlichen Aufwendungen in Form von Keulungsprogrammen, finanziellen Entschädigungen, immunprophylaktischen Maßnahmen etc., die zu hohen finanziellen Verlusten führen (MAHNEL u. MAYR 1974; MOENNIG 1994; TEUFFERT et al. 1997; FRITZEMEYER et al. 2000).

Haus- und Wildschweine sind unter natürlichen Verhältnissen gleichermaßen empfänglich für das KSP-Virus (BRUGH et al. 1964; DEPNER et al. 1995). Die Verfütterung von nicht ausreichend erhitzten KSPV-haltigen Küchen- und Speiseabfällen und der direkte oder indirekte Kontakt zu Wildschweinen spielen eine vorrangige Rolle bei der Auslösung von Primärausbrüchen (KRASSNIG u. SCHULLER 1993; KADEN et al. 1994; TEUFFERT et al. 1997; TEUFFERT et al. 1998 b; FRITZEMEYER et al. 2000). Schwarzwild ist als Virusreservoir ein bekanntes Risiko für den Hausschweinebestand. Epidemiologische Verbindungen zwischen Schwarzwild und KSP-Ausbrüchen sind in Deutschland, Österreich und Sardinien beschrieben worden (WACHENDÖRFER 1978; KRASSNIG u. SCHULLER 1993; LADDOMADA et al. 1994; FRITZEMEYER et al. 2000). Die

Infektiosität des KSP-Virus bleibt in nicht erhitzten Fleischprodukten bis zu zweieinhalb Monaten erhalten (EDWARDS 2000; HELWIG et al. 1966). Auch in gefrorenem Fleisch ist das Virus überlebensfähig. Von 688 importierten, tiefgefrorenen Wildschweinfleischproben konnte in drei Proben KSP-Virus nachgewiesen werden (KRASSNIG et al. 1995). Demnach geht auch vom internationalen Handel, dem Import von Tieren oder Nahrungsmitteln, eine Gefahr zur Einschleppung der KSP aus. Für die Weiterverbreitung der Seuche ist v.a. der Handel mit infizierten Tieren verantwortlich, aber auch Personen- und Fahrzeugverkehr sind an der Verschleppung der KSP beteiligt (VALDER 1984; AHL 1994; KADEN et al. 1994; TEUFFERT et al. 1997, 1998 b; FRITZEMEYER et al. 2000).

Die KSP ist in Deutschland anzeigepflichtig und wird nach der Verordnung zum Schutz gegen die Schweinepest und die Afrikanische Schweinepest sowie nach der EU-Richtlinie 80/217/EEC (ANON. 1980) bekämpft.

2.1.2 Taxonomie

Die KSP wird durch das Klassische Schweinepest Virus ausgelöst. Zusammen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) der Rinder und dem Border Disease Virus (BDV) der Schafe und Ziegen gehört das KSPV zur Gattung der Pestiviren und damit zur Familie der Flaviviridae (HORZINEK 1991). Zur Familie der Flaviviridae gehört ebenfalls die Gattung Flavivirus sowie der Hepatitis-C-Erreger des Menschen (WENGLER 1991).

2.1.3 Viruscharakterisierung

2.1.3.1 Morphologie und Genomorganisation

Die Partikelgröße des membranumhüllten KSPV liegt zwischen 28 und 50 nm (HORZINEK 1967; KUBIN 1967; RITCHIE u. FERNELIUS 1968; ENZMANN u. WEILAND 1978). Elektronenmikroskopisch weist das Virus eine sphärische Form auf. Auf seiner Oberfläche besitzt es Projektionen mit einer Größe von sechs bis acht Nanometer (RITCHIE u. FERNELIUS 1968; ENZMANN u. WEILAND 1978).

Das Genom des KSPV besteht aus einer einzelsträngigen, positiv polaren RNA (DINTER 1963; KUBIN 1967).

2.1.3.2 Die Eigenschaften des Klassischen Schweinepestvirus

In der Zellkultur vermehrt sich das KSPV im Zytoplasma porziner Zellen ohne zytopathogenen Effekt (MAHNEL u. MEYR 1974). Unter In-Vitro-Bedingungen erweist sich das KSPV aufgrund seiner lipidlöslichen Hülle als unbeständig gegenüber Äther, Chloroform und Saponin (DINTER 1963; KUBIN 1967). Eine Trypsinbehandlung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml für 60 Minuten bei 37°C inaktiviert das KSPV (DINTER 1963). Die Vermehrung des Virus wird durch eine 0,25%ige Trypsinlösung für 24 Stunden bei vier Grad Celsius nicht gehemmt (KUBIN 1967). Die inaktivierende Wirkung von Trypsin scheint demnach temperaturabhängig zu sein (MAHNEL u. MEYR 1974). Im Bereich von pH acht bis neun ist das KSPV sehr stabil, dagegen führen pH-Werte zwischen drei und vier zu einer Virusschädigung (KUBIN 1967; DEPNER 1992). Eine Inaktivierung des Virus kann durch UV-Strahlung und zehnmütige Hitzeeinwirkung von 60°C erreicht werden (KUBIN 1967).

2.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese der KSP wird durch Eigenschaften des Wirtes und des Erregers bestimmt. Wichtig sind vor allem Alter Kondition und Konstitution des Wirtes sowie Infektionsdosis und Übertragungsmodus des Virus (LIESS1987; DAHLE u. LIESS 1995; DEPNER et al. 1997 a; van OIRSCHOT 1999). Unter natürlichen Bedingungen dringt das KSPV über den Nasen-Rachenraum in den Organismus ein. Eine erste Virusvermehrung findet in den Tonsillen statt (DUNNE 1959 a; MENGELING u. PACKER 1969). Über die Lymphgefäße gelangt das KSPV in die regionären Lymphknoten (PEHL u. SCHULZE 1958; RESSANG 1973 a). Die anschließende Virusausbreitung in das zirkuläre Blutgefäßsystem mit massiver Virämie wird durch Lymphozyten vermittelt (MENGELING u. PACKER 1969). Die erste virämische Phase beginnt 16 bis 24 Stunden nach oraler Infektion (DUNNE et al. 1959 a; RESSANG 1973 a). Der diagnostische Nachweis vom KSPV im Blut mittels Anzüchtung in der Zellkultur oder RT-PCR gelingt allerdings frühestens nach zwei

Tagen p.i. (DEPNER et al. 1994; DEPNER et al. 1996; KADEN et al. 1999). Die Ausbreitung des KSPV in lymphoretikuläres und lymphatisches Gewebe von Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Peyer'sche Platten und Solitärfoellikeln des Darmes wird durch mononukleäre Zellen vermittelt (RESSANG 1973 a). In der späten virämischen Phase kann Virusantigen in nahezu allen epithelialen Zellen von Tonsille, Pharynxschleimhaut, Gastrointestinaltrakt, Niere und Nebenniere, Harn- und Gallenblase, Gallengang, Pankreas, Speicheldrüsen, Nickhaut und Schilddrüse nachgewiesen werden (RESSANG 1973 a, b). Im Ovar und im Uterus läßt sich das KSPV am dritten Tag p.i. nachweisen (RESSANG 1973 a), neuere Untersuchungen zum Virusnachweis in Uterus und Ovar liegen nicht vor. Diese Phase der Organinvasion führt schließlich zur Rekonvaleszenz oder zum Tod des Tieres (RESSANG 1973 a, b).

2.1.5 Übertragung

Haupteintrittspforte für das KSP-Virus in den Organismus ist der Mund- und Rachenraum (oronasal) (DUNNE et al. 1959 a). Die Verfütterung von virushaltigen, nicht ausreichend erhitzten Speiseabfällen und der Kontakt zu infizierten Tieren, z.B. Schwarzwild, spielen dabei die wichtigste Rolle (KRASSNIG u. SCHULLER 1993; KADEN et al. 1994; TEUFFERT et al. 1997, 1998 b). Die Weiterverbreitung der KSP kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen. Die horizontale Übertragung kommt durch Kontakt der Tiere untereinander zustande (DEPNER et al. 1997 a).

Von tragenden, infizierten Sauen geht eine besondere Gefahr bei der Weiterverbreitung der KSP aus. Sie übertragen das Virus vertikal auf die Feten. Da adulte Tiere in der Regel keine bzw. nur geringe unspezifische Symptome ausbilden, bleibt die Erkrankung für lange Zeit unerkannt. Jedoch gelangt das Virus während der Virämiephase transplazental in den Fetus. Die auf diese Weise infizierten Ferkel sterben *in utero* ab, mumifizieren, zeigen Mißbildungen oder werden als persistente Virämiker geboren, je nachdem zu welchem Zeitpunkt der Trächtigkeit die Sauen infiziert wurden (YOUNG 1952; HUCK u. ASTON 1964; MEYER 1978; FREY et al. 1980).

Dem genitalen Übertragungsweg durch infiziertes Sperma kommt bei der intensiven Nutzung der künstlichen Besamung und des Im- und Exportes von Ebersperma weltweit eine besondere Bedeutung zu. FLÖGEL et al. (2000) wiesen das KSP-Virus im Sperma von infizierten Ebern nach. Nach der intrauterinen Besamung von zwei nicht immunen Sauen mit Sperma, dem 1,0 ml des KSP-Virusstammes Glentorf mit einem Titer von $10^{4,3}$ KID₅₀/ml zugesetzt war, serokonvertierten beide Sauen nach 14 Tagen und rauschten nach acht Wochen um (FREY unveröffentlicht 1969). Die Serokonversion von Sauen, die mit Sperma KSPV infizierter Eber künstlich besamt wurden, konnte von DE SMIT et al. (1999) erreicht werden. Die instrumentelle Samenübertragung von Sauen stellt somit ein Risiko in der Verbreitung der klassischen Schweinepest dar.

2.1.6 Klinik und Pathologie

Die Inkubationszeit der Erkrankung, die mit dem Auftreten von Fieber endet, liegt zwischen fünf bis neun Tagen (DEPNER et al. 1997 a; van OIRSCHOT 1999). Es können verschiedene Verlaufsformen zur Ausprägung kommen: die akut-letale, die akut-transiente, die chronische und die "late-onset"-Form (MOENNIG 1994; DEPNER et al. 1997 a; van OIRSCHOT 1999). Der Verlauf der KSP-Infektion im Schwein ist sowohl virus- wie auch wirtsabhängig (LIESS 1987). Zu den wirtsabhängigen Faktoren gehören Kondition, Konstitution sowie das Alter der Tiere zum Infektionszeitpunkt (DEPNER 1997 a), aber auch die Virusdosis und der Infektionsmodus müssen berücksichtigt werden (DAHLE u. LIESS 1995).

Die akute Form der KSP wird durch ein Virus mit hoher Virulenz ausgelöst (MOENNIG 1994; van OIRSCHOT 1999) und ist durch hohes Fieber mit Körpertemperaturen von 41 bis 42°C geprägt (LIEBERMANN 1992; DEPNER et al. 1997 a; LIESS 1997; van OIRSCHOT 1999; MOENNIG 1994). Ferner treten Appetitlosigkeit, Diarrhoe und zentralnervöse Symptome auf (MOENNIG 1994; van OIRSCHOT 1999). Die klassischen Hautveränderungen in Form von petechialen und ekchymalen Unterhautblutungen, bevorzugt an Schnauze, Ohren, Gliedmaßen und Bauch treten in der Endphase der Erkrankung auf. Tiere, die die als "typisch" bezeichneten Hautveränderungen zeigen, verenden an den Folgen der Infektion

(DEPNER et al. 1997 a). Neben der akut-letalen Form der KSP beschreibt DEPNER (1997 a) transient verlaufende Infektionen. Nach einer wenige Tage andauernden Fieberphase bessert sich das Befinden der Tiere wieder. Die typischen Hautveränderungen und zentralnervöse Erscheinungen bleiben aus.

Eine mehr als 30 Tage andauernde Erkrankung wird generell als chronisch bezeichnet (MENGELING u. PACKER 1969). Die chronische Form der KSP kann ohne die typischen klassischen Symptome der KSP ablaufen (DEPNER et al. 1994). Wachstumsverzögerung, Kümern, intermittierendes Fieber selten über 41°C, Diarrhöen und Dermatitis mit Petechien in der äußeren Haut werden beobachtet (DEPNER et al. 1996; LIESS 1997).

Epidemiologisch problematisch erweist sich eine Infektion von adulten Tieren, insbesondere von tragenden Sauen. Einziger Hinweis einer Infektion mit dem KSPV bei adulten Tieren ist oftmals nur ein leichter Temperaturanstieg (MEYER 1978; FREY et al. 1980; FLÖGEL et al. 2000). Der Uterus wird am sechsten bis siebten Tag p.i. durch das Virus erreicht (RESSANG 1973 b) und kann ab dem 18 Tag p.i. in den Organen des Fetus nachgewiesen werden (MEYER 1978). Die transplazentale Übertragung des Virus erfolgt zwischen dem 13. und 18. Tag nach Infektion der Sau (FREY et al. 1980). Aborte können in den ersten 25 Tagen p.i. eintreten. Meistens verlaufen die Trächtigkeiten normal und die Tragezeiten werden eingehalten (MEYER 1978; FREY et al. 1980). Die Auswirkungen auf die Ferkel variieren, je nachdem zu welchem Zeitpunkt der Gravidität eine Infektion der Sau stattfindet. Der Anteil an abortierten, mumifizierten oder totgeborenen Feten mit typischen KSP-Symptomen ist am größten bei einer Ansteckung der Sau um den 40. Trächtigkeitstag (MEYER 1978; HERMANNNS et al. 1981;). Eine KSP-Infektion der Sau zwischen dem 65. und 67. Graviditätstag führt nicht nur zum fetalen Tod, sondern ein Großteil der Ferkel wird lebend geboren und ist zeitlebens persistent virämisch (MEYER 1978; FREY et al. 1980). Das KSPV kann in kongenital infizierten Ferkeln bis zu elf Monaten lang persistieren (van OIRSCHOT u. TERPSTRA 1977). Diese Ferkel stellen eine wesentliche Infektionsquelle für nicht infizierte Tiere dar, da das Virus mit sämtlichen Exkreten ausgeschieden wird. Sie sind zunächst von nicht infizierten Ferkeln nicht zu unterscheiden, jedoch erkranken und verenden die

persistenten Virämiker nach einigen Wochen ("late-onset") an der chronischen Form der KSP (MEYER 1978). Liegt der Infektionszeitpunkt zwischen dem 87. bis 90. Trächtigkeitstag so treten neben totgeborenen Ferkeln mit oder ohne Anzeichen an KSP auch lebende gesunde, d.h. nicht infizierte und persistent virämische Ferkel auf. Der Anteil an totgeborenen Ferkel nimmt ab, je weiter das Trächtigkeitsstadium zum Zeitpunkt der Infektion der Sau fortgeschritten ist (MEYER 1978; HERMANNNS et al. 1981; MEYER et al. 1981). Fetale Todesfälle sind bei Virusübertragung nach dem 94. Graviditätstag nicht beobachtet worden (FREY et al. 1980).

2.1.7 Kreuzreaktivität

Im Verlauf der KSP-Infektion kommt es zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern (nAk). Frühestens in der zweiten Woche p.i. sind nAk im Serum nachweisbar (DEPNER et al. 1994; LAEVENS et al. 1999).

Durch den Kontakt von Schweinen und Rindern ist es möglich, daß Schweine sich mit BVDV anstecken. Natürliche Infektionen beim Schwein führen selten zur Erkrankung. Fruchtbarkeitsstörungen können auftreten (MATSCHULLAT 1994). Es kommt allerdings zur Bildung von nAk, die in der Lage sind auch KSPV zu neutralisieren (DAHLE 1987).

Auch Kälber bilden nach der Infektion mit KSPV nAk, die Infektionen mit dem BVD-Stamm NADL verhindern (DAHLE et al. 1987; MATSCHULLAT et al. 1994).

2.2 Entwicklung und Struktur präimplantatorischer Embryonen

2.2.1 Struktur eines Embryos

Etwa 14 bis 16 Stunden nach der Befruchtung beginnt sich die Zygote zu teilen. Es entsteht das Zwei-Zellstadium (siehe Abb. 1), das beim Schwein sechs bis acht Stunden dauert (HUNTER 1974). Bei den Säugetieren handelt es sich um eine total äquale Teilung (SCHNOOR 1989; RÜSSE u. SINOWATZ 1991). Die Zellmasse nimmt dabei nicht zu, sondern die Blastomeren werden durch Halbierung während jeder Teilung immer kleiner (PARRISH u. FIRST 1993). Der zweite Teilungszyklus erfolgt meistens synchron, aber auch Drei-Zellstadien werden beobachtet (HUNTER 1974). Der Embryo besitzt im Vier-Zellstadium vier gleichgroße Blastomeren (NIEMANN 1987; HUNTER 1991; HYTTEL u. NIEMANN 1990; FREITAG 1998). Eine im Lichtmikroskop transparent erscheinende Glykoproteinschicht, die Zona pellucida, und das Oolemm umhüllen die vier Blastomeren (AUSTIN 1961;).

Ultrastrukturelle Aufnahmen von Vier-Zellstadien zeigen den Nukleus zentral in der Blastomere. Er enthält scharf gezeichnete, dicht erscheinende, fibrilläre Nucleoli. Um den Kern herum befindet sich eine mit Organellen angereicherte Zone. Die Peripherie ist nahezu frei von Organellen. Die Zone um den Kern enthält zahlreiche Mitochondrien, Vesikel, Golgi-Komplexe, ringförmige Lamellen und glattes Endoplasmatisches Retikulum (ER). Die Mitochondrien zeigen eine sphärische bis ovoide Form. Ihre Cristae sind nur spärlich am Rand liegend vorhanden. In der Peripherie des Zytoplasmas befinden sich viele, große Lipidtropfen. Das glatte ER kann vor allem im organellfreien Areal gefunden werden. Es bildet dort ein verzweigtes Netz. Ferner bildet es entlang des Plasmalemm eine Linie. Das Plasmalemm konfluiert teilweise mit den ringförmigen Lamellen und steht in räumlichem Zusammenhang mit Mitochondrien, Vesikeln und Lipidtropfen. Die granuläre Form der Golgi-Komplexe tritt nur gelegentlich in Erscheinung (HYTTEL u. NIEMANN 1990).

Nach Bildung des Acht-Zellstadiums treten vermehrt asynchrone Teilungszyklen auf. Für das Morulastadium ist kennzeichnend die Bildung einer Zellmasse ohne

lichtmikroskopisch erkennbare Strukturen der Blastomeren. Der Embryo befindet sich dann im 8- bis 32-Zellstadium (HUNTER 1974). Durch eine Zelldifferenzierung entsteht die innere Zellmasse. Die Kompaktierung der Blastomeren erfolgt beim Schwein häufig bereits im Vier- bis Acht-Zellstadium. Hierbei kommt es zur Bildung von *tight junctions* zwischen den Zellen, was Voraussetzung für die spätere Blastozoenentwicklung ist (PARRISH u. FIRST 1993). Im Blastozystenstadium wird der Embryo zunächst immer noch von der Zona pellucida umgeben, deren Dicke bis zum Schlupf der Blastozyste stetig abnimmt (HUNTER 1974). Nach dem Schlupf aus der Zona pellucida kann der Embryo wachsen und sich an der Uterusschleimhaut anheften.

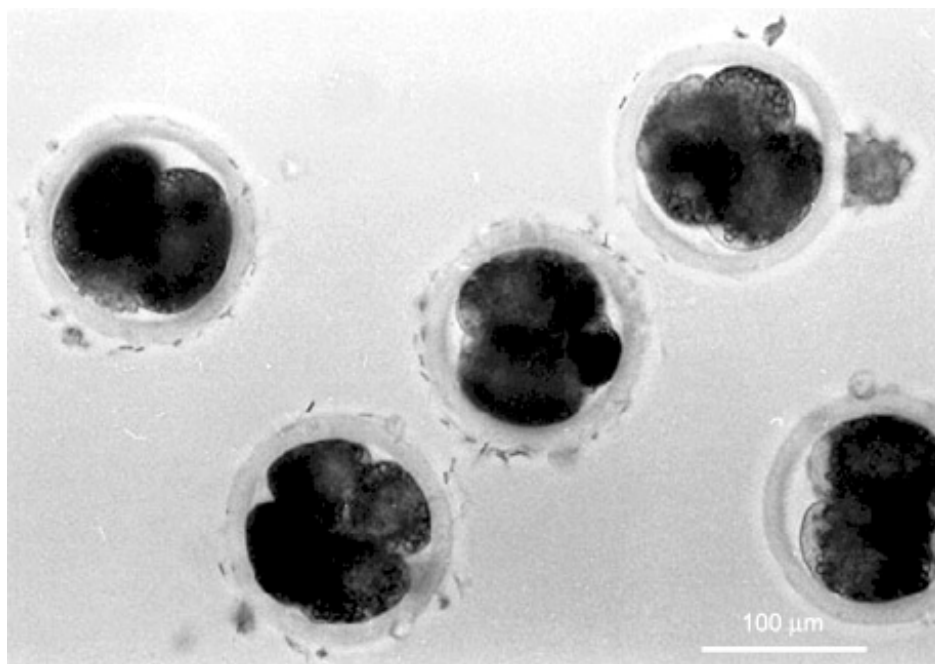


Abbildung 1: Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium (RATH 1997)

2.2.2 Die Zona Pellucida

2.2.2.1 Definition

Die porzine Oozyte und der frühe Embryo werden extrazellulär von der Zona pellucida umgeben. Sie bildet beim Säugetier neben dem Oolemm eine zweite primäre Hülle um die Oozyte bzw. den Embryo. (AUSTIN 1961; SCHNOOR 1989). Die Zona pellucida kann lichtmikroskopisch als transparente (lat. *perlucidus* = sehr durchsichtig) Schicht identifiziert werden. Die Dicke der Zona pellucida variiert bei den einzelnen Säugern von weniger als 2 µm bis zu mehr als 25 µm. Es besteht eine Proportionalität zwischen der Dicke der Zona pellucida und ihrem Proteingehalt (WASSARMAN 1988). Die Glykoproteine der Zona pellucida bedingen ihre vielfältige Funktion während der Fertilisationsphase. Dazu gehört die speziesspezifische Adhäsion des Spermatozoons an die Oberfläche der Zona pellucida, die Penetration der Zona pellucida, Induktion der Akrosomreaktion und die Verhinderung der polyspermen Fertilisation durch die Zona-Reaktion (AUSTIN 1991; EPIFANO 1994; WASSARMAN 1999). Als Barriere zwischen Oozyte und Umgebung schützt die Zona pellucida den wachsenden Embryo bis zum Schlupf vor äußeren Einflüssen (STARK 1975).

2.2.2.2 Die Struktur der Zona pellucida

Die Struktur der Zona pellucida gleicht im SEM einem Netzwerk mit zahlreichen Poren, deren Durchmesser bei den einzelnen Spezies stark variieren (DUDKIEWICZ u. WILLIAMS 1977).

Die Dicke der Zona pellucida schwankt bei den einzelnen Spezies. Beim Kaninchen ist sie 10-12 µm, bei der Beutelratte 0,5-1,0 µm (DUDKIEWICZ u. WILLIAMS 1977), beim Schwein etwa 13-18 µm (DUNBAR et al. 1991; WANG et al. 1998) und beim Rind im Durchschnitt etwa 12,5 µm dick (RIDDELL et al. 1993). Die äußere Oberfläche der Zona pellucida des Mausembryos' gleicht im SEM einem Schwamm (FAMILIARI 1992). Auch die Zona pellucida von Ratten, Hamstern, Kühen, Beutelratten und Katzen zeigen einen porösen Aufbau. Die größten Poren finden sich bei der Ratte und der Katze, die kleinsten bei der Kuh und der Beutelratte. Die größten Poren liegen an der äußeren Schicht der Zona pellucida. Die Porengröße

nimmt zentripetal ab. Die Form der Poren differiert zwischen den verschiedenen Spezies, größtenteils weisen die Poren eher eine elliptische als eine zirkuläre Form auf (DUDKIEWICZ u. WILLIAMS 1977).

Bovine Embryonen zeigen im Laufe ihrer Entwicklung hauptsächlich zwei Strukturen der Zona pellucida: Einen netzartigen Aufbau, schwammähnlich mit vielen Poren und eine mehr kompakte Bauweise mit wenigen, aber größeren Poren (VANROOSE et al. 2000). Unreife Rinderoozyten besitzen eine sehr heterogene Oberfläche mit unregelmäßiger Verteilung von zahlreichen Poren, Spalten und Projektionen, während Embryonen am Tag sieben geringfügig glatter erscheinen und weniger Poren und Projektionen besitzen (RIDDELL 1993), was VANROOSE et al. (2000) bestätigte. Oozyten und Morulastadien zeigen einen rauhen, netzartigen Aufbau mit zahlreichen Poren, während Zygoten eine glatte, verschmolzene Struktur aufweisen. Im Acht-Zellstadium sind beide Strukturen zu finden. Die Anzahl der Poren korreliert negativ mit ihrer Größe (VANROOSE et al. 2000). Auch bei caprinen Embryonen können zwei Strukturen unterschieden werden. Die Oberfläche von unreifen Oozyten ist rau, mit irregulär geformten Fibrillen und kleinen Poren, während nach der *in vitro* Reifung die Struktur gitterartig mit größeren Poren erscheint (VILLAMEDIANA et al. 1999).

2.2.2.3 Die Glykoproteine der Zona pellucida

Die Zona pellucida setzt sich chemisch aus 71 % Proteinen und 19 % Kohlenhydraten zusammen (DUNBAR et al. 1980). Das Verhältnis von Proteinen zu Kohlenhydraten liegt je nach Tierart bei drei bis fünf zu eins. Die Zona pellucida wird aus Glykoproteinen gebildet (WASSARMAN 1990). Der Bildungsort der Zona pellucida-Komponenten variiert je nach Tierart. Während der Oogenese synthetisiert die Oozyte die für den Aufbau der Zona pellucida wichtigen Glykoproteine (DIETL 1986; TAKAGI et al. 1989). Bei der Maus bildet nur die wachsende Oozyte die Glykoproteine für die Zona pellucida (EPIFANO u. DEAN 1994). An der Synthese der porcinen Zona pellucida sind vermutlich ebenfalls die Granulosazellen beteiligt (SINOWATZ et al. 1995). Die einzelnen Glykoproteine der Zona pellucida wurden als erstes bei der Maus mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Bei der Maus

wurden drei Glykoproteine mit Molekulargewichten von 200 kDa (ZP1), 120 kDa (ZP2) und 83 kDa (ZP3) isoliert (BLEIL u. WASSARMAN 1980).

Die porcine Zona pellucida setzt sich ebenfalls aus drei Glykoproteinen zusammen. Nach HARRIS et al. (1994) werden die Glykoproteine nach den sie codierenden Genfamilien ZPA; ZPB und ZPC benannt. Das ZPA-Gen besitzt von den drei Genen die meisten Basenpaare und ZPC die wenigsten. Das pZPA (früher: pZP1) entspricht einem Glykoprotein von 90 kDa, das unter reduzierenden Bedingungen in der Elektrophorese aus zwei Komponenten besteht, einem 25 kDa und einem 65 kDa großen Protein, die beide durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (HEDRICK u. WARDRIP 1986, 1987). Das pZPB-Glykoprotein entspricht in der isoelektrischen Fokussierung einem sauren, 37 kDa großen Protein (früher: pZP3 α), das pZPC-Glykoprotein einem basischen 40 kDa großen Protein (früher: pZP3 β) (HEDRICK u. WARDRIP 1980, 1987). Die O-glykosylierte Domäne des pZPB Proteins besitzt Spermienrezeptoreigenschaften, sie dient als primärer Spermienrezeptor (YUREWICZ 1993). pZPB und pZPC bilden einen Heterokomplex, an den sich Proteine in der Membran des Spermiums während der Zona-Spermium-Interaktion binden (YUREWICZ et al. 1998). Das pZPA ist ein sekundärer Spermienrezeptor und unterstützt die Penetration des Spermiums durch die Zona pellucida (TSUBAMOTO et al. 1996).

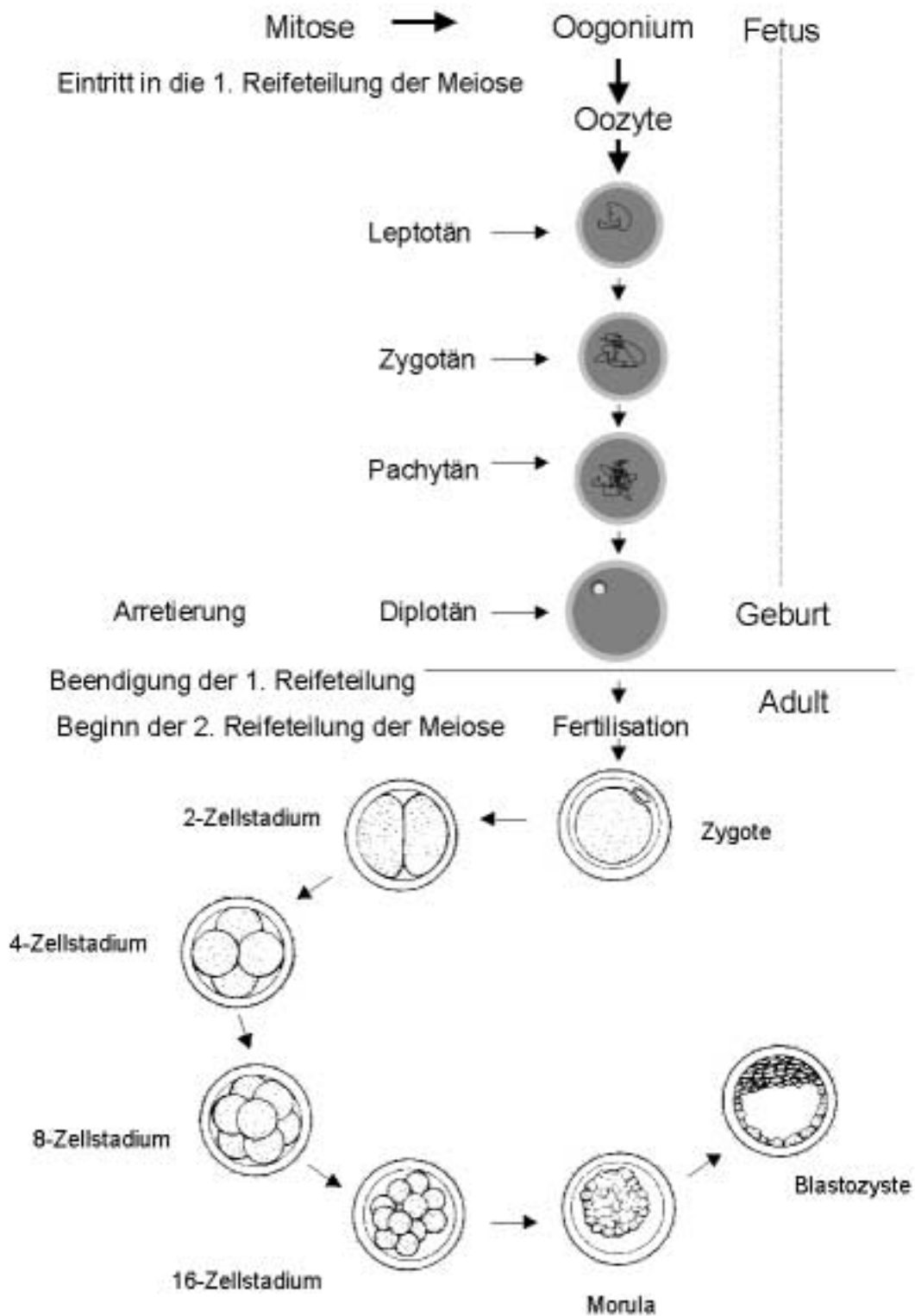


Abbildung 2: Die Embryonalentwicklung modifiziert nach ANON. (1998 a) und nach STRÖMSTEDT u. BYSKOV (1999)

2.2.3 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Entwicklung von Embryonen

Die Abbildung 2 zeigt den Entwicklungsablauf präimplantatorischer Säugetierembryonen. Die Entwicklungsfähigkeit von *in vitro* erstellten porzinen Embryonen ist generell gegenüber von *in vivo* produzierten deutlich reduziert (RATH 1997). Die In-Vitro-Entwicklung ist um ca. 24 bis 48 Stunden verzögert (NIEMANN et al. 1983; NIEMANN 1989).

Untersuchungen der Spermienpenetrationsrate und der Vorkernbildung von unterschiedlich gereiften Oozyten zeigen unverkennbar die zeitlichen Differenzen. *In vivo* maturierte Eizellen weisen eine doppelt so hohe Penetrationsrate von Spermien nach der Fertilisation auf als *in vitro* maturierte, wobei der Eintritt des Spermiums in das Ooplasma bei den *in vivo* maturierten Oozyten schon nach vier Stunden im Gegensatz zu sechs Stunden bei *in vitro* maturierten zu beobachten ist (LAURINCIK et al. 1994). Ein weiteres Problem der In-Vitro-Kultivierung besteht in der erhöhten Polyspermierate. Die *in vitro* fertilisierten Oozyten zeigen eine höhere Polyspermierate als *in vivo* produzierte (LAURINCIK et al. 1994; RATH 1997). Durch Reduzierung der Spermienzahl bei der Befruchtung kann die Polyspermiehäufigkeit allerdings verringert werden (RATH 1997).

Die zweite Meiose wird von doppelt so vielen *in vivo* maturierten als von *in vitro* maturierten Oozyten innerhalb von sechs Stunden beendet. Im Vergleich zu den *in vivo* maturierten Oozyten verzögert sich die Bildung des männlichen Vorkerns in den ersten 14 Stunden, während die Bildung des weiblichen Vorkerns schneller bei den *in vitro* maturierten Oozyten erfolgt. Die Verschmelzung der Vorkerne und damit der Zeitpunkt der ersten Teilung ereignet sich bei den *in vitro* maturierten Oozyten vier Stunden später (LAURINCIK et al. 1994; RATH 1997).

In der Kultur ist ein vermutlich artifiziell durch ungenügende Kulturbedingungen herbeigeführter Entwicklungsblock zu beobachten, der sowohl bei *in vivo* als auch bei *in vitro* erstellten Embryonen auftreten kann. Dieser erfolgt bei den verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Stadien, die speziesspezifisch sind. Dieses Blockstadium findet gleichzeitig mit der Aktivierung des embryonalen Genoms und zu einem Zeitpunkt statt, in dem der Embryo den Eileiter verläßt und in den Uterus übertritt (BAVISTER 1988; NIEMANN u. MEINECKE 1993). Das

Blockstadium kann von reversibler oder irreversibler Art sein. Der Embryo verliert seine Lebensfähigkeit dadurch nicht unbedingt. Bleibt die Vitalität erhalten, so ist dieser Entwicklungsstopp reversibel und die Entwicklung des Embryos wird fortgesetzt (BAVISTER 1988). Beim Schwein tritt dieser Entwicklungsblock im Vier-Zellstadium auf (BAVISTER 1995). Neuere Medien, wie z.B. NCSU 23, erlauben eine sehr gute Überwindung des Entwicklungsblockes, die sich zwischen *in vivo* und *in vitro* erstellten Embryonen kaum noch unterscheidet (RATH 1997).

Beginn und Dauer der einzelnen Stadien weichen bei den unterschiedlich produzierten Embryonen voneinander ab. Das Zwei-Zellstadium hat *in vitro* eine Dauer von $14,8 \pm 3$ Stunden (STUMPF 1992) und *in vivo* von sechs bis acht Stunden (HUNTER 1974). Die Dauer des Morulastadiums von $19,3 \pm 14,5$ Stunden ist bei den *in vitro* erstellten Embryonen wesentlich länger als bei den *in vivo* erstellten, die $6,9 \pm 6,7$ Stunden im Morulastadium verweilen. Das Stadium der beginnenden Blastozyste wird dagegen von den *in vitro* produzierten Embryonen schneller durchlaufen (FREITAG 1998).

Die Strukturen der Embryonen unterscheiden sich zwischen *in vivo* und *in vitro* maturierten Embryonen. Die Größe des Perivitellinen Spaltes sowie die Dicke der Zona pellucida sind bei den *in vitro* maturierten Embryonen geringer als bei solchen, die aus *in vivo* maturierten Oozyten produziert wurden. Die enzymatische Entfernung der Zona pellucida mit 0,1 %iger Pronase läuft bei den *in vivo* maturierten Embryonen in mehr als 2 Stunden ab, während sie bei Embryonen aus *in vitro* gereiften Oozyten nach $131,7 \pm 7,6$ Sekunden abgelöst ist (WANG et al. 1998).

Die Zellkernzahlen von IVP-Embryonen im Blastozystenstadium sind geringer als bei *in vivo* produzierten Embryonen (RATH 1995). Die Anzahl der Zellkerne von schlüpfenden und geschlüpften Blastozysten, die ab dem Vier-Zellstadium, ab dem Acht-Zellstadium oder als Morula in die Kultur gesetzt wurden, war niedriger als bei solchen, die erst als frühe Blastozyste unter Kulturbedingungen gehalten wurden. (NIEMANN et al. 1983).

2.3 Kontamination von Embryonen mit Viren

2.3.1 Kontaminationsquellen und -ursprung

Hygienische Probleme beim Austausch von tierischem oder genetischem Material zwischen Ländern beschränkten sich früher ausschließlich auf lebende Tiere. Seit Einführung der instrumentellen Samenübertragung und des Embryotransfers erstreckte sich dieses Problem auch auf den Samen und auf *in vivo* produzierte Embryonen. Die Verfeinerung und Weiterentwicklung biotechnologischer Verfahren macht es heute nötig, auch die In-Vitro-Produktion von Embryonen hygienisch zu kontrollieren, um so die Ausbreitungsgefahr von Infektionskrankheiten zu vermeiden. Die Verbreitung von Krankheiten durch Embryotransfer wurde vielfach untersucht und diskutiert (siehe Abb. 3). Eine potentielle Gefahr stellen dabei v.a. submikroskopische Erreger, wie z.B. Viren dar.

Die Gefahr einer Kontamination mit Pathogenen bezieht sich dabei nicht nur auf die Spendertiere von Samen oder Oozyten, sondern auch auf die, für die Aufbewahrung und Kultivierung von Embryonen verwendeten Medien, Zusätze, Aufbewahrungsmaterialien und Transferbedingungen (GUERIN et al. 1997).

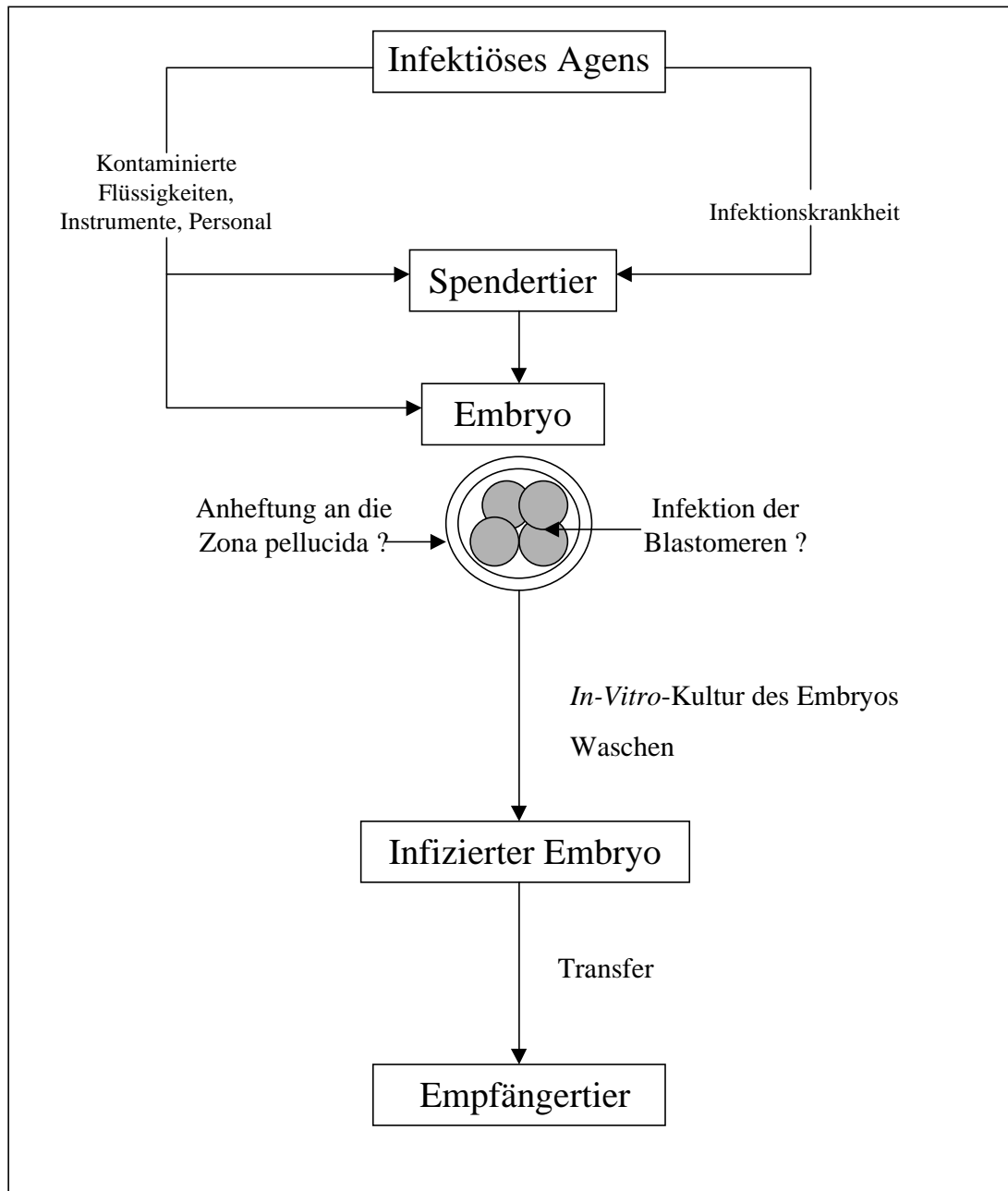


Abbildung 3: Schematische Darstellung potentieller Übertragungswege von Pathogenen durch Embryotransfer modifiziert nach WRATHALL u. SUTMUELLER (1998)

2.3.1.1 Spendertiere

Tiere, die für den Embryotransfer in Frage kommen, sind mögliche Träger von Pathogenen. Eine allgemeine Gesundheitsuntersuchung sowie insbesondere die Untersuchung des Reproduktionstraktes muß unbedingt vor dem Einsatz als Donor durchgeführt werden. Krankheiten müssen klinisch und serologisch ausgeschlossen werden (MAPLETOFT u. STOOKEY 1998; NIEBART et al. 1998). Der zur Besamung eingesetzte männliche Spender und dessen Ejakulate unterliegen den gleichen Anforderungen.

Verschiedene Viren werden über die Geschlechtsorgane ausgeschieden und befinden sich daher in Sperma (MEDVICZKY u. SZABO 1981) und anderen Genitalflüssigkeiten. Die Übertragung von Viruskrankheiten, z.B. der Aujeszky'schen Krankheit, mittels instrumenteller Samenübertragung gilt als bewiesen (PHILIPPS et al. 1972; THACKER et al. 1984). Mit PRRS infizierte Eber scheiden das Virus über Nasen-, Präputialsekret und Sperma aus (TEUFFERT et al. 1998 a). Adulte Schweine erkranken inapparent an KSP und scheiden das Virus über Speichel, Urin und Kot kurzzeitig aus. Das KSP-Virus wurde im Sperma von KSPV infizierten Ebern sporadisch in geringer Konzentration nachgewiesen (FLÖGEL et al. 2000). Nach der instrumentellen Samenübertragung von Sauen mit KSPV-haltigem Sperma kam es, ohne daß Symptome auftraten, zur Bildung von Antikörpern und zur transplazentalen Virusübertragung auf die Feten (DE SMIT et al. 1999).

2.3.1.2 Empfängertiere

Die Übertragung von Embryonen sollte ebenfalls nur auf gesunde Empfängertiere erfolgen. Die Tiere müssen sowohl serologisch getestet als auch klinisch untersucht werden. Es dürfen keine genitalen Erkrankungen und Infektionskrankheiten vorliegen (MAPLETOFT u. STOOKEY 1998). Viren können in der virämischen Phase in den Genitaltrakt ausgeschieden werden. BVDV konnte sowohl im vaginalen Schleim als auch in der Uterusspülflüssigkeit von BVD-infizierten Rindern in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (BROCK et al. 1991; BIELANSKI u. DUBUC

1995). Nach einem Transfer besteht die Gefahr, daß der Embryo mit den Erregern in Kontakt kommt und infiziert wird.

2.3.1.3 Zusätze

Die bei der IVP-Produktion verwendeten natürlichen Zusätze aus biologischem Material, wie z.B. Bovines Serum Albumin, Fetales Kälberserum, New Born Calf Serum, Follikelflüssigkeit etc., stellen eine Kontaminationsquelle dar (GUERIN 1997). BIELANSKI et al. (1993) erbrachten den Beweis, daß die Follikelflüssigkeit von kommerziell geschlachteten Kühen BHV-1 und BVDV enthalten kann. In der Regel handelte es sich um gepoolte Flüssigkeiten. Die Follikelflüssigkeit für die IVP von porzinen Embryonen stammt üblicherweise von geschlachteten Schweinen, deren Infektionsstatus bzw. KSP-Status zum Zeitpunkt der Schlachtung unbekannt ist. Damit besteht eine potentielle Gefahr, daß die KSP durch *in vitro* oder durch *in vivo* produzierte Embryonen mittels Embryotransfer verbreitet wird. Definierte Kulturbedingungen und -medien, die keine biologischen Substanzen enthalten, sind zwar Ziel zahlreicher Forschungsarbeiten, führten bislang aber nicht zum Erfolg.

2.3.2 Technik zur Handhabung von Embryonen zwischen Gewinnung und Transfer

Um Übertragungen von Pathogenen durch Embryonen zwischen Spender- und Empfängertieren zu vermeiden, ist es unbedingt notwendig, die Handhabung von Embryonen bei Gewinnung und Transfer nur unter definierten hygienischen Bedingungen durchzuführen.

Die Internationale Embryo Transfer Society definiert in einem Handbuch die Voraussetzungen und Vorgehensweisen zur optimalen Handhabung von Embryonen von der Gewinnung bis zum Transfer (siehe Tab. 1).

Voraussetzung für die Vermeidung einer Transmission von Pathogenen ist die aseptische technische Ausstattung und die Verwendung steriler Materialien. Die Keimfreiheit sämtlicher Medien muß gewährleistet sein. Insbesondere die natürlichen Zusätze wie z.B. BSA, FKS etc. sollten vorab auf Pathogene getestet werden (NIEBART et al. 1998). Die Zugabe eines Breitspektrumantibiotikums oder bestimmter, in den Ländern unterschiedlich zugelassener Antibiotikakombinationen

sind zur Verhinderung bakteriellen Wachstums erforderlich (RIDDELL u. STRINGFELLOW 1998).

Die Selektion der Embryonen erfolgt nach strengen Kriterien. Es kommen nur Zona-pellucida-intakte Embryonen für den Transfer in Frage. Vor dem Transfer werden die Embryonen einer Waschprozedur unterzogen. Außen an der Zona pellucida anheftende Schleim- oder Zellpartikel müssen vor der Waschprozedur beseitigt werden. Der Waschvorgang soll aus 10 Waschschritten durch je 2 ml Waschmedium bestehen, die Verdünnung von einem Schritt zum nächsten soll bei mindestens 1:100 liegen (STRINGFELLOW 1998).

Tabelle 1: Vorschriften für die Waschprozedur bei Embryonen (modifiziert nach STRINGFELLOW 1998)

1. Nur die Embryonen eines einzelnen Spendertieres in Gruppen waschen.
 2. Maximal zehn Embryonen zusammen waschen.
 3. Nur Zona-pellucida-intakte Embryonen waschen.
 4. Nur Embryonen ohne anheftende Substanzen waschen.
 5. Mindestens zehn Waschschriffe verwenden.
 6. Pro Waschschritt soll mindestens eine 1:100fache Verdünnung erreicht werden.
 7. Die Pipette zwischen den einzelnen Waschschriffen wechseln.
-

Die Behandlung der gewonnenen Embryonen mit Trypsin erscheint sinnvoll, da schon mehrfach nachgewiesen wurde, daß Trypsin in einer Konzentration von 0,25 % in der Lage ist, bestimmte Viren von der Zona pellucida abzulösen (SINGH et al. 1983; STRINGFELLOW et al. 1990). Die Inkubation mit Trypsin sollte 60 bis 90 Sekunden dauern. Zwei Trypsinwaschschriffe müssen in die oben beschriebene Waschprozedur eingefügt werden. Um Aufschluß über den Kontaminationsgrad sämtlicher Flüssigkeiten, mit denen die Embryonen in Kontakt gekommen sind, zu bekommen, ist es erforderlich diese mikrobiologisch und virologisch zu untersuchen. Dies ist insbesondere relevant, wenn das Spendertier

seropositiv für eine transmissible Erkrankung ist oder wenn der Verdacht einer Erkrankung bei diesem vorliegt (STRINGFELLOW 1998).

2.4 *In-vitro*-Kultivierung von Embryonen mit Viren

2.4.1 Interaktion von Viren und bovinen Embryonen

Vor allem für Rinder liegen zahlreiche Arbeiten vor, die sich mit der Übertragung von viralen Krankheitserregern durch Embryonen beschäftigen. Insbesondere genital übertragbare Krankheiten, wie die Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis oder die durch ein Pestivirus ausgelöste Bovine Virusdiarrhoe (BVD) des Rindes sind dabei von Interesse.

Bovine *in vivo* erstellte Embryonen lassen sich nach SINGH et al. (1986) nicht mit dem Erreger der Maul- und Klauenseuche (MKS) infizieren. Das MKS-Virus wurde 2 bis 18 Stunden mit den Embryonen kokultiviert. Anschließend wurden sie zehnmal gewaschen und im Plaquetest einzeln oder in Gruppen von acht Embryonen auf MKS untersucht. Von 169 Zona-pellucida-intakten Embryonen erwiesen sich alle Embryonen als MKS negativ. Bei 33 % von 42 geschlüpften Blastozysten, die dem MKS-Virus zwei Stunden ausgesetzt waren, konnte Virus isoliert werden.

Das Vesikuläre Stomatitisvirus (VSV) konnte bei 29 % der *in vivo* gewonnenen bovinen Embryonen im Plaquetest nachgewiesen werden. Nach anschließender Waschbehandlung mit 0,25 %igem Trypsin waren die Embryonen virusnegativ. Die Adhäsion des VSV an die Zona pellucida wurde daher vermutet (SINGH u. THOMAS 1987 b).

Bovine *in vivo* gewonnene 16-Zellstadien bis hin zum Blastozystenstadium lassen sich nicht mit dem Akabane- oder dem Bluetongue-Virus infizieren (SINGH et al. 1982 a).

Das bovine Herpesvirus-1, der Erreger der Bovinen Rhinotracheitis (IBR) und der Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IPV) konnte von experimentell infizierten Rindern aus der Vagina, Uterusflüssigkeit, Follikelflüssigkeit sowie aus den Granulosazellen und Eileiterepithelzellen isoliert werden. Aus den Ovarien dieser Tiere gewonnene Oozyten erwiesen sich ebenfalls als viruspositiv (BIELANSKI u.

DUBUC 1994). BHV-1 konnte auch von SINGH et al. (1982 b) bei 54 % *in vivo* gewonnene bovine Embryonen im 16-Zell- oder Blastozystenstadium, die dem Virus für eine Stunde ausgesetzt waren, isoliert werden. 65 % waren BHV-1 positiv, wenn die Embryonen für 24 Stunden mit dem Virus kokultiviert wurden. Eine Behandlung der Embryonen nach dem Waschen mit 0,25 % Trypsin für ein bis zwei Minuten oder mit BHV-1-Antiserum für eine Stunde entfernte das Virus komplett von den Embryonen. Das gleiche stellte auch STRINGFELOW et al. (1990) fest. SINGH et al. schlossen daraus, daß ein Eindringen des BHV-1 in den Embryo und eine Infektion der Blastomeren nicht erfolgt.

Die embryonalen Zellen lassen sich aber nach Entfernung der Zona pellucida mit BHV-1 infizieren. Es wurden zwölf Zona pellucida-freie Embryonen 1 bis 24 Stunden mit dem BHV-1 inkubiert, anschließend gewaschen, sonographisch zerstört und die Suspension fünf Tage lang mit bovinen Nasenmuschelzellen in Mikrotiterplatten kokultiviert. Ein zytopathogener (cp) Effekt konnte in allen Vertiefungen festgestellt werden (BIELANSKI et al. 1987).

Auch *in vitro* fertilisierte bovine Embryonen, die aus Ovarien von herkömmlichen Schlachtrindern gewonnen wurden, stellen ein potentiellies Risiko dar, das BHV-1-mittels Embryotransfer zu übertragen. BIELANSKI et al. (1993 a) untersuchten bovine Embryonen auf BHV-1 und BVDV. Die Embryonen wurden aus Ovarien von Schlachthoftieren gewonnen und *in vitro* fertilisiert. Insgesamt wurden 759 Zygoten erstellt und auf 85 Gruppen, die je fünf bis zehn Zygoten enthielten, verteilt. Die einzelnen Gruppen wurden mittels Ultraschall behandelt und 20 µl der Suspension zu Madin-Darby-Bovine-Kidney-Zellen (MDBK) zum Virusnachweis gegeben und für drei Tage kultiviert. Trat ein zytopathogener Effekt bei einer Gruppe auf, so wurden die MDBK-Zellen passagiert. Eine Passage wurde mit BHV-1-Antiserum zum BHV-1-Nachweis kultiviert. Bei einer zweiten Passage wurde zum BVDV-Nachweis ein indirekter Immunperoxidasetest durchgeführt. Es konnte bei zwei der 85 Gruppen BHV-1 nachgewiesen werden. Alle Gruppen waren im indirekten Immunperoxidasetest BVDV negativ. BIELANSKI untersuchte ebenfalls 85 Proben Follikelflüssigkeit und 80 Proben Eileiterzellen von geschlachteten Rindern auf BHV-1 und BVDV. In acht Proben der Follikelflüssigkeit und in fünf

Proben der Eileiterzellen konnte BHV-1 nachgewiesen werden. BVDV wurde in vier Proben der Follikelflüssigkeit und in einer Probe der Eileiterzellen gefunden. Die Teilungs- und Blastozystenraten der BHV-1-infizierten Oozyten unterschieden sich nicht von den Kontrollgruppen (BIELANSKI u. DUBUC 1993 b).

1997 führte BIELANSKI et al. weitere Untersuchungen mit BHV-1 an *in vitro* produzierten bovinen Embryonen durch. Die Wirkung von Trypsin bezüglich der Infektionsverhinderung wurde ebenfalls untersucht. Das BHV-1 wurde in einem ersten Versuch dem IVP-System während der In-Vitro-Reifungsphase zugegeben. Anschließend wurden Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) vor bzw. während der Entfernung der Kumuluszellen und kumulusfreie Embryonen im Anschluß an die IVP dem Virus ausgesetzt. Die anschließende Behandlung der Embryonen mit 0,25 %iger Trypsin-Lösung für 90 Sekunden reduzierte den Anteil der virusinfizierten Embryonen gegenüber den trypsinunbehandelten Embryonen. Eine vollständige Ablösung des Virus, wie es SINGH et al. 1983 bei *in vivo* erstellten Embryonen gelang, war nicht möglich. Dieses unterschiedliche Verhalten der verschiedenartig erstellten Embryonen gegenüber BHV-1 wurde auf Veränderungen der physikalisch-chemischen Struktur der Zona pellucida unter IVF-Bedingungen zurückgeführt.

Von 29 experimentell mit BVDV-Typ II (Stamm CD87) infizierten Färsen wurde Follikelflüssigkeit, Uterusspülflüssigkeit, Eileiterepithelzellen und Oozyten für die IVP gewonnen und auf BVDV untersucht. Es erwiesen sich 55 % der Follikelflüssigkeitsproben, zehn Prozent der Eileiterepithelzellproben und zehn Prozent der Uterusspülungen als BVDV positiv. 41 % der an unterschiedlichen Tagen *p.i.* gewonnenen Oozyten waren nach der IVF ebenfalls BVDV positiv, wobei der Anteil an BVDV positiven IVP-Embryonen bei den am achten Tag *p.i.* gewonnenen Oozyten mit 58 % am größten war. Die *In-vitro*-Exposition von nicht infizierten Oozyten mit BVDV-Typ II während der Maturationsphase führte bei vier von sieben Proben zu einem positiven Ergebnis, ohne daß eine morphologische Veränderung sichtbar war (BIELANSKI et al. 1998). Infizierte Embryonen sind daher nicht von virusfreien Embryonen zu unterscheiden und könnten daher auch für den Embryotransfer selektiert werden.

VANROOSE et al. (1998) stellten fest, daß Zona-pellucida-intakte *in vitro* erstellte und infizierte bovine Acht-Zellstadien und die Morula sich nicht mit dem BVDV infizieren lassen, wenn sie dem BVDV für eine Stunde ausgesetzt sind. Eine Replikation des nicht zytopathogenen (ncp) BVDV fand nur in Zona-pellucida-freien Morulae und des cp BVDV sowohl in den Zona pellucida-freien Acht-Zellstadien als auch in den Morulae statt. Nur der zytopathogene BVDV-Stamm hatte einen inhibitorischen Effekt auf die Weiterentwicklung der Morulastadien. *In vitro* produzierte bovine Zona pellucida-freie Oozyten und Zygoten blieben bis zu 48 Stunden *p.i.* BVDV frei, nach 72 Stunden *p.i.* konnte in den Zygoten lediglich eine Replikation des cp BVDV nachgewiesen werden. Geschlüpfte Blastozysten zeigten schon nach zwölf Stunden *p.i.* eine Replikation des cp BVDV und nach 48 Stunden *p.i.* des ncp BVDV. Der ncp BVDV-Stamm könnte in einem IVP-System unerkannt bleiben und somit mittels Embryotransfer auf Empfängertiere übertragen werden. Die vom IETS vorgeschriebene Standardwaschprozedur ist ebenfalls nicht in der Lage, die *in vitro* produzierten Embryonen komplett vom BVDV zu befreien (BIELANSKI u. JORDAN 1996). Ob Sperma allerdings BVDV in ein IVP-System einschleppen kann, halten BIELANSKI u. LOEWEN (1994) zwar für unwahrscheinlich, schließen es aber nicht komplett aus. Sie benutzten für die In-Vitro-Fertilisation Sperma von persistent BVD-infizierten Bullen und konnten BVDV bei keinem Embryo nachweisen, obwohl das Sperma BVDV-positiv war (BIELANSKI u. LOEWEN 1994).

2.4.2 Interaktion von Viren und porzinen Embryonen

Untersuchungen an porzinen Embryonen bezüglich ihrer Kontaminationsempfindlichkeit mit Viren liegen in begrenztem Umfang vor. Die verwendeten Embryonen wurden komplett *in vivo* produziert. Veröffentlichungen zur Empfänglichkeit von komplett *in vitro* erstellten Embryonen liegen nicht vor.

SINGH et al. (1984) untersuchten Schweineembryonen auf deren Empfänglichkeit gegenüber dem Afrikanischem Schweinepestvirus (ASPV). Bei 95 % der Embryonen konnte ASPV nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Trypsin oder Pronase reduzierte die Anzahl der viruspositiven Embryonen auf 30 %. Die intraperitoneale Injektion von 2 ml einer Suspension aus 50 Embryonen, die mit dem ASPV *in vitro*

infiziert und mit Trypsin behandelt waren, führte bei einem von fünf Ferkeln zu Fieber und Antikörperbildung gegen das ASPV.

SINGH u. THOMAS (1987 a) inkubierten porcine Zona-pellucida-intakte Embryonen für 20 Stunden mit dem Virus der Vesikulären Schweinekrankheit (VSKV). Sie konnten nach zehnmalem Waschen VSKV bei allen Embryonen nachweisen. Die Zahl der positiven Embryonen und deren Infektiosität verringerte sich allerdings, wenn im Anschluß an die Waschprozedur eine 24-stündige Kultivierungsphase angeschlossen wurde. Die Behandlung der Embryonen mit Trypsin, Pronase oder Antiserum konnte das VSKV nicht vollständig entfernen, die Zahl der positiven Embryonen wurde allerdings verringert.

Die Penetration der Zona pellucida und die Infizierung der Blastomeren ist nicht zur Übertragung der Erkrankung auf ein Empfängertier nötig. Die Adhäsion an die Zona pellucida reicht dazu völlig aus. Der Konzeptus kann sich nach Schlüpfen der Blastozyste infizieren (WRATHALL 1995).

SINGH und THOMAS (1987 a) folgerten aus ihren Versuchen, daß sich das Vesikuläre Stomatitisvirus außen an die Zona pellucida anheftet. Von 66 *in vivo* erzeugten porcinen Embryonen, die dem Virus in hoher Konzentration (10^8 pfu/ml) für zwei bis vier Stunden ausgesetzt waren, erwiesen sich 52 Embryonen (79 %) nach zehnmalem Waschen im Plaquetest als viruspositiv. Kultivierten sie die gewaschenen Embryonen für weitere 24 Stunden, so konnte nur bei 53 % Embryonen noch Vesikuläres Stomatitisvirus nachgewiesen werden; eine Virusreplikation fand demnach nicht statt. Die zweimalige 0,25 %ige Trypsinbehandlung der infizierten Embryonen reduzierte den Virusanteil soweit, daß in der Zellkultur der Virusnachweis ausblieb. Nur außen angeheftetes Virus konnte demnach entfernt worden sein.

Die Viruskonzentration spielt eine wesentliche Rolle bei der Infizierung der Embryonen. Rinder- und Schweineembryonen sind nur bei einer Konzentration von 10^8 pfu/ml mit dem Vesikulären Stomatitisvirus infizierbar. Bei einer Konzentration von beispielsweise drei pfu/ml konnte kein Virus nachgewiesen werden (SINGH u. THOMAS 1987 b).

In vivo produzierte porzine Vier- u. Acht-Zellstadien sind für den virulenten und avirulenten Stamm des Porzinen Parvovirus (PPV) sowohl durch Inkubation der Embryonen mit dem Virus als auch durch eine direkte Mikroinjektion von Virus durch die Zona pellucida empfänglich (BANE et al. 1989).

BOLIN et al. (1983) konnten elektronenmikroskopisch PPV, porzines Enterovirus und das Virus der Aujeszky'schen Krankheit an *in vivo* produzierten Schweineembryonen nachweisen. Das PPV befand sich in geringer Menge in Verbindung mit der Zona pellucida, jedoch hauptsächlich umringt von Zelltrümmern, in den Poren sowie in der Nähe von Samenzellen außen an der Oberfläche der Zona pellucida. Der Auslöser der Aujeszky'schen Krankheit, das porzine Herpesvirus Typ 1 (SHV-1) und das Porzine Enterovirus, hefteten sich ebenfalls an der Zona pellucida an. Zusätzlich nistete sich das porzine Herpesvirus Typ 1 nistete sich auch innerhalb der Zona pellucida in von Spermien geschaffenen Poren ein. Ein zellkultureller Nachweis des SHV-1 gelang BOLIN et al. (1981) nicht. Der Virusnachweis von Zona-pellucida-intakten und -freien Embryonen verlief bei ihnen negativ.

Porzine *in vivo* produzierte Embryonen wurden auch dem Erreger der Maul- und Klauenseuche (MKS) für bis zu 18 Stunden ausgesetzt. Nach zehnmalem Waschen konnte das MKS-Virus bei vier individuell untersuchten Embryonen von 124 und bei zwei Gruppen à acht Embryonen von neun Gruppen im Plaquetest nachgewiesen werden (SINGH et al. 1986).

Die Entwicklungsfähigkeit von porzinen Embryonen wurde durch das Vesikuläre Stomatitisvirus, Afrikanische Schweinepestvirus, MKS oder VSKV nicht beeinträchtigt (SINGH et al. 1984; SINGH et al. 1986; SINGH u. THOMAS 1987 a, b).

Das KSPV konnte von *in vivo* gewonnenen porzinen Embryonen isoliert werden. Zona-pellucida-intakte Schweineembryonen wurden für bis zu 18 Stunden mit dem KSPV inkubiert, anschließend zehnmal in zwei Milliliter PBS gewaschen und durch Ultraschallbehandlung zerstört. Zum Virusnachweis wurden die zerstörten Embryonen, der Überstand und die letzten beiden Waschlösungen auf PK(15)-Zellen verbracht. Das auf die PK(15)-Zellen verbrachte Inokulum adsorbierte für eine Stunde bevor Medium dazugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen für

18 bis 24 Stunden inkubiert. Die Fixierung erfolgte mit Azeton und der Virusnachweis mittels Immunfluoreszenz. Von 171 Schweinembryonen waren 165, die direkt im Anschluß an die Waschprozedur untersucht wurden, KSPV positiv. Bei 24 Embryonen, die nach dem Waschen weiter inkubiert wurden, konnte kein KSPV nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit Trypsin oder Trypsin-EDTA für 60 bis 90 Sekunden in verschiedenen Konzentrationen entfernte das Virus vollständig von 203 Embryonen, 29 Embryonen blieben weiterhin KSPV positiv. Die Viruskonzentration scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Bei einer Viruskonzentration von mehr als 10^6 FFU/ml konnte das Virus nicht vollständig entfernt werden; lag sie unter 10^6 FFU/ml so blieb der Virusnachweis negativ (DULAC u. SINGH 1988).

Untersuchungen zur Empfänglichkeit von *in vitro* erstellten porzinen Embryonen mit dem KSPV liegen bislang nicht vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, *in vivo* und *in vitro* erstellte Embryonen nach Virusexposition im Vergleich zu untersuchen und Unterschiede im Bindungsverhalten der Viren nachzuweisen.

3 **Material und Methoden**

3.1 **Embryonenerzeugung**

Als Spender von *in vivo* maturierten Oozyten und *in vivo* produzierten Zwei- bis Vier-Zellstadien dienten 34 präpuberale Jungsauen der Deutschen Landrasse. Die Tiere waren fünf bis sieben Monaten alt und hatten ein durchschnittliches Lebendgewicht von 70 kg bis 105 kg (85 kg \pm 8,7).

3.1.1 ***In-Vivo*-Erzeugung von frühen Embryonalstadien**

Die präpuberalen Jungsauen wurden zur Erstellung der Embryonen mit 1500 I.E. PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, Intergonan[®], Fa. Intervet, 47918 Tönisvorst) zur Superovulation stimuliert. Die Ovulationsinduktion erfolgte durch die intramuskuläre Applikation von 500 I.E. hCG (human Chorionic Gonadotropin, Ovogest[®], Fa. Intervet, 47918 Tönisvorst) ca. 72 Stunden später. Bei deutlichen Rauschesymptomen wurden die Sauen 24 und 48 Stunden nach hCG-Applikation mit gepooltem Frischsperma aus Ejakulaten von 3 Ebern besamt. Die Schlachtung der Sauen wurde 24 Stunden nach der zweiten Besamung im institutseigenem Schlachthaus durchgeführt. Die Entnahme der Genitalorgane fand vor dem Brühprozeß statt. In einem auf 39°C vorgewärmten Thermobehälter wurden die Organe ins Labor transportiert. Die Eileiter wurden an der utero-tubalen Verbindung und die Uterushörner ca. 5 cm vor dem Corpus uteri abgetrennt. Zum Spülen der Eileiter wurde eine stumpfe Kanüle (Microlance 3, 18-gauge, Fa. Becton Dickinson, Ireland) in das Infundibulum mit aufgesetzter Spritze (DiscarditTMII, Fa. Becton Dickinson, Tullastr. 8-12, 65126 Heidelberg) eingeführt und der Eileiter mit auf 39°C vorgewärmter PBS-Lösung (Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, P.O. 1120, 89552 Steinheim; Kapitel 10.1) gespült, die mit 1 % fetalem Kälberserum¹ (Fetales Kälberserum, Fa. Biochrom KG,

¹ Jede FKS-Charge wurde im Institut für Virologie auf BVDV und BVDV-AK untersucht. Es kamen nur negative Chargen zum Einsatz.

Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin, Kat.-Nr. S0115) angereichert war. Um die gesamte Spülflüssigkeit aus dem Eileiter zurückzugewinnen, wurde das Restvolumen mit ca. 5 ml Luft ausgespült. Zusätzlich wurde der Eileiter vorsichtig mit den Fingern ausgestreift.

Die Uterushörner wurden zweimal mit ca. 40 ml PBS, die mit 1 % FKS ergänzt war, gespült, indem an einem Ende eine Knopfkanüle eingeführt wurde und dann beide Enden der Uterushörner zum Spülen mit Klemmen verschlossen wurden. Die Spülflüssigkeit jedes Uterushorns wurde in Petrischalen getrennt abgelassen. Unter einem Stereomikroskop (SMZ-2T, Fa. Nikon, 40472 Düsseldorf) wurden bei 40-facher Vergrößerung die Embryonen aufgesucht. Diese wurden anschließend in frische angewärmte PBS umgesetzt und dabei die Embryonen entsprechend ihres Entwicklungsstadiums aufgeteilt. Insgesamt wurden 826 Zwei- bis Vier-Zellstadien gewonnen.

3.1.2 *In-vitro* Erstellung von Embryonen

3.1.2.1 Gewinnung der Kumulus-Oozyten-Komplexe

Ovarien präpuberaler Schlachtsauen wurden von einem nahegelegenen Schlachthof in einem Thermogefäß, das auf etwa 25°C vorgewärmt war, in das Labor transportiert. Die Eierstöcke wurden zunächst mit einer auf 39°C erwärmten, mit 60 mg/l Penicillin G (Penicillin G, Kat. PEN-NA, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, P.O. 1120, 89552 Steinheim) und 131 mg/l Streptomycin (Streptomycinsulfate, S-6501, Fa. Sigma-Aldrich Chemie, P.O. 1120, 89552 Steinheim) enthaltenen 0,9 %igen NaCl-Lösung gespült. Anschließend erfolgte die Punktion aller 2-5 mm großen Follikeln mit Hilfe einer Vakuumpumpe (VMAR-5100, Fa. W.A.Cook, Australia). Über ein Schlauchsystem war die Unterdruckpumpe mit 6 Aspirationsadaptern verbunden. Jeder Adapter war an ein steriles 50 ml fassendes Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, 72636 Frickenhausen) geschraubt. Die Punktion erfolgte parallel mit einer Durchflußrate, die 20 ml H₂O pro Minute entsprach. Bei Punktion der einzelnen Follikel wurde die Follikelflüssigkeit samt Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) in das Zentrifugenröhrchen gesaugt.

Zur Entfernung der Follikelflüssigkeit sowie Follikelzellen schlossen sich zwei Waschvorgänge an. Dazu wurden die Zentrifugenröhrchen jeweils mit PBS, das mit 1 % FKS supplementiert war, auf ca. 50 ml aufgefüllt, anschließend zehn Minuten stehengelassen und der Überstand dekantiert. Nach dem letzten Waschschritt wurde je 1 ml Sediment in eine Petrischale (Ø 94mm, Fa. Greiner, 72636 Frickenhausen) pipettiert und mit 10 ml PBS angereichert mit 1 % FKS verdünnt. Die Aussortierung der KOK erfolgte unter einem Stereomikroskop (SMZ-2T, Fa. Nikon, 40472 Düsseldorf) bei 30-50-facher Vergrößerung.

Es wurden nur KOK selektiert, deren Zytoplasma dunkel und feingranuliert war und die mindestens drei nicht expandierte Kumuluszellschichten aufwiesen. Die KOK wurden dreimal in PBS, supplementiert mit 1 % FKS, gewaschen.

3.1.2.2 *In-Vitro*-Maturation der unreifen Oozyten

In jede Vertiefung einer Kulturschale (five well dishes, Kat.Nr.: 19021005, Fa. Minitüb, 84184 Tiefenbach) wurde 500 µl sterilfiltriertes Maturationsmedium NCSU 37 (North Carolina State University; FUNAHASHI et al. 1997; RATH et al. 1999; siehe Kapitel 10.1) pipettiert und für zwei Stunden in den Inkubator (Nuaire NU2700 E, Fa. Zapf Instrumente, 31157 Sarstedt) bei 38,5°C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Luft äquilibriert. Die KOK wurden anschließend dreimal in Maturationsmedium gewaschen. Zur Reifung wurde dem Maturationsmedium je 5 µl db-cAMP und 10 I.E. PMSG/hCG pro Milliliter zugegeben (PETTERS u. WELLS 1993). Jeweils 50 Oozyten wurden in die Vertiefung einer Kulturschale gesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h erfolgte die Umsetzung der gereiften KOK in hormon- und db-cAMP freies NCSU 37 für weitere 24 Stunden.

3.1.2.3 *In-Vitro-Fertilisation*

3.1.2.3.1 Vorbereitung der Oozyten

Vor der In-vitro-Befruchtung erfolgte eine Denudierung der gereiften Oozyten durch mehrmaliges auf- und niederpipettieren mit einer 100 µl-Eppendorff-Pipette sowie anschließend dreimaliges Waschen der Oozyten in PBS; supplementiert mit 1 % FKS; und in Fert-Talp-Medium. Es wurden nur Oozyten verwendet, die nach der In-vitro-Reifung einen maximal expandierten Kumulus aufwiesen und deren Zytoplasma fein granuliert erschien. Die Fertilisation der Oozyten erfolgte in äquilibriertem modifiziertem Fert-Talp-Medium (RATH 1997) (Zusammensetzung siehe Kapitel 10.1). Für 50 Eizellen wurde jeweils ein 90 µl großer Tropfen Fert-Talp-Medium in eine Petrischale (Ø 35 mm) pipettiert. Zur Verhinderung der Austrocknung wurden die Mikrodrops mit Siliconöl (DC 200, Kat.-Nr. 35135, Fa. Serva, Carl-Benz-Str.7, 69115 Heidelberg) überschichtet.

3.1.2.3.2 Vorbereitung der Spermien und *In-Vitro-Befruchtung*

In Stickstoff tiefgefrorenes Nebenhodenschwanz(NHS)sperma eines Ebers wurde zur Durchführung der In-vitro-Befruchtung (IVF) verwendet. Das NHS-Sperma wurde in 39°C warmem Wasser für 30 Sekunden aufgetaut und die Motilität unter einem Mikroskop (BH-2Fa., Olympus Optical, Wendenstr. 14-16, 20097 Hamburg) bei 200-facher Vergrößerung kontrolliert. Das Volumen der Spermaprobe wurde mit 10 ml erwärmten ANDROHEP® (39°C) (Kat.-Nr. 13529/0010, Fa. Minitüb, Hauptstr.41, 84184 Tiefenbach) resuspendiert. Zur Entfernung des Einfriermediums schloß sich eine Zentrifugation bei 800 xg für drei Minuten an. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 430 µl Fert-Talp-Medium. Eine erneute Motilitätsprüfung des verdünnten Spermias wurde durchgeführt und 187 µl resuspendiertes Sperma in 2,5 ml Fert-Talp-Medium pipettiert. Zur Durchführung der Befruchtung wurde jedem Mikrodrops je 10 µl der Spermien suspension zugesetzt, so daß das Endvolumen der Mikrodrops 100 µl betrug. Die Endkonzentration entsprach 1500 Spermien pro Oozyte.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 38,5°C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Luft wurden die Zygoten dreimal in NCSU 23 (North Carolina State University; PETERS u. WELLS 1993; Zusammensetzung siehe Kapitel 10.1) gewaschen und in Petrischalen (Ø 35 mm) mit 2 ml NCSU 23 umgesetzt.

Ca. 44 bis 48 Stunden nach Befruchtungsbeginn befanden sich die Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium. Sie wurden dreimal in PBS supplementiert mit 10 % FKS gewaschen und anschließend in Gruppen von 10 bis 20 Embryonen in Plastikstraws (Paillettes bovines, I.V.M., Kat.-Nr. 201 A, Albrecht, Aulendorf) verpackt. Der Transport zum Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover erfolgte in einem Embryotransportgefäß (Fa. Minitüb, Hauptstr.41, 84184 Tiefenbach) bei 38°C.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

Zur Anzüchtung des Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) wurden Schweinenierenzellen, PK(15)A-Zellen, die im Institut für Virologie 1974 kloniert wurden, verwendet. Die Zellen waren frei von BVDV und Mykoplasmen. Die Zellen der 40. Passage wurden aufgetaut und angezüchtet.

3.2.2 Zellpassage und Vermehrung

Die Zellpassage erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich. Dazu wurde das Medium von der Zellkulturflasche (Nunc Easy Flask[®], Kat.-Nr. 156472, Fa. Nunc, 65203 Wiesbaden) entfernt und die 250 ml Flasche zur Entfernung von Mediumresten zweimal mit 5 ml ATV-Lösung (Adjusted-Trypsin-Versen) (nach Dr. Riebe, BFAV Insel Riems; siehe Kapitel 10.1) gewaschen. Nach Zugabe von 2 ml ATV und einer Inkubation von 10 bis 15 Min. bei 37°C lösten sich die Zellen durch vorsichtiges Schütteln der Flasche von der Unterlage. Die Resuspension der gelösten PK(15)-Zellen erfolgte mit 8 ml EMEM-Medium (siehe Kapitel 10.1) mit 5 % FKS²-Zusatz.

² Jede FKS-Charge wurde im Institut für Virologie auf BVDV und BVDV-AK untersucht. Es kamen nur negative Chargen zum Einsatz.

Zur Determination der Zelldichte diente eine Thoma-(alt)-Zählkammer. Die gewünschte Zelldichte wurde mit EMEM-Medium, dem 5 % FKS zugegeben wurde, auf 65000 Zellen/ml eingestellt und in dieser Konzentration auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Zur Einsaat in eine Makrotiterplatte (Gewebekulturplatte, Kat.-Nr. 662160, Fa. Greiner, 72603 Nürtingen) wurde die Zelldichte nach der Zellpassage ebenfalls auf 65000 Zellen/ml eingestellt. Für die Mikrotiterplatte mußte die Zelldichte auf 200000 Zellen/ml erhöht werden.

3.2.2.1 Zellkulturüberstand

Zur Herstellung des Zellkulturüberstandes wurde eine Zellkulturflasche bei -80°C für mindestens 20 Minuten eingefroren. Das Auftauen erfolgte etwa innerhalb 1 Minute im Wasserbad bei 37°C. Die Zellsuspension wurde bei 194 xg 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in 0,5 ml Portionen in Kryoröhrchen (Cellstar®, Fa. Greiner, 72603 Nürtingen) eingefroren. Der Zellkulturüberstand wurde dem NCSU-23-Medium der Negativkontrolle zugegeben.

3.2.3 KSP-Virus

Zur Infektion der Embryonen wurde der KSPV-Stamm Alfort 187 verwendet (DAHLE u. LIESS 1995). Alfort 187 wird als Referenzstamm für die Diagnostik in der EU verwendet (ANON. 2000), dieser Stamm ist in den letzten 10 Jahren aber nicht mehr bei Feldinfektionen in EU-Ländern isoliert worden (FRITZEMEIER 2000).

3.2.3.1 Virusvermehrung

Die Anzüchtung des Virus erfolgte auf PK(15)A-Zellen. Diese wurden am Tag vor der Virusinokulation in 250 ml Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 200000 Zellen/ml eingesät. Das Medium wurde verworfen und 1 ml Virussuspension auf die Zellen gegeben. Anschließend folgte eine Inkubation von 2 Stunden bei 37°C. Der Zellkulturflasche wurde EMEM, das 5 % FKS enthielt, zugegeben. Es schloß sich eine weitere Inkubation bei 37°C für 5-7 Tage an. Zur Gewinnung des Virus wurde die beimpfte Zellkulturflasche bei -80°C für mindestens 20 Minuten eingefroren und anschließend im 37°C warmem Wasserbad in ca. 1 Minute aufgetaut. Das Medium und die lysierten Zellen wurden abgenommen. Die Zellüberreste wurden durch

Zentrifugation bei 194 xg für 10 Minuten vom Virusüberstand getrennt. Der Virusüberstand wurde in 0,5 ml Portionen bei -80°C eingefroren. Drei Portionen wurden zur Bestimmung des Virustiters aufgetaut.

3.2.3.2 Virustitration

3.2.3.2.1 Rücktitration

Zur quantitativen Bestimmung des Virusgehaltes wurde die Ausgangsvirus suspension in log₁₀-Stufen in einer Verdünnungsreihe mit EDULB-Medium (Kapitel 10.1) angesetzt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl in vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (Costar[®], 96 well cell culture cluster, Kat.-Nr. 3598, Fa. Costar, Bodenheim), deren Vertiefungen PK(15)A-Zellen in einer Konzentration von 200000/ml enthielten, verbracht. Die Mikrotiterplatte wurde 72 Stunden in der feuchten Kammer bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine direkte Immunfärbung mit 9-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Farbstoff folgte. Die Ermittlung des KSPV-Titers erfolgte nach der Formel von KÄRBER (1931) in KID₅₀/ml.

3.2.4 Virusnachweis

3.2.4.1 Direkte Immunfärbung (AEC-Färbung)

Zum Nachweis von KSPV in PK(15)A-Zellen wurde das Medium je nach Ansatz aus der Makro- oder Mikrotiterplatte entfernt und die Vertiefungen einmal mit 33 %iger PBS gewaschen. Durch Absaugen des Überstandes mit einer Vakuumpumpe (Vacusafe[®], Fa. Integra Bioscience GmbH, D-35463 Fernwald) wurde eine maximale Trockenheit der Zellen gewährleistet, da die Zellen sonst beim anschließenden Trocknungsvorgang verbrennen würden. Die Fixierung erfolgte bei 80°C für 3 Stunden. Der Zellrasen wurde nach der Hitzefixation auf Zimmertemperatur abgekühlt und zur besseren Konjugatverteilung einmal mit PBS-Tween (siehe Kapitel 10.1) gewaschen. Das im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover hergestellte C16-Konjugat (MOENNIG et al. 1987), wurde 1:500 mit PBS-Tween verdünnt. Das C16-Konjugat ist ein in der Maus hergestellter IgG-Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist. Es ist gegen das Pestivirusprotein NS2-3

gerichtet. Je 200 µl des Konjugats wurden in eine Vertiefung einer Makroplatte eingefüllt oder es wurden 50 µl pro Vertiefung bei Verwendung einer Mikrotiterplatte benutzt. Die jeweilige Platte wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch dreimaliges Waschen des Zellrasens mit PBS-Tween und einmaliges Waschen mit vollentmineralisiertem (VE) Wasser wurde das ungebundene Konjugat beseitigt. 200 µl frisch angesetzte AEC-Gebrauchslösung (siehe Kapitel 10.1) bei Verwendung der Makroplatte bzw. 50 µl bei Verwendung der Mikrotiterplatte wurde in jede Vertiefung pipettiert. Nach 15 bis 20 Minuten wurde die Substratumsetzung durch einmaliges Waschen mit Aqua bidest. beendet.

3.2.4.1.1 Auswertung der direkten Immunfärbung und Beurteilung der Virusinfektion

Die Beurteilung der direkten Immunfärbung erfolgte unter dem Mikroskop (Inverses Mikroskop, Leitz, Wetzlar) im Hellfeld bei 40- und 100-facher Vergrößerung. Eine Rotfärbung des Zytoplasmas bei deutlich ausgespartem Nukleus galt als positiv, d.h. KSP-Virus war in die empfänglichen Zellen eingedrungen und hatte sich im Zytoplasma vermehrt.

Die Stärke der Virusinfektion wurde in geringgradig, mittelgradig und hochgradig eingestuft. Als geringgradige Infektion mit dem KSPV galt die Anfärbung von nur wenigen, vereinzelt Zellen innerhalb einer Vertiefung der Makroplatte. Eine mittelgradige Infektion äußerte sich darin, daß etwa die Hälfte der Zellen einer Vertiefung angefärbt wurden. Waren alle Zellen einer Vertiefung angefärbt, so wurde die Infektion mit dem KSPV als hochgradig eingestuft.

3.3 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit gliederte sich in fünf Abschnitte:

In einem Vorversuch wurde zunächst die tägliche Abnahme des Virustiters in NCSU-23-Medium bestimmt, ohne daß infizierbare Zellen vorhanden waren. Die Virussuspension wurde dem Medium in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde täglich 0,5 ml virushaltiges Medium entnommen und bei -80°C eingefroren. Die Virustitration erfolgte wenige Tage später.

Im ersten Abschnitt des Hauptversuches wurde die Empfänglichkeit von *in vitro* erstellten porzinen Embryonen, deren Zona pellucida lichtmikroskopisch auf Unversehrtheit überprüft wurde, auf KSPV untersucht. Die Embryonen wurden dazu ab dem Zwei- bis Vier-Zellstadium mit dem KSPV-Referenzstamm Alfort 187 für maximal 5 Tage kokultiviert.

Im zweiten Abschnitt des Hauptversuches wurden *in vivo* produzierte Zwei- bis Vier-Zellstadien auf ihre Infektionsbereitschaft mit dem KSPV analog zum ersten Versuchsabschnitt untersucht.

Aus den Zwischenergebnissen des ersten Versuchsabschnittes ergaben sich zwei weitere Versuche:

Der dritte Abschnitt des Hauptversuches diente zum Nachweis der Empfänglichkeit der Blastomeren von *in vitro* erstellten Embryonen gegenüber KSPV. Vor der Kokultivierung mit dem KSPV-Referenzstamm Alfort 187 wurde die Zona pellucida mit 0,75 %iger Pronaselösung (Kat.-Nr. P-6911, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) entfernt. Anschließend wurden die Blastomeren mit dem KSPV über einen Zeitraum von 3 Tagen kokultiviert.

Im vierten Abschnitt des Hauptversuches wurde erneut die Empfänglichkeit auf KSPV von *in vitro* erstellten Zona-pellucida-intakten Zwei- bis Vier-Zellstadien untersucht. Die Inkubationszeit wurde allerdings auf 48 Stunden reduziert, da aus den Zwischenergebnissen des ersten Abschnittes des Hauptversuches vermutet wurde, daß eine Virusvermehrung in den Embryonen nicht erfolgt, aber die Inkubationszeit für die Anheftung von KSPV an der Zona pellucida eine Rolle spielen

könnte. Der Versuchsansatz entspricht dem ersten Versuchsabschnitt mit verkürzter Inkubationszeit von 48 Stunden.

3.3.1 Infektion von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida

Die Embryonen wurden nach Ankunft im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zunächst aus den Plastikstraws in vorgewärmtes PBS, die mit 5 % FKS ergänzt war, pipettiert und dann in NCSU 23 dreimal gewaschen. Die Infektion der Embryonen erfolgte mit dem KSPV, Referenzstamm Alfort 187. Es wurde 10 µl virushaltiger PK(15)A-Zellkulturüberstand zu je 2 ml NCSU 23 pipettiert. Die Viruskonzentration lag bei mindestens 10^5 KID₅₀ auf 2 ml Medium. Es wurden maximal 50 Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium in 2 ml KSPV-haltigem NCSU 23 kultiviert. Gleichzeitig wurde zur Bestimmung der Blastozystenrate eine Negativkontrolle, der anstatt von KSP-virushaltigem Zellkulturüberstand 10 µl virusfreier PK(15)A-Zellkulturüberstand zugegeben wurde, unter gleichen Bedingungen angesetzt. Die Abbildung 7 zeigt nicht infizierte PK(15)A-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 96 bis 120 Stunden in feuchtigkeitsgesättigter Luft mit 5 % CO₂ bei 38,5 °C.

Nach 96 Stunden fand eine erste Kontrolle der Entwicklungsfähigkeit der Embryonen anhand der Anzahl der Blastozysten, die sich entwickelt hatten, statt. Die Blastozysten wurden der Kultur entnommen und in Gruppen von ca. 10 Blastozysten zehnmal in 2 ml PBS, die mit 5 % FKS supplementiert war, gewaschen, wobei die Blastozysten in maximal 20 µl Waschlösung weiter pipettiert wurden. Für jeden Waschgang wurde die Pipettenspitze (Pipettenspitzen gelb, Kat.-Nr. 2100601, Ratiolab GmbH, Am Siebenstein 5, 63303 Dreieich) gewechselt. Anschließend wurden die einzelnen Waschgruppen getrennt in je eine Vertiefung einer Makroplatte auf PK(15)A-Zellen simultan eingesät. Ebenso wurde mit der Negativkontrolle verfahren. Zur Überprüfung, ob die Waschlösungen noch virushaltig waren, wurde ein Aliquot von 200 µl von jeder Waschlösung nach der Waschprozedur ebenfalls in je eine Vertiefung der Makroplatte auf PK(15)A-Zellen gegeben.

Nach weiteren 24 Stunden fand eine zweite Kontrolle auf Blastozysten statt. Die entstandenen Blastozysten wurden aus der Kultur entnommen und mit ihnen wie eben beschrieben verfahren (siehe Abb. 4).

Die Makroplatte wurde 72 Stunden bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert (ANON. 1998 b). Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Makroplatte einmal mit 33 %iger PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei 80°C für 3 Stunden im Trockenschrank (Fa. Ehret, Emmerdingen). Zum Virusnachweis wurde eine direkte Immunfärbung durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.4.1).

3.3.2 Infektion von *in vivo* produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida

Die Infektion von *in vivo* produzierten Zona pellucida intakten Schweineembryonen erfolgte analog wie unter Kapitel 3.3.1 beschrieben (siehe Abb. 4).

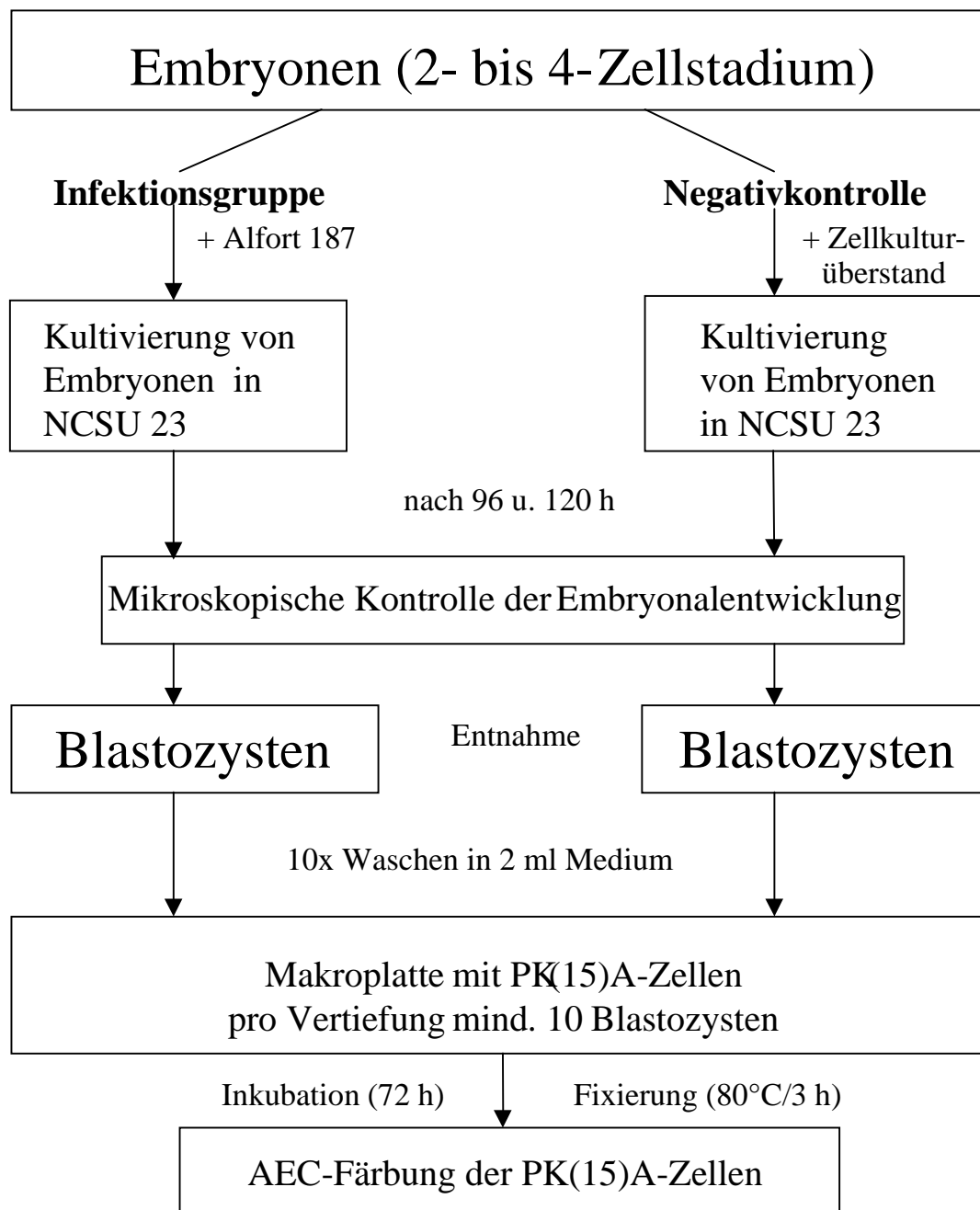


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Infizierung von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium mit intakter Zona pellucida

3.3.3 Infektion von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen nach Ablösung der Zona pellucida

Vor der Infektion der Embryonen wurde die Zona pellucida der Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium enzymatisch entfernt (siehe Abb. 5). Die Embryonen wurden dazu in PBS, die mit 5 % FKS supplementiert war, pipettiert. In Gruppen zu je 5 Embryonen wurden diese anschließend unter mikroskopischer Sichtkontrolle für ca. 10 Sekunden in 0,75 %ige Pronaselösung gesetzt. Die Umsetzung der Embryonen in PBS, die 5 % FKS enthielt, erfolgte sobald eine Auflockerung der Zona pellucida sichtbar wurde. Die embryonalen Zellen wurden dreimal in NCSU 23 gewaschen und anschließend in Gruppen von je 50 Embryonen in 2 ml NCSU 23 mit dem KSPV, Stamm Alfort 187 kokultiviert. Die Viruskonzentration betrug mindestens 10^5 KID₅₀ auf 2 ml Medium. Eine Negativkontrolle wurde gleichzeitig angesetzt. Die Behandlung der Negativkontrolle erfolgte analog zu den infizierten Embryonen. Anstatt Virus wurde 10 µl Zellkulturüberstand zugegeben. Um die Entwicklungsfähigkeit des Embryonenpools kontrollieren zu können, wurde eine dritte Zona-pellucida-intakte Embryonengruppe unter gleichen Bedingungen angesetzt. Die Kultivierung der Embryonen bzw. der embryonalen Zellen erfolgte bei 38,5°C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Luft für 72 Stunden. Die embryonalen Zellen wurden anschließend zehnmal in 2 ml PBS, die mit 5 % FKS supplementiert war, gewaschen und in eine Vertiefung einer Makrotiterplatte auf PK(15)A-Zellen umgesetzt. Zur Kontrolle, ob die Waschlösungen virushaltig waren, wurden 200 µl der ersten bis dritten und der zehnten Waschlösung ebenfalls auf PK(15)A-Zellen pipettiert. Eine 72-stündige Inkubation der Makrotiterplatte bei 37°C unter 5 %iger CO₂-Begasung erfolgte anschließend. Nach der Fixierung der Zellen bei 80°C für 3 Stunden und nach mikroskopischer Kontrolle schloß sich ein Waschvorgang mit 33 %igem PBS an. Zum Virusnachweis wurde die direkte Immunfärbung (siehe Kapitel 3.2.4.1) durchgeführt.

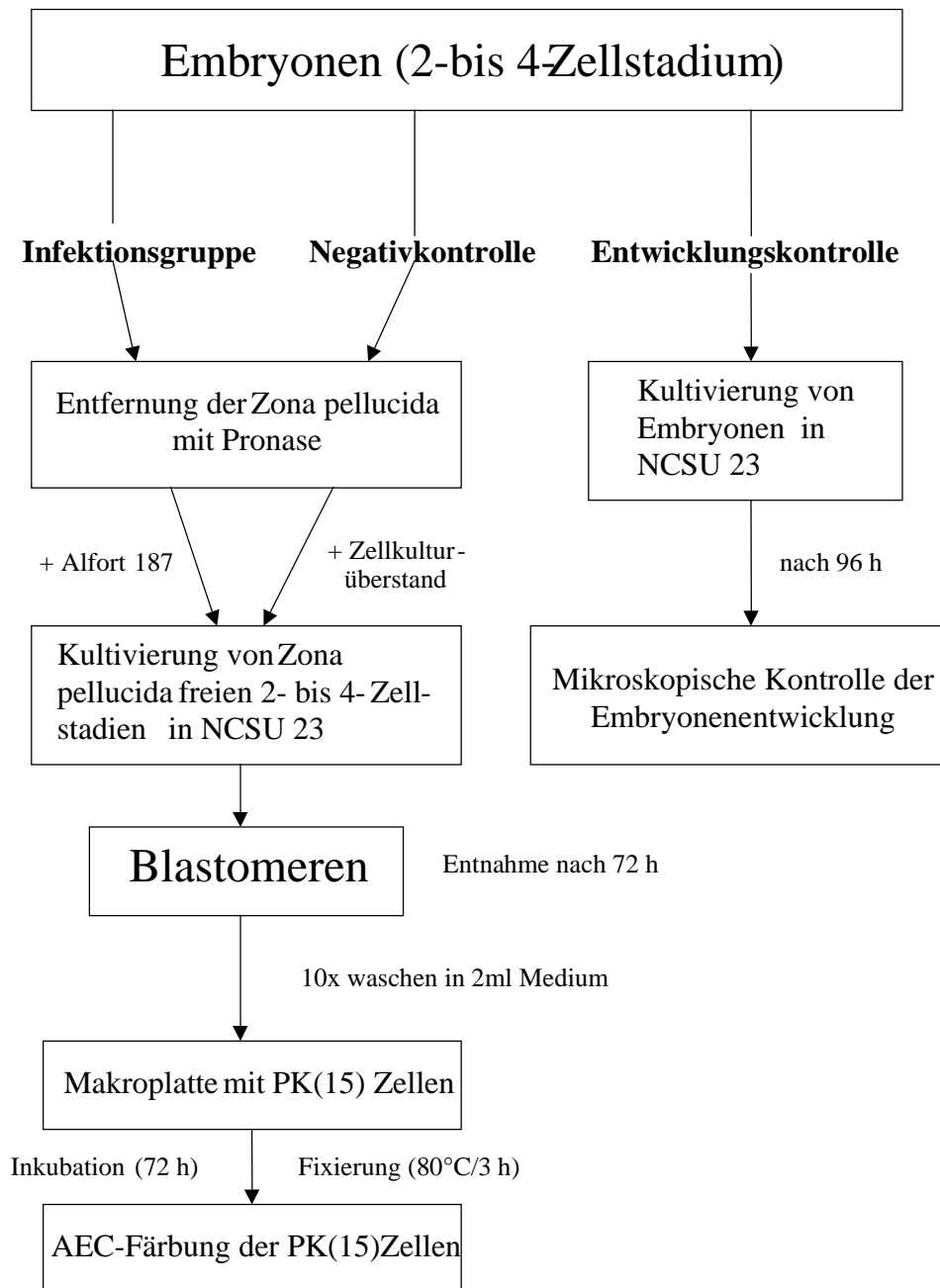


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Infizierung von *in vitro* produzierten Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium nach Ablösung der Zona pellucida

3.3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und Sigma Stat for Windows® (Jandel Scientific Cooperation, Erkrath) verwendet. Die Auswertung erfolgte teilweise im Institut für Statistik und Biometrie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Die Auswertung und der Vergleich der Infektionsergebnisse der *in vitro* und *in vivo* erstellten Embryonen wurde anhand der Anzahl der positiven Waschgruppen mit dem χ^2 -Test vorgenommen.

Um den Einfluß des KSPV auf Entwicklung der Embryonen vergleichen zu können, wurden die Blastozystenraten der Infektions- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Die Blastozystenrate der beiden Gruppen wurden zunächst pro Versuchsdurchgang ermittelt. Die Blastozystenrate setzt sich zusammen aus der Anzahl der entstandenen Blastozysten nach einer Inkubationszeit von 96 bis 120 Stunden bezogen auf die Gesamtzahl der Embryonen der Ausgangskultur und wird in Prozent angegeben. Die Einzelwerte wurden im χ^2 -Test miteinander verglichen und in den Tabellen als Mittelwerte angegeben.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ galten die Unterschiede zwischen den Gruppen als signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch: Titerverlauf des KSP-Virus im Embryokulturmedium NCSU 23 in Abwesenheit empfänglicher Zellen

Der KSP-Virustiter in NCSU-23-Medium nahm, wenn empfängliche Zellen nicht anwesend waren, täglich zwischen einer halben und zwei Titerstufen ab. Bis einschließlich des 4. Kultivierungstages war KSPV noch nachweisbar.

Der Virustiter des Ausgangsmediums betrug $10^{5,5}$ KID₅₀/2 ml. In den ersten 24 Stunden kam es zu einer Reduktion des Virustiters von einer halben Titerstufe auf $10^{5,0}$ KID₅₀/2 ml. Zwischen dem 1. und 2. Tag fiel der Virustiter von $10^{5,0}$ auf $10^{2,9}$ KID₅₀/2 ml um nahezu zwei Titerstufen ab. Nach 3 Tagen lag der Virustiter nur noch bei $10^{2,3}$ KID₅₀/2 ml und verringerte sich auf $10^{-0,75}$ KID₅₀/2 ml am 4. Tag. Am 5. Tag konnte kein Virus mehr nachgewiesen werden. Der KSP-Virustiter lag unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze. In der Abbildung 6 ist der Abfall des KSPV-Virustiters pro Tag graphisch dargestellt.

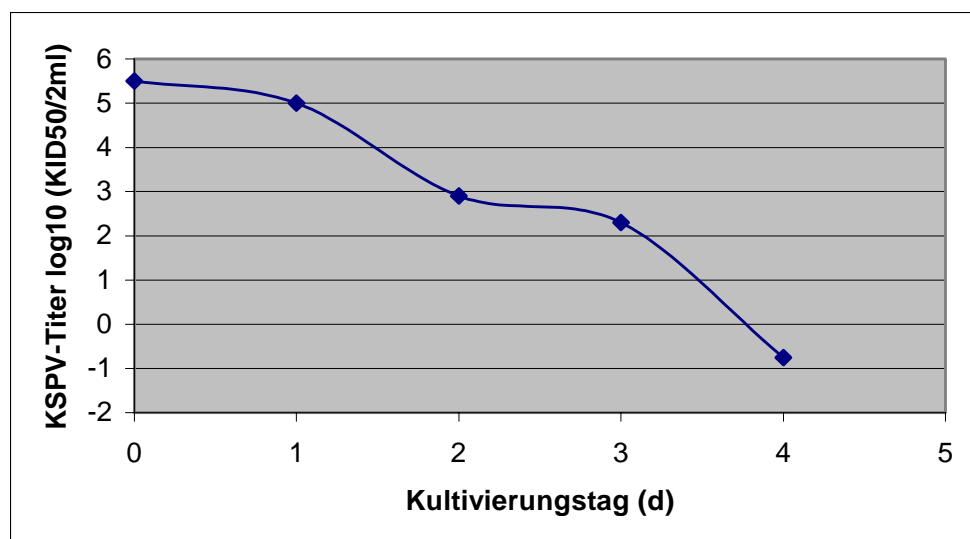


Abbildung 6: KSPV-Titerverlauf in NCSU 23 über einen Zeitraum von 5 Tagen

4.2 KSPV-Empfänglichkeit von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida

Für die Untersuchung der Infektionsbereitschaft von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen mit KSPV wurden insgesamt 1091 Schweineembryonen *in vitro* produziert. 721 Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium wurden mit dem KSPV in 13 Gruppen in NCSU-23-Medium bis zur Blastozyste (96 bis 120 Stunden) kokultiviert. Der KSP-Virustiter der Ausgangskultur betrug $10^{5,1} \pm 10^{0,2}$ KID₅₀/2 ml. Die verbleibenden 370 Embryonen wurden in 9 Gruppen in NCSU-23-Medium mit KSPV-freiem Zellkulturüberstand über den gleichen Zeitraum kultiviert (Kontrollgruppe). Nach 96-stündiger Kokultivierung betrug die Blastozystenrate für die infizierte Gruppe 15,7 % und für die Kontrollgruppe 15,7 %. In 9 Wiederholungen entwickelten sich nach einer Inkubation von 120 Stunden insgesamt 147 (19,1 % \pm 10,8) Embryonen in der KSPV-infizierten Gruppe und 71 (18,9 % \pm 10,6) in der Kontrollgruppe zur Blastozyste. Die Blastozysten der KSPV-infizierten Gruppe wurden in 17 Waschgruppen mit durchschnittlich 8 Embryonen und die Blastozysten der Kontrollgruppe in 12 Waschgruppen mit durchschnittlich 6 Embryonen aufgeteilt. Nach zehnmaliger Waschung konnte in der direkten Immunfärbung bei keiner Gruppe der infizierten Embryonen eine KSPV-positive Reaktion der PK(15)A-Zellen nachgewiesen werden. Von 13 NCSU-23-Medien, in denen die Embryonen mit KSPV kokultiviert wurden, konnte in 4 Medien nach 96-stündiger Kultivierung KSPV nachgewiesen werden. In allen weiteren Waschlösungen konnte kein KSPV nachgewiesen werden. An *in vitro* produzierten Embryonen war nach einer Inkubationszeit von 96 bis 120 Stunden kein KSPV-Nachweis mehr möglich (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: KSPV-Infektion von *in vitro* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida

| | KSPV-infizierte Gruppe | Kontrollgruppe |
|--|------------------------|-----------------------|
| Gesamtzahl der eingesetzten Embryonen | 721 | 370 |
| Blastozystenzahl Blastozystenrate | 147 (19,1 % ± 10,8) | 71 (18,9 % ± 10,6) |
| Anzahl der Waschgruppen | 17 | 12 |
| Anzahl der Gruppen mit positivem KSPV-Nachweis | 0 | 0 |

4.3 KSPV-Empfänglichkeit von *in vivo* produzierten porzinen Embryonen mit intakter Zona pellucida

An 8 Versuchstagen wurden von 34 Jungsauen mit einem Lebendgewicht von 70 bis 105 kg ($85 \text{ kg} \pm 8,7$) 2 Tage nach der Besamung 826 Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium gewonnen.

Von diesen Embryonen wurden 603 mit KSPV infiziert und 193 der Kontrollgruppe zugeteilt. Der Virustiter der Ausgangskultur betrug $10^{5,9} \pm 10^{0,85}$ KID₅₀/2 ml. Die Inkubationsdauer bis zur Blastozystenentwicklung variierte zwischen 96 und 120 Stunden. Nach 96 Stunden wurden die Embryonen beurteilt und die Blastozystenrate ermittelt, die für die KSPV-infizierten Gruppen 43,2 % und für die Kontrollgruppe 59,1 % betrug. Nach weiteren 24 Stunden erreichten zusätzliche Embryonen das Blastozystenstadium. Die Blastozystenrate der infizierten Gruppen lag insgesamt bei $68,2 \% \pm 19,9$, die der Kontrollgruppe bei $81,9 \% \pm 9,7$. Es entwickelten sich 382 ($68,2 \% \pm 19,9$) Embryonen in der infizierten Gruppe und 158 ($81,9 \% \pm 9,7$) in der Kontrollgruppe zur Blastozyste. Aus den Blastozysten der infizierten Gruppe wurden insgesamt 50 Waschgruppen und aus der Kontrollgruppe 19 Waschgruppen gebildet. Die Waschgruppen enthielten im Durchschnitt 8 Blastozysten. Von den 50 untersuchten Waschgruppen der KSPV-infizierten Gruppe wurde bei 8 Gruppen durch Kokultivierung der Embryonen auf PK(15)A-Zellen KSPV nachgewiesen. Der PK(15)-Zellrasen wies nach der Durchführung der direkten Immunfärbung nur fokal verteilte, spezifische Rotfärbungen des Zytoplasmas (Abbildung 8) auf. Der Gehalt an KSPV wurde makroskopisch semiquantitativ als geringgradig eingestuft.

KSPV konnte in allen NCSU-23-Medien, in denen die Embryonen mit KSPV (96 bis 120 h) kultiviert wurden, nachgewiesen werden. Bis zur 3. Waschlösung war KSPV nachweisbar. Die 10. Waschlösung war immer KSPV-negativ, weshalb das nachgewiesene KSPV von den Embryonen stammen mußte. Bei 18,6 % der *in vivo* produzierten porzinen Embryonen konnte KSPV nachgewiesen werden (siehe Tab. 3).

Tabelle 3: KSPV-Infektion von *in vivo* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida

| | KSPV-infizierte Gruppe | Kontrollgruppe |
|--|------------------------|-----------------------|
| Gesamtzahl der eingesetzten Embryonen | 603 | 193 |
| Blastozysten (Blastozystenrate) | 382 (68,2 % ± 19,9) | 158 (81,9 % ± 9,7) |
| Anzahl der Waschgruppen | 50 | 19 |
| Anzahl der Gruppen mit positivem KSPV-Nachweis | 8 | 0 |

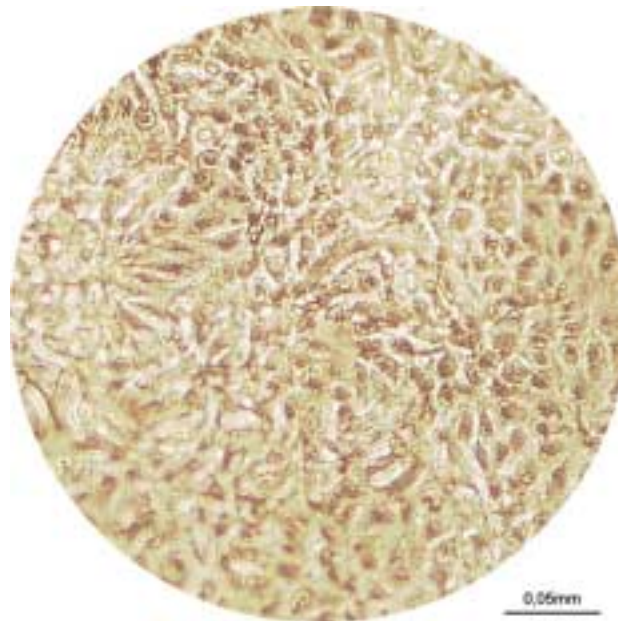


Abbildung 7: Nicht infizierte PK(15)A-Zellen (Negativkontrolle)

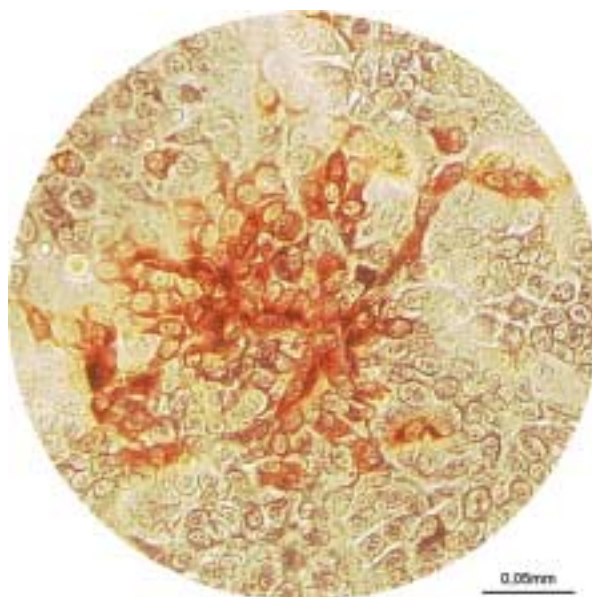


Abbildung 8: Infizierte PK(15)A-Zellen nach 96-stündiger Kokultivierung von *in vivo* produzierten Embryonen mit KSPV

4.4 Beeinflussung der Entwicklungsfähigkeit von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen durch das KSPV

Die Beeinflussung der Entwicklungsfähigkeit von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen durch KSPV wurde in parallelen Versuchsdurchgängen ermittelt. Die Qualität der *in vitro* erzeugten Embryonen wies stärkere Schwankungen auf als bei *in vivo* produzierten Embryonen. Von 721 *in vitro* produzierten Embryonen der KSPV-infizierten Gruppe entwickelten sich insgesamt 147 (19,1 % \pm 10,8) zur Blastozyste. In der Kontrollgruppe entstanden 71 (18,9 % \pm 10,6) Blastozysten aus 370 Embryonen. Die Blastozystenrate zwischen den infizierten Gruppen und den Kontrollgruppen unterschied sich nicht signifikant (19,1 % \pm 10,8 vs. 18,9 % \pm 10,6; $p \geq 0,05$). In Tabelle 4 sind die Blastozystenraten der *in vitro* produzierten Embryonen der KSPV-infizierten Gruppen und der Kontrollgruppen für die einzelnen Wiederholungen (Wdh.) vergleichend dargestellt.

Tabelle 4: Die Blastozystenrate (%) von *in vitro* produzierten Embryonen

| Wdh. | KSPV-infizierte Gruppe | | | Kontrollgruppe | | |
|------------------|------------------------|------------------------------|---------|------------------------------|-----------------|---------|
| | n | BZ | BZR (%) | n | BZ | BZR (%) |
| 1 | 52 | 5 | 9,6 | 30 | 3 | 10,0 |
| 2 | 85 | 3 | 3,5 | 45 | 5 | 11,1 |
| 3 | 50 | 11 | 22,0 | 14 | 2 | 14,3 |
| 4 | 73 | 10 | 13,7 | 50 | 1 | 2,0 |
| 5 | 100 | 17 | 17,0 | 49 | 12 | 24,5 |
| 6 | 60 | 9 | 15,0 | 50 | 10 | 20,0 |
| 7 | 100 | 37 | 37,0 | 32 | 11 | 34,4 |
| 8 | 98 | 20 | 20,4 | 50 | 11 | 22,0 |
| 9 | 103 | 35 | 34,0 | 50 | 16 | 32,0 |
| Σ | 721 | 147 ^a | | 370 | 71 ^b | |
| $\bar{x} \pm SD$ | | 19,1 ^a \pm 10,8 | | 18,9 ^b \pm 10,6 | | |

a:b $p > 0,05$

Es entstanden aus 603 *in vivo* produzierten Embryonen der KSPV-infizierten Gruppe 382 (68,2 % \pm 19,9) Blastozysten. In der Kontrollgruppe entwickelten sich 158 (81,9 % \pm 9,7) Blastozysten aus 193 Embryonen. Im Gegensatz zu den *in vitro* erzeugten Embryonen entwickelten sich aus *in vivo* erstellten Embryonen signifikant weniger Blastozysten in der Infektionsgruppe als in der Kontrollgruppe (68,2 % \pm 19,9 vs. 81,9 % \pm 9,7; $p \leq 0,001$). In der Tabelle 5 sind die Blastozystenraten der *in vivo* produzierten Embryonen der KSPV-infizierten Gruppe und der Kontrollgruppe vergleichend für die einzelnen Wiederholungen dargestellt.

Tabelle 5: Die Blastozystenrate (%) von *in vivo* produzierten Embryonen

| Wdh. | KSPV-infizierte Gruppe | | | Kontrollgruppe | | |
|------------------|------------------------------|------------------|---------|-----------------------------|------------------|---------|
| | n | BZ | BZR (%) | n | BZ | BZR (%) |
| 1 | 146 | 59 | 40,4 | 30 | 27 | 90 |
| 2 | 50 | 47 | 94,0 | 27 | 21 | 77,8 |
| 3 | 30 | 20 | 66,7 | 14 | 13 | 92,9 |
| 4 | 100 | 80 | 80,0 | 25 | 21 | 84,0 |
| 5 | 86 | 33 | 38,4 | 30 | 21 | 70,0 |
| 6 | 90 | 63 | 70,0 | 18 | 12 | 66,7 |
| 7 | 41 | 29 | 70,7 | 19 | 16 | 84,2 |
| 8 | 60 | 51 | 85,0 | 30 | 27 | 90,0 |
| Σ | 603 | 382 ^a | | 193 | 158 ^b | |
| $\bar{x} \pm SD$ | 68,2 ^a \pm 19,9 | | | 81,9 ^b \pm 9,7 | | |

a:b $p \leq 0,001$

4.5 KSPV-Infektion von *in vitro* produzierten Embryonen nach Ablösung der Zona pellucida

Insgesamt wurden 424 *in vitro* produzierte Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium für den Versuch verwendet. Die Zona pellucida wurde von 308 Embryonen enzymatisch entfernt. 170 Zona pellucida-freie Embryonen wurden mit dem KSPV in NCSU-23-Medium bei einem KSPV-Titer von $10^{5,64} \pm 10^{0,38}$ KID₅₀/2 ml kokultiviert, während 138 Embryonen ohne Zona pellucida in der Kontrollgruppe in KSPV-freiem NCSU-23-Medium kultiviert wurden. Die restlichen Embryonen mit intakter Zona pellucida dienten zur Überprüfung der Entwicklungsfähigkeit des Embryonenpools. Sie wurden ohne KSPV für 96 Stunden kultiviert.

Die Blastomeren der KSPV-infizierten Gruppe wurden in 6 Gruppen und die Kontrollgruppe in 5 Gruppen aufgeteilt. Nach den Waschvorgängen (Kapitel 3.3.1) wurde in 6 KSPV-infizierten Gruppen in den PK(15)A-Zellen KSPV nachgewiesen. Der gesamte PK(15)A-Zellrasen einer Vertiefung war nach der direkten Immunfärbung spezifisch rotgefärbt (Abbildung 9). Die makroskopisch semiquantitative Beurteilung ergab, daß im Gegensatz zu den Zona-pellucida-intakten Embryonen KSPV hochgradig vorhanden war.

Im NCSU-23-Medium, in denen die Blastomeren mit KSPV kultiviert wurden, konnte bei allen Versuchen KSPV mittel- bis hochgradig nachgewiesen werden und auch im 1. bis 3. Waschschrift war der KSPV-Nachweis noch geringgradig möglich. Der 10. Waschschrift war immer negativ. Das in den PK(15)A-Zellen nachgewiesene KSPV konnte demnach nur aus den Blastomeren stammen. Blastomeren von *in vitro* produzierten Embryonen sind mit dem KSPV infizierbar.

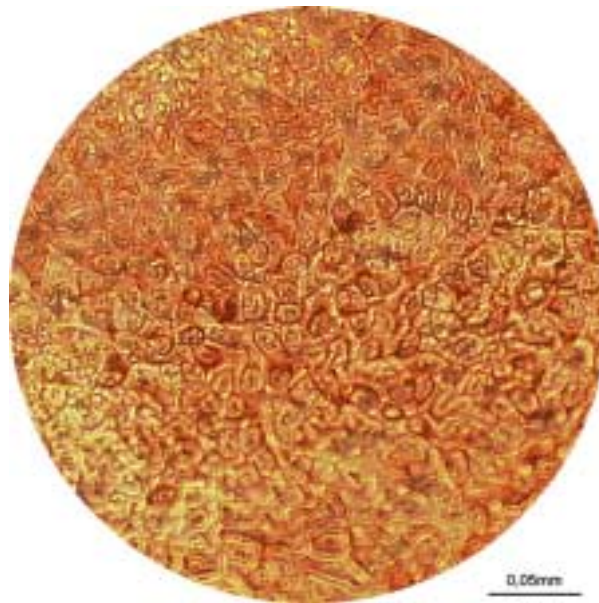


Abbildung 9: Infizierte PK(15)A-Zellen nach Kokultivierung von Blastomeren aus *in vitro* produzierten Embryonen mit KSPV

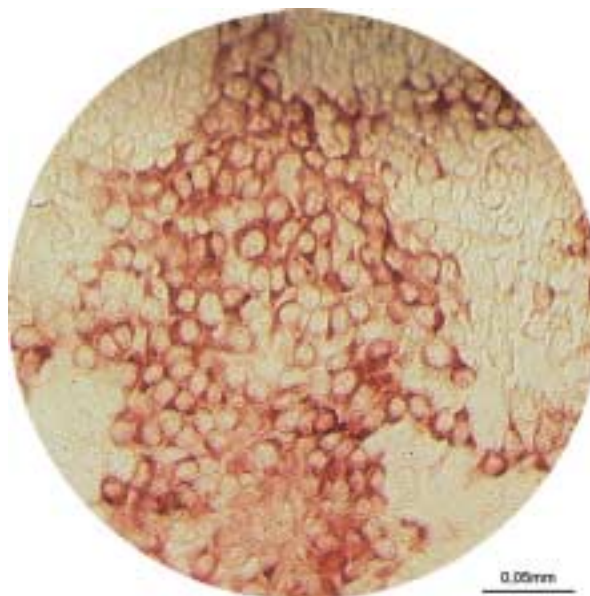


Abbildung 10: Infizierte PK(15)A-Zellen nach 48-stündiger Kokultivierung von *in vitro* produzierten Embryonen mit KSPV

4.6 KSPV-Infektion von *in vitro* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida bei einer verkürzten Inkubationszeit (48h)

Die Inkubationszeit wurde in diesem Versuchsabschnitt auf 48 Stunden verkürzt, um festzustellen, ob ein höherer Virustiter im Ausgangsmedium über den gesamten Inkubationszeitraum das Ergebnis des Virusnachweises bei *in vitro* produzierten Embryonen beeinflusst. Es wurden 88 *in vitro* produzierte Embryonen für 48 Stunden mit dem KSPV in NCSU-23-Medium kokultiviert. Der Virustiter lag bei $10^{5,8}$ KID₅₀/2 ml. Die Kontrollgruppe bestand aus 14 *in vitro* produzierte Embryonen.

Nach der Inkubation wurden die Embryonen der infizierten Gruppe, die sich noch nicht zu Blastozysten entwickelt hatten auf 6 Waschgruppen und die Embryonen der Kontrollgruppe auf 2 Waschgruppen aufgeteilt. Von 6 KSPV-infizierten Gruppen erwiesen sich 3 Gruppen bei der Kokultivierung mit PK(15)A-Zellen in der direkten Immunfärbung als KSPV-positiv. Eine spezifische Rotfärbung von PK(15)A-Zellen zeigte sich fokal an einigen Stellen des Zellrasens. Der KSPV-Nachweis war makroskopisch semiquantitativ geringgradig (siehe Abb. 10).

KSPV konnte bei allen KSPV-infizierten Gruppen im NCSU-23-Kultivierungsmedium sowie im 1. Waschschrift nachgewiesen werden. Im 10. Waschschrift konnte bei allen Gruppen kein KSPV mehr nachgewiesen werden. Das nachgewiesene KSPV konnte nur von den Embryonen stammen. Die *in vitro* produzierten Embryonen sind bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden empfänglich für das KSPV.

5 Diskussion

Untersuchungen über Interaktionen von KSP-Viren und porzinen Embryonen liegen bislang nur in begrenztem Umfang vor. Versuche, die sich mit *in vitro* produzierten porzinen Embryonen bezüglich ihrer Empfänglichkeit mit KSP-Viren befassen, wurden hier das erste Mal durchgeführt. Befunde, die anhand von *in vivo* produzierten Embryonen gefunden wurden, können dabei nicht ohne weiteres auf *in vitro* produzierte Embryonen übertragen werden, da bekannt ist, daß die Entwicklungspotenz und die Ausbildung einzelner Kompartimente bei *in vitro* erstellten Embryonen herabgesetzt ist (NIEMANN et al. 1982, 1989; RATH 1997; FREITAG 1998; WANG et al. 1998). Daher wurde die Empfänglichkeit von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen gegenüber KSPV in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht.

5.1 Virustiter

Ein geeignetes Kulturmedium für Schweineembryonen ist z.B. NCSU 23 (PETTERS u. WELLS 1993). Es wird benötigt, um den Zeitraum von der Embryonengewinnung bis zum Embryotransfer zu überbrücken, und Embryonen für einige Stunden bis wenige Tage *in vitro* zu kultivieren (NIEMANN u. MEINECKE 1993). Das NCSU-23-Medium sollte auch für die Versuche zum KSPV-Nachweis verwendet werden. Daher war zunächst zu prüfen wie sich KSPV in NCSU 23 verhält. Die Eignung des NCSU-23-Mediums für die Kultivierung von KSPV wurde durch eine Inkubation von KSPV in NCSU 23 unter Bedingungen, die für porzine Embryonen geeignet waren, über einen Zeitraum von fünf Tagen festgestellt.

Der Virustiter in NCSU-23-Medium nahm täglich zwischen einer halben Titerstufe bis zu zwei Titerstufen ab. Ein KSPV-Nachweis war noch bis einschließlich des vierten Kultivierungstages möglich. Nach fünf Tagen lag der KSPV-Virustiter unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze.

Der KSPV-Titerverlauf wurde von KUBIN (1967) und DEPNER et al. (1992) in KSPV-geeigneten Medien unter verschiedenen Einflüssen untersucht. KUBIN (1967) untersuchte die Thermoresistenz von KSPV-Stämmen und stellte fest, daß der

Virustiterabfall mit steigender Temperatur zunahm. Bei 4°C war der Virustiter innerhalb von vier Wochen um vier Titerstufen gefallen, während bei 21 °C der Abfall des Virustiters um vier Titerstufen schon nach 1 Woche und bei 37°C schon nach 48 Stunden erreicht war. DEPNER et al. (1992) inkubierten verschiedene KSPV-Stämme in Medium mit unterschiedlichen pH-Werten bei verschiedenen Temperaturen. Die Virusinfektiosität bei einem pH-Wert von vier war bei 4°C nach 260 Stunden auf die Hälfte reduziert, während bei 21°C nach elf Stunden nur noch die Hälfte der Virusinfektiosität vorhanden war. Sie schlossen aus ihren Versuchen, daß die Virusinfektiosität hauptsächlich von der Temperatur abhängig war und weniger vom pH-Wert.

In den eigenen Versuchen wurde festgestellt, daß das NCSU-23-Medium nach Äquilibrierung einen pH-Wert von 7,2 – 7,4 besitzt und keinen toxischen Einfluß auf das KSPV hatte. Ein Abfall des Virustiters war in den eigenen Versuchen insofern zu erwarten, da keine KSPV-empfindlichen Zellen der Kultur zugegeben wurden, die eine Virusreplikation ermöglichen konnten. Der Abfall des Virustiters innerhalb von fünf Tagen unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze wird durch die hohe Inkubationstemperatur von 38,5°C begünstigt. Mit einem Virustiterabfall innerhalb von fünf Tagen unterhalb der kulturellen Nachweisgrenze mußte daher gerechnet werden. Eine mehrtägige Inkubation der Embryonen mit dem KSPV erschien sinnvoll, um dem Virus, dessen Generationszeit zwischen vier und sechs Stunden liegt (MENGELING u. DRAKE 1969), ausreichend Zeit zur Vermehrung zu geben und gleichzeitig die Entwicklungspotenz der Embryonen vom Zwei-Zellstadium bis zur Blastozyste zu dokumentieren.

5.2 Infektion von *in vitro* und *in vivo* produzierten porzinen Embryonen mit dem KSPV

An *in vitro* produzierten Embryonen konnte KSPV nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden ließ sich KSPV von *in vitro* produzierten Embryonen isolieren. Ein positiver KSPV-Nachweis erfolgte nur an fokalen Stellen des PK(15)A-Zellrasens. Nach 96- bzw. 120-stündiger Inkubation mit dem KSPV konnte das Virus bei keiner Gruppe von Embryonen mehr nachgewiesen werden. Dagegen

konnte bei vier Wiederholungen noch nach 96- bis 120-stündiger Inkubation im NCSU-23-Medium, in dem die Embryonen mit dem KSPV kokultiviert wurden, KSPV nachgewiesen werden.

Vergleichend wurde der KSPV-Nachweis an *in vivo* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida untersucht, mit positivem Ergebnis. Der KSPV-Nachweis der *in vivo* produzierten Embryonen war geringgradig, da nur an fokalen Stellen des PK(15)A-Zellrasens ein KSPV-Nachweis erfolgte.

Durch In-Vitro-Kultivierung von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen mit dem KSPV sollte ihre Empfänglichkeit gegenüber dem KSPV untersucht werden. Zur Entwicklungskontrolle und zur Ermöglichung einer Virusreplikation war eine Inkubationszeit von 96 bis 120 Stunden vorgesehen. An *in vitro* produzierten Embryonen konnte nach dieser Inkubationszeit kein KSPV nachgewiesen werden, weshalb die Inkubation der *in vitro* produzierten Embryonen mit dem KSPV auf 48 Stunden verkürzt wurde, um feststellen zu können, ob ein höherer KSPV-Titer im NCSU-23-Medium das Ergebnis des KSPV-Nachweises beeinflusst.

DULAC u. SINGH (1987) untersuchten Zona-pellucida-intakte *in vivo* produzierte Schweineembryonen auf ihre Empfänglichkeit mit dem KSPV. Bei 96,5 % der Embryonen konnten sie KSPV nachweisen. Allerdings waren die Inkubationszeiten von 1 oder 18 Stunden, die DULAC u. SINGH verwendeten, wesentlich kürzer als in den eigenen Untersuchungen (ca. 96 bis 120 Stunden). Sie stellten fest, daß die nachgewiesene Menge an Virus pro Embryo nur gering war. Wurden die Embryonen nach Virusexposition weiter kultiviert, so konnten sie kein KSPV nachweisen. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, daß eine Virusreplikation nicht stattfand.

Auch in *in vivo* produzierten Zona-pellucida-intakten bovinen Embryonen konnte keine Virusreplikation des BHV-1 nachgewiesen werden, wenn die Embryonen für eine Stunde dem Virus ausgesetzt waren und erst nach anschließender Kultivierung in unterschiedlichen Zeitintervallen auf Virusreplikation untersucht wurden (VANROOSE et al. 1997). Die Vermutung, daß Viren durch die Zona pellucida am Eindringen in den Embryo gehindert werden und eine Virusreplikation nicht erfolgt, wurde von SINGH et al. (1984) schon frühzeitig geäußert.

Aus der Tatsache, daß der KSPV-Nachweis in den eigenen Untersuchungen bei den *in vitro* produzierten Embryonen nur nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden nicht aber nach 96 oder 120 Stunden gelang, läßt sich schließen, daß eine Virusreplikation nicht erfolgte. Der KSPV-Nachweis an *in vitro* produzierten porzinen Embryonen ist demnach weitgehend von der Kultivierungszeit abhängig. Da nur einige Foci im PK(15)A-Zellrasen KSPV-positiv waren, kann davon ausgegangen werden, daß nur eine geringe Menge KSPV vorhanden war und daß eine Virusreplikation in Embryonalzellen nicht stattgefunden haben kann.

Auch bei *in vivo* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida wurde KSPV nachgewiesen. Es kann dabei ausgeschlossen werden, daß eine Replikation des KSPV in den *in vivo* produzierten Embryonen stattfand, denn aus dem NCSU-23-Medium, in dem die Embryonen mit dem KSPV kokultiviert wurden, konnte KSPV nach 96 oder 120 Stunden nur sporadisch nachgewiesen werden. Im Falle einer Replikation hätte der KSPV-Nachweis aus dem NCSU-23-Medium immer positiv und mittel- bis hochgradig sein müssen. Auch wenn keine Virusvermehrung intraembryonal erfolgte, so stellt sich die Frage, wie es dazu kam, daß sich dennoch Viren nach fünftägiger Kultur bei den *in vivo* produzierten Embryonen nachweisen ließen, denn der Vorversuch zeigte deutlich, daß das KSP-Virus nur bis einschließlich des vierten Kulturtages kulturell nachweisbar war.

Die Anheftung von Viren an der Zona pellucida wurde von mehreren Autoren bereits beschrieben (BOLIN et al. 1983; SINGH et. al. 1984; VANROOSE 1999). SINGH et al. (1984) vermuteten, daß das Afrikanische Schweinepestvirus außen an der Zona pellucida anheftet, denn bei Untersuchungen an Zona-pellucida-intakten porzinen Embryonen mit dem Virus waren nach Waschvorgängen mit Trypsin oder Pronase erheblich weniger Embryonen Virus-positiv. Im EM wurden porcine Parvoviren, das Virus der Aujeszky'schen Krankheit und porcine Enteroviren an bzw. in Poren der Zona pellucida gefunden (BOLIN et al. 1983).

Die Struktur der Zona pellucida begünstigte eine Anheftung von Viren, denn sie besitzt eine dynamische Struktur, die sich durch äußere Einflüsse verändert (WEGNER u. KILLIAN 1996). Die äußere Struktur der Zona pellucida erscheint im SEM netzartig, wobei sie von zahlreichen Poren durchsetzt ist (DUDKIEWICZ

u. WILLIAMS 1977). Sie entspricht nicht einer starren Hülle, sondern sie verändert ihre äußere Erscheinung während der Entwicklung des Embryos. Bei Rinderembryonen konnten zwei verschiedene Strukturmuster festgestellt werden: Die erste Struktur gleicht einem rauhen bzw. schwammartigen Netz mit zahlreichen Poren, das bei gereiften Oozyten und Morulae zu finden ist. Das zweite Muster, das Zygoten aufweisen, erscheint mehr kompakt, mit verschmolzenen Strukturen und wenigen Poren. Beide Strukturen finden sich zu gleichen Teilen bei den Acht-Zellstadien (VANROOSE 1999). SCHWARTZ et al. (1996) entdeckten die gleichen Strukturen bei humanen Oozyten. VANROOSE (1999) zeigte anhand von fluoreszierenden Mikroperlen, die einen Durchmesser von 40 nm entsprechend der Größe des BVDV hatten, daß diese die Zona pellucida von Zygoten nicht durchdringen konnten, sondern nur in der äußeren Schicht der Zona pellucida wiederzufinden waren. Etwa 96 % der in der Zona pellucida vorhandenen Poren waren groß genug, um dem BVDV ein Eindringen zu ermöglichen. Jedoch konnte keine Infektion der Embryonalzellen festgestellt werden, was vermutlich auf eine zentripetale Abnahme des Porendurchmessers zurückzuführen ist.

Daß es offenbar trotz fehlender Virusvermehrung zu einem Virusnachweis der *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen gekommen war, läßt sich nur dadurch erklären, daß das KSPV außen an der Zona pellucida anhaftet. Eine mechanische Anheftung des KSPV innerhalb von Poren der Zona pellucida wird durch ihr äußeres Erscheinungsbild begünstigt. Die Änderung des Erscheinungsbildes der Zona pellucida im Laufe der Entwicklung eines Embryos ist auch bei Schweineembryonen denkbar. Da diese Veränderung auch von äußeren Einflüssen abhängig sein kann (WEGNER u. KILLIAN 1996), könnte es einen Unterschied in der Struktur der Zona pellucida von *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen geben. Diese Strukturdifferenz würde auch das unterschiedliche Verhalten der beiden "Embryonenarten" gegenüber einer Infektion mit dem KSPV erklären. Ebenfalls denkbar ist es, daß durch den Wechsel von einer Struktur zur nächsten während der Embryonalentwicklung das Virus schlechtere Anheftungsmöglichkeiten bei den *in vitro* produzierten Embryonen findet und daher schneller in der Kultur abstirbt, als wenn es geschützt innerhalb von Poren liegt. In Zellen oder Gewebe gebundenes

oder darin "eingebettetes" Virus z.B. in Hauteffloreszenzen, Krusten, Fleisch etc. verhält sich gegenüber freien Viren deutlich stabiler (MAHNEL 1983, 1984). Dadurch ließe sich erklären, warum bei den *in vitro* produzierten Embryonen nach 48 Stunden der KSPV-Nachweis positiv und nach 96 Stunden negativ war. Bei den *in vivo* produzierten Embryonen scheint dagegen eine bessere Anheftung über 96 Stunden möglich zu sein. In Poren der Zona pellucida eingebettete Viren könnten demnach länger überleben und sind noch nach 96 Stunden nachweisbar. Bei Schweineembryonen ist die Struktur der Zona pellucida eines einzelnen Embryos sehr heterogen (TÖPFER-PETERSEN* 2000). Die Modifikation der Zona pellucida ist eine mögliche Erklärung für den Virusnachweis bei nur wenigen und nicht allen *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen. Es würde auch erklären, weshalb nur ein geringgradiger KSPV-Nachweis erfolgte.

5.3 Infektion von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen ohne Zona pellucida mit dem KSPV

Nachdem in den Versuchen mit den *in vitro* produzierten Embryonen nach 96 bis 120 Stunden kein KSPV-Nachweis erfolgte, wurde kontrolliert, ob die Blastomeren empfänglich für das KSPV sind.

Die Blastomeren von *in vitro* produzierten porzinen Embryonen, deren Zona pellucida enzymatisch entfernt wurde, waren mit dem KSPV infizierbar. Nach 72-stündiger Inkubation war der KSPV-Nachweis hochgradig.

BIELANSKI et al. (1987) demonstrierten an bovinen Embryonen, deren Zona pellucida auf verschiedene Weise eröffnet oder entfernt wurde, daß die Embryonalzellen für BHV-1 empfänglich waren. Diese Ergebnisse konnten von VANROOSE et al. (1997) bestätigt werden, allerdings mit der Einschränkung, daß die Infektiosität der Embryonalzellen nur in bestimmten Stadien möglich ist.

Ebenso waren bovine *in vitro* produzierte Embryonen, deren Zona pellucida in verschiedenen Stadien entfernt wurde, nur in bestimmten Stadien für das BVDV empfänglich (VANROOSE et al. 1997). Sie zeigten an *in vitro* produzierten Zona

* persönliche Mitteilung von E. Töpfer-Petersen 7/2000

pellucida-freien bovinen Oozyten und Embryonen, daß diese bis zum Zygotenstadium refraktär gegenüber einer Infektion mit dem zp und nzp BVDV waren. In späteren Zona pellucida-freien Embryonen fand abhängig vom Biotyp eine Replikation des BVD-Virus statt.

Aus den Ergebnissen der eigenen Versuche kann abgeleitet werden, daß in den Blastomeren von *in vitro* produzierten Embryonen eine Virus-Replikation stattfindet, da der KSPV-Nachweis erheblich stärker ausfiel als bei den Zona-pellucida-intakten Embryonen. Es wird also deutlich, daß eine intakte Zona pellucida ein Eindringen des KSPV in den Embryo verhindert und in Zona-pellucida-intakten Embryonen keine Replikation des KSP-Virus stattfindet. Die Infektion und Replikation in den embryonalen Zellen wurde allerdings nur für das Zwei- bis Vier-Zellstadium nachgewiesen. Es muß also davon ausgegangen werden, daß durch Mikromanipulationen an der Zona pellucida gesetzte Insulte bei porzinen *in vitro* produzierten Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium nach Virusexposition zu einer KSP-Infektion mit anschließender Replikation führen können.

5.4 Einfluß des KSPV auf die Entwicklung von *in vivo* und *in vitro* erstellten Embryonen

Eine Beeinträchtigung der Entwicklungsfähigkeit von *in vitro* produzierten Zona-pellucida-intakten Embryonen durch das KSPV konnte nicht festgestellt werden, denn die Blastozystenrate der Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von der Blastozystenrate der Infektionsgruppe. Morphologische Unterschiede zwischen der Kontroll- und Infektionsgruppe waren mikroskopisch nicht zu sehen. Die Entwicklungsfähigkeit der *in vivo* produzierten Embryonen wurde in den eigenen Versuchen in der Infektionsgruppe signifikant ($p \leq 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe beeinträchtigt. Deutlich wurde die Beeinträchtigung der Entwicklungsfähigkeit anhand der geringeren Blastozystenbildungsrate in der Infektionsgruppe ($68,2 \% \pm 19,9$) gegenüber der Kontrollgruppe ($81,9 \% \pm 9,7$). Eine morphologische Veränderung der Blastozysten in der infizierten Gruppe trat nicht auf.

Die Beurteilung der Entwicklung der infizierten Embryonen wurde durchgeführt, um eventuelle morphologische Veränderung der Embryonen, die durch das KSPV hervorgerufen wurden, erkennen zu können. Embryonen mit morphologischen Abweichungen kommen für den Embryotransfer nicht in Frage.

Zellkulturen, die mit Viren infiziert werden, beinhalten Proteine und Substanzen, die nur in infizierten Zellkulturen zu finden sind. Die infizierte Zelle ändert durch den Einfluß des Virus ihren Metabolismus. Die virale RNA des KSPV kodiert ein ca. 4000 Aminosäuren umfassendes Polyprotein. Durch Proteasen der Wirtszelle und des Virus wird das Polyprotein prozessiert. Es entstehen zunächst Vorläuferproteine, die in die viralen Proteine, sowohl Struktur- als auch Nichtstrukturproteine, gespalten werden (COLLETT et al. 1991; RÜMENAPF et al. 1993). Das *core*-Protein und die drei Glycoproteine E^{RNS}, E1 und E2 werden als Strukturproteine bezeichnet (COLLETT et al. 1991). Ihre Funktionen sind noch nicht vollständig geklärt. Das E^{rns} besitzt Ribonucleaseaktivität (WINDISCH et al. 1996). Es ist löslich und wird von den infizierten Zellen ins Medium abgegeben (RÜMENAPF et al. 1993), ferner ist es in der Lage, die Proteinsynthese von Lymphozyten zu inhibieren und Apoptose in Lymphozyten zu verursachen (BRUSCHKE et al. 1997). VANROOSE (1999) äußerte die Vermutung, daß Proteine und andere lösliche Substanzen von infizierten Zellen nach außen z.B. ins Medium abgegeben werden und die Entwicklung der Embryonen beeinflussen. Er untersuchte den Einfluß von BVDV und BHV-1 auf die Entwicklung von *in vitro* produzierten bovinen Embryonen und stellte fest, daß BHV-1 und BVDV die Entwicklung von Embryonen negativ beeinflussen. Die Zugabe von BHV-1 oder BVDV beeinträchtigte die Blastozystenrate signifikant. VANROOSE (1999) vermutete, daß der negative Einfluß von den kokultivierten somatischen Zellen bzw. durch eine pH-Wert-Änderung infolge ihrer metabolischen Produkte ausging, denn schon eine geringe pH-Wert-Verschiebung von ± 0.15 beeinträchtigt die Embryonenentwicklung (VAJTA et al. 1997).

Generell besteht ein deutlicher Unterschied im Entwicklungsverhalten von *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen (NIEMANN u. MEINECKE 1993; RATH 1997;

FREITAG 1998). HYTTEL et al. (2000) untersuchte die Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen anhand der Proteine, die vom Nukleolus prozessiert werden. Gegen Ende des dritten Zellzyklus und im vierten Zellzyklus konnte bei den *in vitro* produzierten Schweineembryonen nur Fibrillarin und Nucleolin nachgewiesen werden. UBF (Upstreaming Binding Factor) und Nucleophosmin waren nicht nachweisbar. RNA-Polymerase I trat erst am Ende des fünften Zellzyklus auf. Bei den *in vivo* produzierten Embryonen waren diese Proteine und Enzyme gleichzeitig im vierten Zellzyklus aktiv. Die Untersuchung von HYTTEL et al. (2000) zeigten deutlich, daß die Zellfunktionen der *in vitro* produzierten Embryonen eingeschränkt sind.

Die Entwicklung der Embryonen kann durch äußere Faktoren gestört werden. Dies wird durch die stark schwankenden Blastozystenraten der Infektions- und Kontrollgruppe der *in vivo* produzierten Embryonen in den einzelnen Versuchsdurchgängen deutlich. So kann die Herkunft der Embryonen eine bedeutende Rolle bezüglich ihrer Entwicklungsfähigkeit spielen. Die Embryonen verschiedener Sauen passen sich an die *In-Vitro*-Kultur unterschiedlich gut an (ARCHIBONG et al. 1989; KRISHER et al. 1989; PETTERS et al., 1990). Allerdings stammten die verwendeten Embryonen alle von Jungsaugen aus dem institutseigenen Bestand. Pro Versuchsdurchgang wurden zwar die Embryonen verschiedener Sauen verwendet, die Einteilung der Embryonen in Infektions- und Kontrollgruppe erfolgte aber randomisiert aus dem Gesamtembryonenpool eines Versuchstages. Ein Einfluß des Kulturmediums kann bei den eigenen Versuchen ausgeschlossen werden, da in der vorliegenden Arbeit bei allen Versuchsdurchgängen NCSU 23 verwendet wurde. Das verwendete Kulturmedium hat einen großen Einfluß auf die Entwicklungspotenz von Embryonen. TORRES-HELLMANN (1994) untersuchte den Einfluß von verschiedenen Kulturmedien auf die Entwicklung von Schweineembryonen. Die Blocküberwindungsrate und die Blastozystenbildungsrate war bei Verwendung von NCSU 23 signifikant höher als bei mWhitten's- und mKRB-Medium. Die NCSU-23-Stocklösung wurde am Versuchstag mit Taurin, Hypotaurin, Glutamin und bovine Serum Albumin (BSA) angereichert und anschließend für die Infektions- und

Kontrollgruppe benutzt. Insofern wurde ein einheitliches Kulturmedium für alle Embryonen pro Versuchstag verwendet.

Eine Beeinträchtigung der Entwicklung der *in vivo* produzierten Embryonen wurde eigentlich nicht erwartet, da sich das KSPV in Zellkulturen ohne zytopathogenen Effekt vermehrt (MAHNEL u. MAYR 1974) und schon Untersuchungen an *in vivo* produzierten Embryonen früher durchgeführt wurden, ohne daß eine Beeinträchtigung der Entwicklung der *in vivo* produzierten Embryonen durch das KSPV aufgetreten war (DULAC und SINGH 1988). Eine direkte Vergleichbarkeit der eigenen Untersuchung mit denen von DULAC und SINGH (1988) ist schwierig, da die Beurteilung der Entwicklung der Embryonen bei DULAC und SINGH erheblich früher (nach 18 oder 36 Stunden) als in den eigenen Versuchen (96-120 Stunden) erfolgte. Die Blastozystenbildungsrate wurde von DULAC und SINGH (1988) nicht beurteilt. Der negative Effekt auf die Entwicklung von *in vivo* produzierten Embryonen geht vermutlich nicht vom KSPV direkt aus, da das KSPV in Zellkulturen nicht zytopathogen ist (MAHNEL u. MEYR 1974) und eine intraembryonale Replikation des KSPV in den eigenen Untersuchungen vermutlich nicht erfolgte.

Eine direkte Übertragung von Versuchsergebnissen, die an *in vivo* produzierten Embryonen ermittelt wurden, auf *in vitro* produzierte Embryonen ist nicht möglich, da die beiden "Embryonenarten" sich nicht nur in ihrem Entwicklungsverhalten unterscheiden. Bei den *in vitro* produzierten Embryonen konnte ein negativer Effekt des KSPV auf die Entwicklung der Embryonen nicht beobachtet werden. Der Aktivitätszeitpunkt bestimmter Nucleolusstrukturen unterscheidet sich zwischen *in vitro* und *in vivo* produzierten Embryonen. Eine mögliche hypothetische Erklärung hierfür ist, daß bei den *in vitro* produzierten Embryonen bestimmte Proteine, die vom Nucleolus prozessiert werden, fehlen. Die Aktivität bestimmter Nucleolusstrukturen erfolgt bei den *in vitro* produzierten Embryonen nicht gleichzeitig im 4. Zellzyklus, wie das bei den *in vivo* produzierten Embryonen der Fall ist. Der einzige Unterschied zwischen der Infektions- und Kontrollgruppe bestand in der Zugabe von virusinfiziertem Zellkulturüberstand zur Infektionsgruppe und von virusfreiem Zellkulturüberstand zur Kontrollgruppe. Durch den Gefrier-Tau-Zyklus der

virusinfizierten PK(15)A-Zellkultur werden nicht nur Viren, sondern auch deren Proteine sowie die löslichen Komponenten des Zellzytoplasmas freigesetzt. Die Zugabe von virushaltigem Zellkulturüberstand zu dem Kultivierungsmedium NCSU 23 beinhaltet ebenfalls die Zugabe von Substanzen, deren Auswirkungen auf die Entwicklung des Embryos nicht absehbar sind. Ob ein Einfluß von den Proteinen oder anderen Substanzen des KSPV-haltigen Zellkulturüberstandes auf die Embryonalentwicklung ausgeht, kann nur vermutet werden. Die unterschiedlich starken Nucleolusaktivitäten von *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen könnten die Differenz des Einflusses der Fremdproteine und -substanzen auf die Entwicklung der *in vivo* produzierten Embryonen erklären. Vermutlich können die *in vitro* produzierten Embryonen nicht mit den Substanzen oder Proteinen des virusinfizierten Zellkulturüberstandes interagieren.

Da weder bei den *in vitro* noch bei den *in vivo* produzierten Embryonen sichtbare morphologische Veränderungen aufgetreten waren, ist es nicht möglich, KSPV-kontaminierte Schweineembryonen mikroskopisch zu differenzieren und für den Embryotransfer auszuschließen. Daher besteht eine potentielle Gefahr, die KSP durch den Embryotransfer zu verschleppen.

5.5 Schlußfolgerungen

1. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, daß sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* produzierten porzinen Embryonen das KSPV nachgewiesen werden kann.
2. Die Inkubationszeit spielt eine wesentliche Rolle bei der Infektion der *in vitro* produzierten Embryonen. Bei den *in vitro* produzierten Embryonen ließ sich nur nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden KSPV in geringer Menge nachweisen. Nach 96 Stunden blieb der KSPV-Nachweis negativ. Eine Replikation des KSPV findet daher in *in vitro* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida höchstwahrscheinlich nicht statt. Das Virus heftet sich lediglich an die Zona pellucida an.
3. Embryonalzellen von *in vitro* produzierten Embryonen, deren Zona pellucida entfernt wurde, lassen sich mit dem KSPV infizieren und ermöglichen eine Virusreplikation. Die Zona pellucida schützt die Embryonalzellen zwar vor einer Infektion mit dem KSPV, verhindert aber nicht die "äußere" Kontamination des Embryos.
4. Eine beschädigte Zona pellucida z.B. durch Mikromanipulation verliert ihre Schutzfunktion gegenüber dem KSPV und sein Eindringen in die Embryonalzellen ermöglichen. Untersuchungen liegen dazu bislang noch nicht vor. Blastozysten sind gefährdet, da das KSPV während und nach dem Schlupf aus der Zona pellucida mit Embryonalzellen in Kontakt kommt. Ob geschlüpfte Blastozysten für das KSPV empfänglich sind, wurde in dieser Arbeit aber nicht untersucht.
5. An *in vivo* produzierten Embryonen läßt sich KSPV nachweisen, eine Virusreplikation des Virus erfolgt nicht. Die äußere Strukturbeschaffenheit der Zona pellucida ermöglicht dem KSPV eine bessere Adhäsion als bei *in vitro* produzierten Embryonen. Genauere Untersuchungen der Struktur der

Zona pellucida von *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen sind zur Zeit nicht verfügbar. Sie könnten Aufschluß über die unterschiedliche Empfänglichkeit der *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen geben.

6. Die Entwicklungsfähigkeit von *in vivo* produzierten Embryonen wird im Gegensatz zu *in vitro* produzierten Embryonen direkt oder indirekt durch das KSPV beeinträchtigt. Der Einfluß des KSPV wird nur anhand der geringeren Blastozystenrate erkannt, eine morphologische Veränderung der Embryonen ist mikroskopisch nicht erkennbar. Infizierte Embryonen sind von nicht-infizierten nicht zu unterscheiden. Die *in vitro* produzierten Embryonen zeigen keinerlei Veränderungen in der Blastozystenrate gegenüber den Kontrollgruppen. Vermutlich sind Proteine oder andere Substanzen des KSPV-infizierten Zellkulturüberstandes für eine Entwicklungsbeeinträchtigung verantwortlich. Der Einfluß von viralen Proteinen auf die Embryonalentwicklung sollte in weiteren Versuchen anhand ihrer Expression in den Blastomeren untersucht werden.
7. Das Überleben des KSPV in der Kultur in Anwesenheit von *in vivo* produzierten Embryonen über einen Zeitraum von 96 Stunden vergrößert die Gefahr, daß das Virus durch Embryotransfer über größere Distanzen hinweg in KSP-freie Länder übertragen und verbreitet werden kann.
8. Die Übertragungsgefahr des KSPV ist bei den *in vitro* produzierten Embryonen geringer einzuschätzen als bei den *in vivo* produzierten.
9. Da es sich bei den eigenen Versuchen um In-Vitro-Untersuchungen handelt, kann letztendlich nur ein Embryotransfer mit KSPV kokultivierten Embryonen Aufschluß darüber geben, ob eine Übertragung stattfindet und ob die Gefahr bei den *in vitro* produzierten Embryonen vermindert ist.

6 Zusammenfassung

Als Übertragungswege der KSP gelten die Verfütterung von Speiseabfällen, der direkte und indirekte Kontakt zu infizierten Tieren, die transplazentare Übertragung und die genitale Übertragung durch Sperma als gesichert. Untersuchungen zur Übertragung der KSP liegen nur vereinzelt für *in vivo* produzierte Embryonen vor, die Übertragung durch *in vitro* erstellte Embryonen wurde bisher nicht untersucht.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit *in vivo* und *in vitro* produzierte Embryonen bezüglich ihrer Empfänglichkeit für das KSPV miteinander verglichen.

Die *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen wurden mit KSPV-haltigem Zellkulturüberstand über einen Zeitraum von 48 bis zu 120 Stunden inkubiert. Der KSPV-Nachweis erfolgte nach Waschvorgängen und Umsetzen der Embryonen auf KSPV-empfindlichen PK(15)A-Zellen durch die direkte Immunfärbung. Gleichzeitig wurde der Einfluß des KSPV auf die Entwicklung der Embryonen anhand der Bildung der Blastozysten bestimmt. Als Kontrolle dienten Embryonen, die mit KSPV-freiem Zellkulturüberstand inkubiert wurden.

Zur Überprüfung der Empfänglichkeit der Blastomeren der *in vitro* erstellten Embryonen wurde die Zona pellucida enzymatisch abgelöst und die Embryonen mit KSPV-haltigem Zellkulturüberstand kokultiviert.

- Eine Inkubationszeit von 48 Stunden mit KSPV-haltigem Zellkulturüberstand führte bei den *in vitro* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida zum positiven KSPV-Nachweis. Es wurde nur geringgradig KSPV nachgewiesen. Nach 96-stündiger Inkubation mit KSPV-haltigem Zellkulturüberstand konnte von den *in vitro* produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida kein KSPV nachgewiesen werden. Eine Vermehrung des KSPV fand nicht statt.
- Die Embryonalzellen der *in vitro* produzierten Embryonen ließen sich nach enzymatischer Ablösung der Zona pellucida mit KSPV infizieren. Eine unversehrte Zona pellucida schützt die Embryonalzellen vor einer Infektion mit

dem KSPV, verhindert aber nicht eine mechanische Anheftung des KSPV an die Zona pellucida. Untersuchungen zu strukturellen Unterschieden zwischen *in vivo* und *in vitro* produzierten Embryonen sind nötig, um ihre unterschiedliche Infektionsbereitschaft zu klären.

- Die Entwicklung der *in vitro* produzierten Embryonen wurde durch das KSPV nicht signifikant beeinträchtigt. Die Blastozystenrate der KSPV-infizierten Gruppe (19,1%) wich kaum von der Blastozystenrate der Kontrollgruppe (18,9%) ab.
- Aus den infizierten *in vivo* produzierten Embryonen entwickelten sich signifikant weniger Blastozysten als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das KSPV hat vermutlich indirekt einen negativen Einfluß auf die Entwicklung der *in vivo* produzierten Embryonen. Inwieweit Proteine aus dem KSPV-haltigem Zellkulturüberstand dafür verantwortlich sind, bleibt ungeklärt.
- Bei den *in vitro* produzierten Embryonen ist die Übertragungsgefahr der KSP durch Embryotransfer geringer einzuschätzen als bei den *in vivo* produzierten Embryonen.

7 Summary

Ellen Schüürmann

Transmission of Classical Swine Fever Virus (CSFV) by *in vivo* and *in vitro* produced porcine embryos

The transmission of Classical Swine Fever (CSF) has up to now been proved for swill feeding, indirect and direct contact with infected animals, transplacental and genital transmission by semen.

Investigations of the transmission of CSF are only sporadically available for *in vivo* produced porcine embryos. The transmission by *in vitro* produced porcine embryos has up to now not been investigated.

In the present study the transmission of CSF by porcine embryos was investigated and the susceptibility of *in vivo* and *in vitro* produced embryos was compared.

In vivo and *in vitro* produced embryos were cocultured for 48 up to 120 hours with supernatant of CSFV containing medium. The embryos were placed after washing procedures in wells of a 24-well plate with CSFV-susceptible PK(15)A-cells and assayed for the presence of CSFV by direct immunostaining.

The effect of CSFV on the embryonic development was investigated simultaneously by determination of blastocyst rates. The control embryos were cultured under the same conditions with CSFV-free supernatant. The susceptibility of embryonic cells of *in vitro* produced embryos after enzymatical removal of the zona pellucida was investigated, too.

- CSFV was isolated from Zona pellucida-intact *in vitro* produced embryos after an incubation period of 48 hours with supernatant containing CSFV. The amount of isolated CSFV was small. After an coincubation period of 96 hours with

supernatant containing CSFV, no virus was isolated from zona pellucida-intact *in vitro* produced embryos. Virus replikation had presumably not occurred.

- Embryonic cells of zona pellucida-free *in vitro* produced porcine embryos were susceptible for CSFV. An intact zona pellucida protects the blastomeres from an infection with CSFV but doesn't prevent the mechanical adhesion of CSFV at the zona pellucida. Investigations of the different structures of *in vivo* and *in vitro* produced embryos are necessary to explain the difference of virus susceptibility.
- After virus exposure the development of *in vitro* produced porcine embryos was not significantly affected. No difference was found in the *in vitro* development of embryos exposed to CSFV (19,1 %) compared with nonexposed control embryos (18,9 %).
- However significantly lower blastocyst rates of *in vivo* produced embryos were observed as compared to control embryos. CSFV has presumably an inhibitory indirect effect on the development of *in vivo* produced embryos. Whether proteins from the supernatant containing CSFV are the reason for the inhibition has to be clarified.
- The risk to transmit CSF by embryotransfer is lower for *in vitro* produced embryos than for *in vivo* produced embryos.

8 Samenvatting

Ellen Schüürmann

De mate van overdraagbaarheid van het virus van de Klassieke Varkenspest (KVPV) door *in-vivo*- en *in-vitro*-geproduceerde varkensembryo's

Voor manieren om Klassieke Varkenspest (KVP) over te dragen gold tot nu toe het voeren van etensresten, het direkte en indirecte contact met besmette dieren, het overdragen van het virus via de placenta op de foetus en de genitale overdracht via sperma als bewezen.

Onderzoeken naar de overdracht van KVP door *in-vivo*-geproduceerde embryoes komen sporadisch voor. De overdracht door *in-vitro*-geproduceerde embryoes wordt tot nu toe niet onderzocht.

De doelstelling van dit onderzoek was de overdraagbaarheid van KVP door varkensembryoes. Er werden *in-vivo*- en *in-vitro*-geproduceerde varkensembryoes met elkaar vergeleken op hun gevoeligheid voor het KVPV.

De *in-vivo*- en *in-vitro*-geproduceerde embryoes werden met KVPV bevattende supernatant in een periode van 48 tot maximaal 120 uur geïncubeerd.

Het aantonen van het KVPV kwam tot stand na de wasprocedures en omzetten van de embryoes op KVPV-gevoelige PK(15)A-cellen door de direkte immunokleuring. Gelijktijdig werd de invloed van het KVPV op de embryonale ontwikkeling aan de hand van het ontstaan van blastocysten bepaald. Ter controle dienden embryoes die met KVPV-vrije supernatant geïncubeerd werden. Tevens werd de gevoeligheid van de embryonale cellen van *in-vitro*-geproduceerde embryoes na verwijdering van de zona pellucida door enzymen onderzocht.

- Na een incubatietijd van 48 uur met KVPV bevattende supernatant werd bij de *in-vitro*-geproduceerde embryoes met een intacte zona pellucida KVPV aangetoond. KVPV kon in dit geval maar in geringe mate aangetoond worden. Na een

incubatietijd van 96 uur met het KVPV bevattende supernatant kon bij de *in-vitro*-geproduceerde embryo's met een intacte zona pellucida geen KVPV aangetoond worden. Een KVPV-vermeerdering heeft niet plaats gevonden.

- De embryonale cellen van de *in-vitro*-geproduceerde varkensembryo's werden na verwijdering van de zona pellucida door enzymen met KVPV besmet. Een intacte zona pellucida beschermt de embryonale cellen tegen een infectie met het KVPV. Het voorkomt echter geen mechanische aanhechting van het KVPV aan de zona pellucida. Onderzoek naar het verschil in de structuur tussen *in-vivo*- en *in-vitro*-geproduceerde embryo's blijven nodig om de verschillende infectiegevoeligheid te kunnen verklaren.
- De ontwikkeling van de *in-vitro*-geproduceerde embryo's werd door het KVPV niet significant negatief beïnvloed. Het ontwikkelingspercentage van de KVPV-besmette groep (19,1 %) vertoonde bijna geen afwijking met het ontwikkelingspercentage van de controlegroep (18,9 %).
- Uit de besmette *in-vivo*-geproduceerde embryo's ontstonden significant minder blastocysten in vergelijking tot de controlegroep. Het KVPV heeft vermoedelijk indirect een negatieve invloed op de ontwikkeling van *in-vivo*-geproduceerde embryo's. In hoe verre proteïnen uit de KVPV bevattende supernatant hiervoor verantwoordelijk zijn blijft onopgelost.
- Het risico KVP door embryotransfer te overdragen is voor *in-vitro*-geproduceerde embryo's minder dan voor *in-vivo*-geproduceerde embryo's.

9 Literaturverzeichnis

ANONYMUS (1980):

EU Council Directive 80/217/EEC of 22 January 1980 introducing 'Community measures for the control of Classical Swine fever'. Last amended June 14, 1993

ANONYMUS (1998a):

Manual of the International Embryotransfer Society.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

S. 102

ANONYMUS (1998b):

EU-Commission

Report of: The annual meeting of national swine fever laboratories.

Brüssel VI/8857/98, S.47-48

AHL, A. (1994):

Zur Schweinepestsituation in den Jahren 1992 und 1993.

Dtsch. Tierärztebl. 42, 314-316

ARCHIBONG, A.E., R.M. PETTER u. B.H. JOHNSON (1989):

Development of porcine embryos from one- and two -cell stages to blastocysts in culture medium supplemented with porcine oviductal fluid.

Biol. Reprod. 41, 1076-1083

AUSTIN, C.R., (1961):

Membranes and investments.

in: The Mammalian Egg.

Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford

S. 86ff

BANE, D.P., J.B. JAMES, C.M. GRADIL u. I.W. Mollton (1989):

In vitro exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus.

Theriogenology 33, Nr.2, 553-561

BAVISTER, B.D. (1988):

Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro.

Theriogenology 29, 143-154

BAVISTER, B.D. (1995):

Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts.

Hum. Reprod. (updates) 1, 91-148

BIELANSKI, A., M.R. del CAMPO, M.A. SIRARD u. S. WILLADSEN (1993a):

Isolation of Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in association with the in vitro production of bovine embryos.

Theriogenology 40, 531-538

BIELANSKI, A. u. C.DUBUC (1993b):

In vitro fertilization of bovine oocytes exposed to Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1).

Reprod. Domest. Anim. 28, 285-288

BIELANSKI, A., u. C. DUBUC (1994):

In vitro fertilization and culture of ova from heifers infected with Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1).

Theriogenology 41, 1211-1217

BIELANSKI, A., u. L. JORDAN (1996):

Washing or washing and trypsin treatment is ineffective for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental viral contamination of an in vitro fertilization system.

Theriogenology 46, 1467-1476

BIELANSKI, A., u. K. LOEWEN (1994):

In vitro fertilization of bovine oocytes with semen from bulls persistently infected with Bovine Viral Diarrhea Virus.

Anim. Reprod. Sci. 35, 183-189

BIELANSKI, A., C. LUTZE-WALLACE, T. SAPP u. L. JORDAN (1997):

The efficacy of trypsin for disinfection of in vitro fertilized bovine embryos exposed to bovine herpesvirus1.

Anim. Reprod. Sci. 47, 1-8

BIELANSKI, A., T. SAPP u. C. LUTZE-WALLACE (1998):

Association of bovine embryos produced by in vitro fertilization with a noncytopathic strain of Bovine Viral Diarrhia Virus Type II.

Theriogenology 49, 1231-1235

BIELANSKI; A., E.L. SINGH u. W.C.D. HARE (1987):

The in vitro exposure to Bovine Rhinotracheitis Virus of zona pellucida-micromanipulated bovine embryos with the zona pellucida damaged or removed.

Theriogenology 28, Nr. 4, 495-502

BLEIL, J.D. u. P.M. WASSARMAN (1980):

Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocytes's zona pellucida.

Dev. Biol. 76, 185-201

BOLIN, S.R., L.J. RUNNELS; C.A. SAWYER, K.J. ATCHESON u. D.P. GUSTAFSON (1981).

Resistance of porcine preimplantation embryos to Pseudorabies Virus.

Am. J. Vet. Res. 42, Nr. 10, 1711-1712

BOLIN, S.R., J.J. TUREK, L.J. RUNNELS u. D.P. GUSTAFSON (1983):

Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pellucida of the porcine embryo.

Am. J. Vet. Res. 44, Nr. 6, 1036-1039

BRUGH, M., J. W. FOSTER u. F.A. HAYES (1964):

Studies on the comparative susceptibility of wild european and domestic swine to hog cholera.

Am. J. Vet. Res. 25, 1124-1127

BRUSCHKE, C.J.M., M.M. HULST, R.J.M. MOORMANN, P.A. VAN RIJN u. J.T. VAN OIRSCHOT (1997):

Glycoprotein^{rns} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species.

J. Virology 71, 6692-6696

COLLETT, M.S., M.A. WISKERCHEN, E. WELNIAK u. S.K. BELZER (1991):

Bovine Viral Diarrhea Virus genomic organization.

Arch. Virol. Suppl. 3, 19-27

DAHLE, J. u. B. LIESS (1995):

Comparative study with cloned classical swine fever virus strains ALFORT and GLENTORF: clinical, pathological, virological and serological findings in weaner pigs.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 82, 232-238

DAHLE, J., B. LIESS u. H.-R. FREY (1987):

Übertragung von Pestiviren zwischen Tierarten: Experimentelle Infektion von Schweinen mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD) und von Rindern mit dem Virus der Europäischen Schweinepest (ESP).

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 590-594

DEPNER, K., T. BAUER u. B. LIESS (1992):

Thermal and pH- stability of pestiviruses.

Rev. Sci. Tech. off. int. Epiz. 11, 885-893

DEPNER, K., A. GRUBER u. B. LIESS (1994):

Experimental infection of weaner pig with a field isolate of Hog Cholera/ Classical Swine Fever Virus derived from a recent outbreak in Lower Saxony. I. Clinical, virological and serological findings.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 81, 370-373

DEPNER, K.R., U. HINRICHS, K. BICKHARDT, I. GREISER-WILKE, J. POHLENZ, V. MOENNIG u. B. LIESS (1997a):

Influence of breed-related factors on the course of classical swine fever virus infection.

Vet. Rec. 140, 506-507

DEPNER, K.R., V. MOENNIG u. B. LIESS (1997b):

Epidemiologische Aspekte der Infektionsbiologie der Klassischen Schweinepest.

Prakt. Tierarzt, coll.vet XXVII, 63-67

DEPNER, K.R., A. MÜLLER, A. GRUBER, A. RODRIGUEZ, K. BICKHARDT u. B. LIESS (1995):
Classical swine fever in wild boar (*sus scrofa*) - experimental infections and viral persistence.
Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift 102, 379- 384

DEPNER, K.R., A. RODRIGUEZ, J. POHLENZ u. B. LIESS (1996):
Persistent classical swine fever virus infection in pigs infected after weaning with a viurs isolated during
the 1995 epidemic in Germany: clinical, virological, serological and pathological findings.
European Journal of Veterinary Pathology 2, Nr. 2, 61-66

DE SMIT, A.J., A. BOUMA, C. TERPSTRA u. J.T. OIRSCHOT (1999):
Transmission of classical swine fever virus by artificial insemination.
Vet. Microbiol. 67, 239-249

DIETL, J. (1986):
Struktur und Funktion der Zona pellucida.
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart

DINTER, Z. (1963):
Relationship between Bovine Virus Diarrhoea Virus and Hog Cholera Virus.
Zbl. Bakt. Abt.1 188, 475-486

DUDKIEWICZ, A.B. u. W.L. WILLIAMS (1977):
Fine structural observations of the mammalian zona pellucida by scanning electron microscopy.
Scanning Electron Microscopy 2, 317-324

DULAC, G.C., u. E.L. SINGH (1988):
Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XII. The in vitro exposure
of zona pellucida-intact porcine embryos to hog cholera virus.
Theriogenology 29, Nr. 6, 1335-1341

DUNBAR, B.S., u. B.D. RAYNOR (1980):
Characterization of porcine zona pellucida antigens.
Biol. Reprod. 22, 941-954

DUNBAR, B.S., S.V. PRASAD u.T.M. TIMMONS (1991):

Comparative structure and function of mammalian zona pellucidae.

in: Dunbar, B.S. u. M.G. O'Rand (Hrsg.): A comparative overview of mammalian fertilization.

Plenum Press

New York u. London

S. 97-114

DUNNE, H.W., J.F. HOKANSON u. A.J. LUEDKE (1959a):

The pathogenesis of Hog Cholera. I. route of entrance of the virus into the animal body.II.The virus eclipse phase and sensitization of the host.

Am. J. Vet. Res. 20, 615-624

EDWARDS, S., A. FUKUSHO, P.-C. LEFÈVRE, A. LIPOWSKI, Z. PEJSAK, P. ROEHE u. J WESTERGAARD (2000):

Classical Swine Fever: the global situation.

Vet. Microbiol. 73, 103-119

ENZMANN, P.-J., u. F. WEILAND; (1978):

Structural similarities of Hog Cholera Virus with Togaviruses.

Arch. Virol. 57, 339-348

EPIFANO, O., u. DEAN, J. (1994):

Biology and structure of the zona pellucida: a target for immunocontraception.

Reprod. Fertil. Dev. 6, 319-330

FAMILIARI, G., S.A. NOTTOLA, G. MACCHIARELLI, A. FAMILIARI u. P.M. MOTTA (1992):

A technique for exposure of the glycoprotein matrix (zona pellucida and mucus) for scanning electron microscopy.

Microscopy Research And Technique 23, 225-229

FAO-OIE-WHO (1997):

Animal Health Yearbook 1995.

FAO Animal Production and Health Series 36, Rom

FLÖGEL, G., A. WEHREND, K.R. DEPNER, J. FRITZEMEIER, D. WABERSKI u. V. MOENNIG (2000):

Detection of Classical Swine Fever Virus in semen of infected boars.
Vet. Microbiol. 1971, 1-8

FREITAG, K. (1998):

Permanente Beobachtung von Entwicklungsvorgängen bei *in vivo* und *in vitro* erstellten Schweineembryonen mit dem „Mariensee Computerized Time-Lapse-System“ (MCTLS).
Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

FREY, H.-R., B. LIESS, H.B. RICHTER-REICHHELM, K. von BENTEN u. G. TRAUTWEIN (1980):

Experimental transplacental transmission of Hog Cholera Virus in pigs.
I. Virological and serological studies.
Zbl. Vet. Med. B 27, 154-164

FRITZEMEIER, J., J. TEUFFERT, GREISER-WILKE, I., CH. STAUBACH, H. SCHLUETER u. V. MOENNIG (2000):

Epidemiology of Classical Swine Fever in Germany in the 1990s.
Vet. Microbiol. 1965, 1-13

FUNAHASHI, H., u. B.N. DAY (1997):

Advances in *in vitro* production of porcine embryos.
J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 52, 271-283

GUERIN, B., M. NIBART, B. MARQUANT-LE GUIENNE u. P. HUMBLLOT (1997):

Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species.
Theriogenology 47, 33-42

HARRIS, J.D., D.W. HIBLER, G.K. FONTENOT, K.T. HSU, E.C. YUREWICZ u. A.G. SACCO (1994):

Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: The ZPA, ZPB and ZPC gene families.
DNA sequence - The Journal of Sequencing and Mapping 4, 361-393

HEDRICK, J.L., u. N.J. WARDRIP (1980):

The macromolecular composition of the porcine zona pellucida.
Fed. Proc. 39, 2081

HEDRICK, J.L., u. N.J. WARDRIP (1986):

Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes.

Anal. Biochem. 157, 63-70

HEDRICK, J.L., u. N.J. WARDRIP (1987):

On the macromolecular composition of the zona pellucida from pig oocytes.

Dev. Biol. 121, 478-488

HELWIG, D.M., u. J.C. KEAST (1966):

Viability of virulent Swine Fever Virus in cooked and uncooked ham and sausage casings.

Aust. Vet. J. 42, 131-135

HERMANN, W., G. TRAUTWEIN, H. MAYER u. B. LIESS (1981):

Experimental transplacental transmission of Hog Cholera Virus in pigs. V. Immunopathological findings in newborn pigs.

Zentralbl. Veterinärmed. B. 28, 669-683

HORZINEK, M. (1967):

Characterization of Hog Cholera Virus. II. Determination of sedimentation coefficient.

Arch. Gesamte Virusforsch. 21, 447-453

HORZINEK, M. (1991):

Pestivirus-taxonomic perspectives.

in: Liess, B., V. Moennig, J. Pohlenz u. G. Trautwein (Eds.): Ruminant Pestivirus Infections, S. 1-5.

HUCK, R.A., u. F.W. ASTON (1964):

The „carrier“ sow in swine fever.

Vet. Rec. 76, 1151-1154

HUNTER, R.H.F. (1974):

Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus Scrofa*.

Anat. Rec. 178, 169-186

HUNTER, R.H.F. (1991):

Fertilization in the pig and horse.

in: A comparative overview of mammalian fertilization.

B.S. Dunbar und. M.G. O'Rand (Ed.)

Plenum Press, New York u. London

S.329-350

HYTTEL, P., u. H. NIEMANN (1990):

Ultrastructure of porcine embryos following development in vitro versus in vivo.

Mol. Reprod. Dev. 27, 136-144

HYTTEL, P., J. LAURINCIK, D. VIUFF, T. FAIR, V. ZAKHARTCHENKO, C. ROSENDRANZ, B. AVERY, D. RATH, H. NIEMANN, P.D. THOMSEN, K. SCHELLANDER, H. CALLESEN, E. WOLF, R.L. OCHS u. T. GREVE (2000):

Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos.

Anim. Reprod. Sci. 60-61, 49-60

KADEN, V., P. HUEBERT, G. STREBLOW, E. LANGE, H. STEYER u. P. STEINHAGEN (1999):

Vergleich labordiagnostischer Methoden zum Nachweis einer Infektion mit dem Virus der Klassischen Schweinepest (KSPV) in der frühen Infektionsphase: experimentelle Studie.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 112, 52-57

KADEN, V., A. KOSMIDOU, M. KRAMER, V. MOENNIG, H.-J. THIEL, E. WEILAND u. R. AHL (1994):

Die Schweinepest in Deutschland in den Jahren 1992 und 1993.

Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 9, 25-28

KÄRBER, G. (1931):

Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch. Esp. Path. Pharm. 162, 480-483

KRASSNIG, R., u. W. SCHULLER (1993):

Schweinepest in Österreich.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 80, 229-233

KRASSNIG, R., W. SCHULLER, J. HEINRICH, F. WERFING, P. KALOUS u. M. FRÜHWIRTH (1995):
Isolierung des Erregers der Europäischen Schweinepest (ESP) aus importiertem gefrorenem
Wildschweinefleisch.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift 102, S. 56

KUBIN, G. (1967):

In vitro Merkmale des Schweinepestvirus.

Zentralbl. Veterinärmed. B. 14, 543-552

LADDOMADA, A., C. PATTA, A. OGGIANO, A. CACCIA, A. RUIU, P. COSSU u. A. FIRINU (1994):
Epidemiology of Classical Swine Fever in Sardinia: a serological survey of wild boar and comparison
with African Swine Fever.

Vet. Rec. 134, 183-187

LAEVENS, H., F. KOENEN, H. DELUYKER u. A. DE KRUIF (1999):

Experimental infection of slaughterpigs with Classical Swine Fever Virus: transmission of the virus,
course of the disease and antibody response.

Vet. Rec. 145, 243-248

LAURINCIK, J., D. RATH u. H. NIEMANN (1994):

Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig
oocytes matured in vivo and in vitro.

J. Reprod. Fertil. 102, 277-284

LIEBERMANN, H. (1992):

Pestivirusinfektionen.

In: H. LIEBERMANN (Hrsg.): Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie.

Verlag Fischer, Jena-Stuttgart,

S. 69-76

LISS, B. (1987):

Pathogenesis and epidemiology of Hog Cholera.

Ann. Rech. Vét. 18, 139-145

LIESS, B. (1997):

Europäische Schweinepest

in: B. LIESS (Hrsg.): Virusinfektionen einheimischer Haussäugetiere.

Verlag Enke, Stuttgart

S. 78-80

MAHNEL, H. u. A. MAYR (1974):

Schweinepest.

Verlag Enke, Stuttgart

MAHNEL, H. (1983):

Desinfektion von Viren.

Zentralbl. Veterinärmed. B 30, 81-96

MAHNEL, H. (1984):

Virusdesinfektion in Labor und tierärztlicher Praxis.

Tierärztl. Praxis 12, 117-130

MAPLETOFT, R., u. J. STOOKEY (1998):

General sanitary procedures and welfare considerations associated with in-vivo production of embryos.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

Kap. 4, S. 55-66

MATSCHULLAT, G., J. DAHLE, B. RÖDER, V. MOENNIG u. B. LIESS (1994):

Feldinfektion mit BVD-Virus beim Schwein: Epidemiologie und Diagnostik.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 101, 22-26

MEDVECZKY, I., u. I. SZABÓ (1981):

Isolation of Aujeszky's Disease Virus from boar semen.

Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 29, Nr. 1, 29-35

MENGELING, W.L., u. L. DRAKE (1969):

Replication of Hog Cholera Virus in cell culture.

Am. J. Vet. Res. 30, Nr. 10, 1817-1823

MENGELING, W.L., u. R.A. PACKER (1969):

Pathogenesis of chronic Hog Cholera: Host response.

Am. J. Vet. Res. 30 Nr. 3, 409-417

MEYER, H. (1978):

Experimentelle diaplazentare Infektion von Schweinefetten mit dem Virus der Europäischen Schweinepest-Virologische und serologische Untersuchung.

Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

MEYER, H., B. LIESS u. H.-R. FREY (1981):

Experimental transplacental transmission of Hog Cholera Virus in pigs.

IV. Virological and serological studies in newborn piglets.

Zentralbl. Veterinärmed. B 28, 659-668

MOENNIG, V. (1994):

Schweinepest - Verlaufsform und Diagnostik.

Prakt. Tierarzt 75, 76-78

MÜLLER, A. (1998):

Auftreten und Bekämpfungskosten der Klassischen Schweinepest in Niedersachsen in den Jahren 1993-1995, dargestellt anhand der Unterlagen der Tierseuchenkasse.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

NIEBART, M., B. MARQUANT-LE GUIENNE u. P. HUMBLLOT (1998):

General sanitary procedures associated with in-vitro production of embryos.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

Kap. 5, S. 67-78

NIEMANN, H. (1987):

Embryotransfer und assoziierte Biotechniken beim Schwein.

Tierärztl. Umschau 42, 946-956

NIEMANN, H. (1989):

Biotechnologische Studien an präimplantatorischen Embryonen von Rind und Schwein.

Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart

NIEMANN, H., M.J. ILLERA u. P.J. DZIUK (1983):

Developmental capacity, size and number of nuclei in pig embryos cultured in vitro.

Anim. Reprod. Sci. 5, 311-321

NIEMANN, H., u. B. MEINECKE, (1993):

Embryotransfer und assoziierte Biotechniken bei landwirtschaftlichen Nutztieren.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

PAPAIOANNOU, V.E., u. K.M. EBERT (1986):

Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice.

J. Reprod. Fertil. 76, 603-608

PARRISH, J.J., u. N.L. FIRST (1993):

Fertilization

in: G.J. King (Hrsg.): Reproduction in domesticated animals.

Elsevier Science Publishers B.V.,

New York, S. 195-227

PEHL, K.-H., u. W. SCHULZE (1958):

Der Virusgehalt blutfreier Organe bei der Schweinepest.

Arch. Exp. Vet. Med. 12, 861-869

PETTERS, R.M. , B.H. JOHNSON, M.L. REED u. A.E. ARCHIBONG (1990):

Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro.

J. Reprod. Fertil. 89, 269-275

PETTERS, R.M., u. K.D. WELLS (1993):

Culture of pig embryos.

J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 48, 61-73

PHILIPPS, R.M., C.W. FOLEY u. P.D. LUKERT (1972):

Isolation and characterization of viruses from semen and the reproductive tract of male swine.

Am. J. Vet. Med. Assoc. 161, 1306-1316

RATH, D. (1997):

Experimentelle Untersuchungen zur in-Vitro-Erzeugung präimplantatorischer Schweineembryonen.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Habil.-Schr.

RATH, D., C.R. LONG, J.R. DOBRINSKY, G.R. WELCH, L.L. SCHREIER u. L.A. JOHNSON (1999):

In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce piglets after embryo transfer

J. Anim. Sci. 77, Nr. 12, 3346-3352

RATH, D., H. NIEMANN u. C.L. TORRES (1995):

In vitro development to blastocysts of early porcine embryos produced in vivo and in vitro.

Theriogenology 43, 913-926

RESSANG, A.A. (1973a):

Studies on the pathogenesis of Hog Cholera. I. Demonstration of Hog Cholera Virus subsequent to oral exposure.

Zentralbl. Veterinärmed. B 20, 256-271

RESSANG, A.A. (1973b):

Studies on the pathogenesis of Hog Cholera. II. Virus distribution in tissue and the morphology of the immune response.

Zentralbl. Veterinärmed. B 20, 272-288

RIDDEL, K., u. D. STRINGFELLOW (1998):

The use of antibiotics in media for recovery, culture, and storage of embryos.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

Kap. 7, S. 85-92

RIDDEL; K.P., D.A. STRINGFELLOW, B.W. GRAY, M.G. RIDDELL, J.C. WRIGHT u. P.K. GALIK (1993):

Structural and viral association comparisons of bovine zonae pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova.

Theriogenology 40, 1281-1291

RITCHIE, A.E., u. A.L. FERNELIUS (1968):

Direct immuno-electron microscopy and some morphological features of Hog Cholera Virus.

Arch. Gesamte Virusforsch. 23, 292-298

RÜMENAPF, T., R. STARK, G. MEYERS u. H.-J. THIEL (1991):

Structural proteins of Hog Cholera Virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity.

J. Virology Vol.65, No. 2, 589-597

RÜMENAPF, T., G. UNGER, J.H. STRAUSS u. H.-J. THIEL (1993):

Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses.

J. Virology 67, 3288-3294

RÜSSE, I., (1991):

Furchung und Teilung

in: RÜSSE, I., u. F. SINOWATZ (Hrsg.): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.

Paul Parey Verlag, Berlin u. Hamburg, S.131-137

SCHNOOR, B. (1989):

Primitiventwicklung.

in: B. Schnoor (Hrsg.):

Embryologie der Haustiere, F. Enke Verlag, Stuttgart, 2. Auflage S.36-65

SCHWARTZ, P., C. MAGERKURTH u. H. WICHELMANN (1996):

Scanning electron microscopy of the zona pellucida of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Hum. Reprod. 11, 2693-2696

SINGH, E.L., G.C. DULAC u. W.C.D. HARE (1984):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. V. The in vitro exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to african swine fever virus.

Theriogenology 22, Nr.6, 693-700

SINGH, E.L., M.D. EAGLESOME, F.C. THOMAS, G. PAPP-VID u. W.C.D. HARE (1982 a):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to Akabane, Bluetongue and Bovine Viral Diarrhea Virus.

Theriogenology 17, Nr.4, 437-444

SINGH, E.L., W.C.D. HARE, F.C. THOMAS, M.D. EAGLESOME u. A. Bielanski (1983):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. Non-transmission of Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis Virus following trypsin treatment of exposed embryos.

Theriogenology 20, 169-176

SINGH, E.L., J.W. MCVICAR, W.C.D. HARE u. C.A. MEBUS (1986):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VII. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to Foot- and -Mouth Disease Virus.

Theriogenology 26, Nr. 5, 587-593

SINGH, E.L., u. F.C. THOMAS (1987a):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IX. The in vitro exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to Swine Vesicular Disease Virus.

Theriogenology 27, Nr. 3, 443-449

SINGH, E.L., u. F.C. THOMAS (1987 b):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XI. The in vitro exposure of bovine and porcine embryos to Vesicular Stomatitis Virus.

Theriogenology 28, 691-697

SINGH, E.L., F.C. THOMAS, G. PAPP-VID, M.D. EAGLESOME u. W.C.D. HARE (1982 b):

Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to infectious Bovine Rhinotracheitis Virus.

Theriogenology 18, Nr. 2, 133-140

SINOWATZ, F., W. AMSELGRUBER, E. TOEPFER-PETERSEN, I. TOTZAUER, J. CALVETE u. J. PENDL (1995):

Immunocytochemical characterization of porcine zona pellucida during follicular development.

Acta. Embryol. 191, 41-46

STARK, D. (1975):

Keimzellen und Keimzellbildung.

in: Embryology,

Georg Thieme Verlag, Stuttgart,

3. Auflage, S.2-6

STRINGFELLOW; D. (1998):

Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

Kap.6, S. 79-84

STRINGFELLOW, D.A., L.H. LAUERMAN, K.B. NASTI u. P.K. GALLIK (1990):

Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus or Bovine Herpesvirus-4.

Theriogenology 34, Nr.3, 427-434

STROEMSTEDT, M., u. A.G. BYSKOV (1999):

Oocyte, Mammalian

in: E. KNOBIL, J.D. NEILL (Hrsg.): Encyclopedia of Reproduction

Volume 3, S. 469-480

Academic press, San Diego

STUMPF, T.T., R.A. SCHOENBECK u. R.S. PRATHER (1992):

DNA synthesis during the porcine embryo two-cell stage.

Biol. Reprod. 46, 71-83

TAKAGI, J., M. DOBASHI, Y. ARAKI, Y. IMAI, M. HIROI, A. TONOSAKI u. F. SENAO (1989):

The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: II: Electron Microscopy.

Biol. Reprod. 40, 1103-1108

TEUFFERT, J., M. KRAMER u. H. SCHLÜTER (1998b):

Zur Epidemiologie der Schweinepest in Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der Aufgaben des praktischen Tierarztes.

Prakt. Tierarzt coll.vet XXVIII, 45-49

TEUFFERT, J., H. SCHLÜTER u. M. KRAMER (1997):

Europäische Schweinepest Übersicht zur internationalen (Europa) u. nationalen Schweinepestsituation - ermittelter Einschleppungsursachen und Verschleppungsrisiken

Dtsch. Tierärzteblatt 45, 1078-1080

TEUFFERT, J., H. SCHLÜTER u.T. MÜLLER (1998a):

Ebersperma-Ein möglicher Risikofaktor im Infektionsgeschehen des Porcinen Reproduktiven und Respiratorischen Syndroms.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 105, 340-345

THACKER, B.J., R.E. LARSEN, H.S. JOO u. A.D. LEMON (1984):

Swine diseases transmissible with artificial insemination.

Am. J. Vet. Med. Assoc. 185, 511-516

TORRES-HELLMANN, C.R.L. (1994):

Vergleichende Untersuchungen zur Entwicklungskapazität präimplantativer Schweineembryonen durch Kokultivierung und semi-definierte Medien mit oder ohne Taurin und Hypotaurin.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

TSUBAMOTO, H., A. HASEGAWA, M. INOUE, N. YAMASAKI u. K. KOYAMA (1996):

Binding of recombinant pig zona pellucida protein 1 (ZP1) to acrosome-reacted spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 50, 63-67

VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE u. H. CALLESEN (1998):

Effect of pH of culture medium on in vitro development of bovine embryos.

Theriogenology (Abstract) 47, 286

VALDER, W.A. (1984):

Verlauf der Schweinepest seit Ende 1982.

in: Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Fachgruppe Tierseuchenrecht, Gießen 1984, S. 69-86

VAN OIRSCHOT, J.F. (1999):

Classical Swine Fever

in: B.E. STRAW, S. D'ALLAIRE, W.L. MENGELING u. D.J. TAYLOR (Hrsg.): Diseases of Swine.

IOWA State university Press/ Ames, Iowa, U.S.A.

8th Edition, 159-172

VAN OIRSCHOT, J.F., u. C. Terpstra (1977):

A congenital persistent swine fever infection. I. Clinical and virological observations.

Vet. Microbiol. 2, 121-132

VANROOSE, G. (1999):

Effect of the presence of Bovine Herpesvirus-1 or Bovine Viral Diarrhea Virus on development of in-vitro-produced bovine embryos.

in: G. Vanroose (Hrsg.): Interactions of Bovine Herpesvirus-1 and Bovine Viral Diarrhea Virus with bovine gametes and in-vitro-produced embryos.

Gent (B), Universiteit Gent, Diss.

Kap. 5, S. 119-142

VANROOSE, G., H. NAUWYNCK, A. van SOOM, E. VANOPDENBOSCH u. A. KRUIF (1997):

Susceptibility of ZP-intact and ZP-free in-vitro produced bovine embryos at different stages of development to infection with Bovine Herpesvirus-1.

Theriogenology 47, 1389-1402

VANROOSE, G., H. NAUWYNCK, A. van SOOM, E. VANOPDENBOSCH u. A. KRUIF (1998):

Replication of cytopathic and noncytopathic bovine viral diarrhea virus in zona-free and zona-intact in vitro-produced bovine embryos and the effect on embryo quality.

Biol. Reprod. 58, 857-866

VANROOSE, G., H. NAUWYNCK, A. van SOOM, M. YSEBAENT, G. CHARLIER, P. OOSTVELDT u. A. KRUIF (2000):

Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study.

Biol. Reprod. 62, 463-469

VILLAMEDIANA, P., J. RUTTLANT, M.A. LÓPEZ-BÉJAR, F. VIDAL u. M.T. PARAMO (1999):

Changes in zona pellucida surface after in vivo and in vitro maturation of caprine oocytes.

Reprod. Domest. Anim. 34, 1-5

WACHENDÖRFER, G., G.E. REINHOLD, W. DINGELDEIN, J. BERGER, J. LORENZ u. J.W.

FROST(1978):

Analyse der Schweinepest- Epizootie in Hessen in den Jahren 1971-1974.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift 85, 113-152

WANG, W.-H., L.R. ABEYDERRA, R.S. PRATHER u. B.N. DAY (1998):

Morphologic comparison of ovulated and in vitro-maturated porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization.

Mol. Reprod. Dev. 49, 309-316

WASSARMAN, P.M. (1990):

Regulation of mammalian fertilization by zona pellucida glycoproteins.

J. Reprod. Fertil. (Suppl.) 42, 79-87

WASSARMAN, P.M. (1988):

Zona pellucida glycoprotein

Ann. Rev. Biochem. 57, 415-442

WASSARMAN, P.M. (1999):

The Parkes Lecture. Zona pellucida glycoprotein mZP3: a versatile player during mammalian fertilization.

J. Reprod. Fertil. 116, 211-216

WEGNER, C., u. G. KILLIAN (1991):

In vitro and in vivo association of an oviduct estrus-associated protein with bovine zona pellucida.

Mol. Reprod. Dev. 29, 77-84

WENGLER, G. (1991):

Classification and nomenclature of viruses.

Arch.Virol. (Suppl.) 2, 223-233

WINDISCH, J.M., R. SCHNEIDER, R. STARK, E. WEILAND, G. MEYERS u. H.-J. THIEL (1996):

RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies.

J. Virol. 70, 352-358

WRATHALL, A., u. P. SUTMÖLLER (1998):

Potential of embryo transfer to control transmission of disease.

in: Stringfellow, D.A. u. S.M. Seidel (Hrsg.): Manual of the international embryo transfer society.

3rd Edition, IETS, Illinois

Kap. 2, S. 17-44

YOUNG, G.A. (1952):

A preliminary report on the etiology of edema of newborn pigs.

J. am. Vet. Med. Assoc. 121, 394-396

YUREWICZ, E.C., D. HIBLER, G.K. FONENO, A.G. SACCO u. J. HARRIS (1993):

Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP 3 α , a sperm-binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte.

Biochem. Biophys. Acta 1174, 211-214

YUREWICZ, E.C., A.G. SACCO, S.K. GUPTA, N. XU u. D.A. GAGE (1998):

Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles.

J. biol. Chem. 273, 7488-7494

10 Anhang

10.1 **Medienzusammensetzung**

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium):

| | | |
|----------------------------------|------------|----|
| EMEM-Fertigpulver ³ | 9,6 | g |
| NaHCO ₃ ⁴ | 2,2 | g |
| Aqua bidest. ster. | ad 1000,00 | ml |
| Fetales Kälberserum ⁵ | 50 | ml |

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 7,0 eingestellt

EDulb (Eagle's Minimum Essential Medium modifiziert nach DULBECCO und FREEMAN (1959):

| | | |
|----------------------------------|------------|----|
| EDulb-Pulvermedium ⁶ | 13,53 | g |
| NaHCO ₃ | 2,20 | g |
| Penicillin G ⁷ | 0,06 | g |
| Streptomycin Sulfat ⁸ | 0,05 | g |
| Aqua bidest. ster. | ad 1000,00 | ml |

Der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung auf 6,9 eingestellt

³ Fa. GIBCO BRL, Eggenstein, Kat.-Nr. 072-01100T

⁴ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 106329

⁵ Fa. Biochrom, Berlin, Kat.-Nr. 0115

⁶ Fa. Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 47303

⁷ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. P 3032

⁸ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. S 9137

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,0-7,2) nach DULBECCO und VOGT1954

| | | |
|--|------------|----|
| NaCl ⁹ | 8,00 | g |
| KCl ¹⁰ | 0,20 | g |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O ¹¹ | 2,37 | g |
| KH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O ¹² | 0,20 | g |
| CaCl ₂ ¹³ | 0,13 | g |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O ¹⁴ | 0,10 | g |
| Aqua bidest. ster. | ad 1000,00 | ml |

PBS-Tween

| | | |
|------------------------|---------|----|
| PBS | 1000,00 | ml |
| Tween®20 ¹⁵ | 100,00 | µl |

AEC-Stammlösung:

| | | |
|---|-----|----|
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) ¹⁶ | 180 | mg |
| Dimethylformamid ¹⁷ | 27 | ml |

⁹ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 1.06404.5004¹⁰ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 104934¹¹ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 106352¹² Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 112034¹³ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 102083¹⁴ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 814733¹⁵ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 109280¹⁶ Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Prod.-Nr. A 5754¹⁷ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 103053

Natriumazetat-Puffer (pH 5.0: 0.05 M):

| | | |
|--|---------|----|
| Natriumazetat ¹⁸ x 3 H ₂ O | 6,804 | g |
| Aqua bidest. | 1000,00 | ml |

Der pH-Wert wird mit 1 N Essigsäure eingestellt.

AEC-Gebrauchslösung (Menge reicht für 1 Mikrotiterplatte)

| | | |
|--|-----|----|
| AEC-Stammlösung | 0,3 | ml |
| Natriumazetat-Puffer | 5,0 | ml |
| 3% H ₂ O ₂ ¹⁹ | 25 | µl |

ATV (Adjusted-Trypsin-Versen)-Lösung:

| | | |
|-------------------------------|------|---|
| NaCl | 8,00 | g |
| KCl | 0,40 | g |
| Dextrose ²⁰ | 1,00 | g |
| NaHCO ₃ | 0,58 | g |
| Versen (EDTA) ²¹ | 0,20 | g |
| Trypsin (3U/mg) ²² | 0,50 | g |

Lagerung bei -20°C, nicht erneut einfrieren!

¹⁸ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 101539

¹⁹ Wasserstoffperoxid 30%, Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 107209

²⁰ Riedel-de-Haen, Seelze, Art.-Nr. 16325

²¹ Fa. Merck, Darmstadt, Art.-Nr. 108418

²² Fa. Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 37290

EDulb (Eagle's Minimum Essential Medium modifiziert nach DULBECCO und FREEMAN 1959)

| | | |
|----------------------------------|------------|----|
| EDulb-Pulvermedium ²³ | 13,53 | g |
| NaHCO ₃ | 2,20 | g |
| Penicillin G | 0,06 | g |
| Streptomycin Sulfat | 0,05 | g |
| Aqua. bidest. ster. | ad 1000,00 | ml |

Der pH-Wert wird durch CO₂-Begasung auf 6,9 eingestellt

Fert-Talp-Medium (PARRISH u. FIRST 1993)

| | | |
|--|-------|-----|
| BSA Fraction V * | 0,4* | % |
| Coffein | 2,0 | mM |
| Ca-Laktat x 5 H ₂ O | 2,5 | g/l |
| Glukose | 5,0 | mM |
| Kanamycin | 0,1 | g/l |
| KCL | 3,2 | mM |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 0,5 | mM |
| NaCl | 114 | mM |
| Na-Laktat | 10 | mM |
| Na-pyruvat* | 1,0 | mM |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,34 | mM |
| NaHCO ₃ | 25,1 | mM |
| Phenolrot | 0,001 | % |
| PVA | 1,0 | g/l |

*immer frisch zugeben

²³ Fa. Serva, Heidelberg, Art.-Nr. 47303

NCSU 37 (PETTERS u. WELLS 1993)

| | | |
|---------------------------------------|-------|-------|
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 1,7 | mM |
| Cystein * | 0,6 | mM |
| db-cAMP ** | 1,0 | mM |
| EGF * | 10 | ng/ml |
| Glukose | 5,6 | mM |
| Glutamin * | 1,0 | mM |
| hCG ** | 10 | IE/ml |
| Immature Follikelflüssigkeit * | 10 | % |
| Insulin * | 5,0 | mg |
| KCL | 4,8 | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 | mM |
| Merkaptoethanol * | 50 | µM |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 1,2 | mM |
| NaCl | 108,7 | mM |
| NaHCO ₃ | 25,1 | mM |
| Penicillin G | 100 | IE/l |
| PMSG ** | 10 | IE/ml |
| Sorbitol | 12 | mM |
| Streptomycin | 50 | mg |

*immer frisch dazugeben

** Zusatz nur für die ersten 24 h

NCSU 23 (PETTERS u. WELLS 1993)

| | | |
|---------------------------------------|-------|------|
| BSA Fraction V * | 0,4 | % |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 1,7 | mM |
| Glukose | 5,6 | mM |
| Glutamin * | 1,0 | mM |
| Hypotaurin * | 5,0 | mM |
| KCL | 4,8 | mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 | mM |
| Merkaptoethanol | 50 | µM |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 1,2 | mM |
| NaCl | 108,7 | mM |
| NaHCO ₃ | 25,1 | mM |
| Penicillin G | 100 | IE/l |
| Phenolrot | 0,001 | % |
| Streptomycin | 50 | mg |
| Taurin * | 7,0 | mM |

* immer frisch dazugeben

11 Verzeichnis der Abbildungen

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium (RATH 1997) | 23 |
| Abbildung 2: | Die Embryonalentwicklung..... | 27 |
| Abbildung 3: | Schematische Darstellung potentieller Übertragungswege von Pathogenen durch Embryotransfer | 31 |
| Abbildung 4: | Schematische Darstellung der Infizierung von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> produzierten Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium mit intakter Zona pellucida | 53 |
| Abbildung 5: | Schematische Darstellung der Infizierung von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen im Zwei- bis Vier-Zellstadium nach Ablösung der Zona pellucida | 55 |
| Abbildung 6: | KSPV-Titerverlauf in NCSU 23 über einen Zeitraum von 5 Tagen | 57 |
| Abbildung 7: | Nicht infizierte PK(15)A-Zellen (Negativkontrolle)..... | 62 |
| Abbildung 8: | Infizierte PK(15)A-Zellen nach 96-stündiger Kokultivierung von <i>in vivo</i> produzierten Embryonen mit KSPV | 62 |
| Abbildung 9: | Infizierte PK(15)A-Zellen nach Kokultivierung von Blastomeren aus <i>in vitro</i> produzierten Embryonen mit KSPV | 66 |
| Abbildung 10: | Infizierte PK(15)A-Zellen nach 48-stündiger Kokultivierung von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen mit KSPV..... | 66 |

12 Verzeichnis der Tabellen

| | | |
|------------|--|----|
| Tabelle 1: | Vorschriften für die Waschprozedur bei Embryonen..... | 34 |
| Tabelle 2: | KSPV-Infektion von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida | 59 |
| Tabelle 3: | KSPV-Infektion von <i>in vivo</i> produzierten Embryonen mit intakter Zona pellucida | 61 |
| Tabelle 4: | Die Blastozystenrate (%) von <i>in vitro</i> produzierten Embryonen | 63 |
| Tabelle 5: | Die Blastozystenrate (%) von <i>in vivo</i> produzierten Embryonen..... | 64 |

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. vet. D. Rath danke ich für die Überlassung des Themas, für die Betreuung der Arbeit und für die ständige Gesprächsbereitschaft.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich dem Leiter des Institutes für Tierzucht und Tierverhalten der FAL Mariensee, Herrn Prof. Dr. sc. agr. Dr. habil. Dr. h. c. F. Ellendorf.

Herrn Prof. V. Moennig und Herrn Prof. Dr. G. Herrler danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gundula Flögel-Niesmann für die sehr gute und intensive Betreuung der Arbeit.

Frau Birgit Sieg und Frau Antje Frenzel danke ich für die sehr gute Einarbeitung in die *In-Vitro*-Kultivierungstechniken, für die sehr nette Aufnahme in das Laborteam, für die tatkräftige Unterstützung der Arbeit, für Ratschläge zur Problembewältigung und für den Spaß bei der Arbeit.

Frau Gabi Müller danke ich für die sehr gute Einarbeitung in die virologischen Techniken, für die sehr gute und nette Zusammenarbeit sowie für die Hilfestellung bei Problemlösungen.

Bei Frau Priv. Doz. Dr. Irene Greiser-Wilke möchte ich mich ganz herzlich bedanken für zahlreiche Diskussionen und Anregungen während der Durchführung der Arbeit und für ihre Unterstützung nicht nur die Dissertation betreffend.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Biotechnologie des Institutes für Tierzucht und Tierverhalten der FAL Mariensee danke ich für die freundliche Aufnahme und Unterstützung der Arbeit.

Bei Herrn Lothar Schindler und Frau Petra Hassel möchte ich mich bedanken für die zahlreichen Fahrten zum Schlachthof.

Herrn Dieter Bunke danke ich für die Erstellung der Bilder und Montagen sowie für die Beratung in computertechnischen Fragen. Christine Weidemann danke ich für die tatkräftige Unterstützung der Arbeit.

Herrn Hans-Hermann Döpke möchte ich danken für die Beratung und für die Besorgung von Materialien und Hilfsmitteln zur Durchführung der Arbeit.

Frau Erika Lemme danke ich für die vielen Ratschläge, die mir immer sehr geholfen haben.

Frau Dr. Susanne Klocke-Schüler danke ich für ihre Hilfe zur Durchführung der Arbeit, für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung und für ihre Freundschaft.

Ein herzliches Dankeschön an alle Doktoranden und Auszubildenden der FAL, ohne die die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre, besonders an Sabine, Tobias, Claudia K., Nicole, Andrea, Gesa, Michael, Claudia G., Markus, Sebastian, Armando, Tatjana und Mohammed.

Den Mitarbeitern der SVA Mariensee danke ich für die Arbeiten im Stall und den Mitarbeitern des Schlachthauses danke ich für die Schlachtungen der Sauen.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Virologie für die sehr freundliche Aufnahme, insbesondere danke ich Steffi Klein und Frau Dr. med. vet. Beatrice Grummer für ihre Hilfe bei der Erstellung der Bilder.

Herrn Sebastian Fischer danke ich für die gute Zusammenarbeit und den Spaß bei der Arbeit.

Ferner danke ich Jutta Pipereit für die BVD-Untersuchungen und ihren Humor bei der Arbeit, Frau Brigitte Bianco für die gute Zusammenarbeit in der „berufsfremden Branche“.

Herrn Günther Thiem danke ich für die tatkräftige Unterstützung der Arbeit.

Bei Herrn Helmut Schulz möchte ich mich herzlich bedanken für die Lösung aller technischen Probleme, insbesondere für die Überwachung der Brutschränke.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Frey für die zahlreichen Ratschläge und für die Überlassung der Versuchsergebnisse aus dem Jahre 1969.

Ein herzliches Dankeschön geht an Marie-Dorothee Frost für ihre unermüdlichen Rechtschreibkorrekturen und für Ihre Freundschaft.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die finanzielle und moralische Unterstützung während des Studiums, der schwierigen Zeit in Haselünne und der Dissertation ganz herzlich bedanken.

Bei Christian Praha möchte ich mich noch aufs Herzlichste für seine liebevolle Unterstützung und sein Verständnis bedanken.