

## **ADR-Empfehlung 7.1**

### **über Hygienebedingungen für die Gewinnung, Behandlung sowie Übertragung oder Abgabe von Rinderembryonen**

#### **Präambel**

Die ADR-Empfehlung 7.1 ist von der ADR-Projektgruppe Embryotransfer auf der Grundlage der EG-Richtlinie 89/556/EWG vom 25. September 1989 und des Tierzuchtgesetzes vom 22. Dezember 1989 erstellt worden. Sie soll den Ländern zur fachlichen Unterstützung für die Erlassung von Durchführungsverordnungen zum Embryotransfer und den Leitern von Embryotransfereinrichtungen als Leitfaden für den Betrieb einer ET-Einrichtung dienen.

Einige durch die Richtlinie 89/556/EWG aufgestellten Forderungen lehnt die Projektgruppe ab. Diese Punkte sind in der Empfehlung zwar aufgeführt, aber durch Klammern und Kursivschrift gekennzeichnet.

#### **Begründung**

##### **Zu 2.3:**

Die Anschaffung eines Ovomobils für den ambulanten Embryotransfer entbehrt jeglicher praktischer und hygienischer Notwendigkeit. Von der Europäischen Embryotransfer-Organisation (A.E.T.E.) wurde eine Resolution an die Kommission mit folgendem Inhalt übermittelt:

„Als Alternative kann ein amtlich anerkannter Raum auf einem landwirtschaftlichen Betrieb dienen, der zur Nutzung im Zusammenhang mit dem Embryotransfer geeignet ist und dieselben erforderlichen Geräte als ein mobiles Labor enthält.“ Eine endgültige Stellungnahme der Kommission steht noch aus.

##### **Zu 3 c:**

Bei Beachtung der Hygienemaßnahmen ist eine Übertragung der IBR/IPV praktisch ausgeschlossen und speziell bei Sanierungsmaßnahmen eine Nutzung der Donoren bereits üblich (s. Schweizer Modell)

##### **Zu 4 c:**

Die Begrenzung auf zwei Herden erscheint willkürlich gewählt und eine sachliche Begründung ist nicht erkennbar.

##### **Zu 5 l:**

Die routinemäßige Probenahme der Spül- und Waschflüssigkeiten der nicht lebensfähigen Embryonen und der nicht befruchteten Eizellen zur amtlichen Untersuchung ist fachlich nicht vertretbar. Es wurde ein Antrag an die zuständige Bundesbehörde gestellt, eine Änderung des Paragraphen zu bewirken.

## 1. Zweck

Der Zweck dieser Empfehlung ist die Zusammenstellung der besonderen hygienischen Bedingungen, die bei der Gewinnung, Behandlung sowie Übertragung oder Abgabe von Rinderembryonen zu beachten sind. Unter der Behandlung wird die Beurteilung, das Waschen, die Manipulation, die Konservierung und die Lagerung von Embryonen verstanden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass gemäß §14 Tierzuchtgesetz (TierZG) die zuständige Behörde die Erlaubnis zum Betrieb einer Embryotransfereinrichtung erteilt und diese überwacht, und die Bundesregierung und die Landesregierungen nach § 15 TierZG ermächtigt werden, entsprechende Vorschriften zu erlassen.

## 2. Embryotransfereinrichtung (89/556/EWG, Anh.A., Kap. I)

- 2.1 Die Embryotransfereinrichtung muss über geeignete Einrichtungen zur Gewinnung und Behandlung der Embryonen verfügen. Diese können stationär oder ambulant betrieben werden und müssen so ausgerüstet sein, dass sie leicht zu reinigen sind und eine zufriedenstellende Desinfektion zulassen. Die Ausrüstung orientiert sich nach Anlage 1.
- 2.2 Stationäre Einrichtungen für die Gewinnung und Behandlung von Embryonen sollen räumlich vom Raum der Tierbehandlung getrennt sein. Es ist zweckmäßig, warmes und kaltes Wasser sowie die notwendige Ausrüstung für die Sterilisation der Gerätschaften für die Gewinnung, Behandlung und die Übertragung sowie für die Glasgerätschaften zu installieren.
- 2.3 Bei ambulanten Embryotransfer muss ein veterinärhygienisch einwandfreier Bereich für die Behandlung und die vorübergehende Aufbewahrung der Embryonen zur Verfügung stehen. Die Sterilisation der Gerätschaften für die Gewinnung, Behandlung und die Übertragung sowie von Glasgerätschaften muss in stationären Einrichtungen erfolgen. (*Für den innergemeinschaftlichen Handel fordert die EG-Richtlinie ein „Ovomobi“, das über einen besonders ausgerüsteten Raum mit zwei getrennten Abteilungen verfügt.*)
- 2.4 Die Vorbereitung, Verpackung und Lagerung von Geräten und Tierarzneimitteln erfolgt grundsätzlich in stationären Einrichtungen.
- 2.5 Die Gewinnung von Embryonen hat in Räumen stattzufinden, die nicht zur Unterbringung kranker Tiere dienen und leicht gereinigt und desinfiziert werden können. (*Für den innergemeinschaftlichen Handel fordert die EG-Richtlinie die Entnahme der Embryonen in einem getrennten Raum.*)
- 2.6 Eine Embryotransfereinrichtung macht regelmäßig mindestens folgende Aufzeichnungen (TierZG, § 14, Abs. 6) und bewahrt diese mindestens fünf Jahre nach der Übertragung oder Abgabe auf:
  - a) Rasse, Alter und Identifikation der benutzten Spenderkühe und -bullen,
  - b) Ort und Tag der Entnahme sowie Behandlung der von der ET-Einrichtung entnommenen bzw. erworbenen Embryonen,
  - c) Angaben zur Qualität nach Anlage 2

- d) die Abgabe und Verwendung der Embryonen mit Einzelheiten über deren Identifikation.

### **3. Anforderungen an die Herkunftsbestände von Spendertieren (89/556/EWG, Anh. B, 1)**

Spendertiere von Embryonen müssen seit mindestens sechs Monaten in Beständen stehen, die

- a) amtlich anerkannt tuberkulose- und brucellosefrei sind,
- b) frei von enzootischer Rinderleukose oder während der vorangegangenen drei Jahre frei von klinischen Anzeichen enzootischer Rinderleukose sind.
- c) *Für den innergemeinschaftlichen Handel fordert die EG-Richtlinie weiterhin, dass die Bestände während des vorangegangenen Jahres frei gewesen sein müssen von klinischen Anzeichen einer IBR/IPV.)*

### **4. Anforderungen an die Spendertiere (89/556/EWG, Anh. B, Nr. 2)**

Die Spendertiere müssen am Tage der Embryoentnahme

- a) einem Bestand angehören, der keinen Sperrmaßnahmen unterliegt und nicht unter veterinärbehördlicher Quarantäne steht;
- b) frei von klinischen Anzeichen einer Krankheit sein.
- c) *Für den innergemeinschaftlichen Handel fordert die EG-Richtlinie weiterhin, dass die Spenderkühe während der sechs Monate vor der Entnahme höchstens in zwei Beständen gehalten wurden, die den Anforderungen unter Nr. 3 dieser Empfehlung entsprechen.)*

Die Embryonen müssen durch künstliche Besamung mit Samen von einem Vatertier entstanden sein, das in einer Besamungsstation im Sinne von Art. 2 b) der EG-Sperma-Richtlinie 88/407/EWG steht.

### **5. Anforderungen bei der Entnahme und Behandlung von Embryonen (89/556/EWG, Anh. A, Kap 2, Nr.1)**

- a) Geräte und Ausrüstungsgegenstände, die für die Gewinnung, Behandlung, Einfrieren und für die Aufbewahrung von Embryonen verwendet werden, müssen entweder nach Gebrauch beseitigt oder vor neuer Verwendung fachgerecht desinfiziert und sterilisiert werden.
- b) Die Gewinnung und Behandlung der Embryonen hat nach einem Hygienefahrplan zu erfolgen; (Anlage 3: Desinfektion und Sterilisation von Geräten, die zur Gewinnung, Behandlung und Übertragung von Embryonen dienen).
- c) Erzeugnisse tierischen Ursprungs, die während der Entnahme und im Transportmedium verwendet werden, müssen aus Quellen stammen, die keine Gefahr für die Gesundheit der Tiere darstellen; sie sind ggf. vor der Verwendung so zu behandeln, dass eine solche Gefahr vermieden wird.
- d) Die Behältnisse für die Lagerung und den Transport müssen vor jeder Füllung in geeigneter Weise desinfiziert oder sterilisiert werden.

- e) Unmittelbar nach der Gewinnung sind die Embryonen auf Transfertauglichkeit zu untersuchen und zu klassifizieren (Anlage 2).
- f) Vor der Abgabe sollen die gewonnenen und für transfertauglich befundenen Embryonen mit mindestens zehnmalem Wechsel des Embryo-Kulturmediums gewaschen werden; jede Waschung soll eine 100fache Verdünnung der vorhergehenden Waschung sein; bei der Übertragung von einem zum nächsten Waschgang sind jeweils sterile Mikropipetten zu verwenden.
- g) Nach abgeschlossener Waschung werden die Embryonen nochmals auf Transfertauglichkeit mikroskopisch nach den in Anlage 2 genannten Kriterien überprüft.
- h) Danach werden die als tauglich befundenen Embryonen nach entsprechender Behandlung unverwechselbar identifiziert und in sterile Behältnisse (Pailletten) verpackt, die anschließend verschlossen werden.
- j) Jede Paillette mit Embryonen sowie die Behältnisse für die Lagerung und den Transport von Embryonen müssen deutlich mit einer Kennzeichnung in Codeform versehen werden, so dass das Entnahmedatum, die Rasse und die Identität der Spendereltern sowie die Registriernummer der Embryo-Entnahmeeinheit ohne weiteres festzustellen sind. Die Merkmale und das Muster dieser Kennzeichnung werden durch die EG-Kommission festgelegt.
- k) Eine Liste empfohlener Medien befindet sich in Anlage 4.
- l) *Für den innergemeinschaftlichen Handel fordert die EG-Embryonen-Richtlinie weiterhin die routinemäßige Probenahme der Spül- und Waschflüssigkeiten, der nicht lebensfähigen Embryonen und der nicht befruchteten Eizellen zur amtlichen Untersuchung auf bakterielle und virale Kontamination (Anhang A, Kap. II, Nr. 1, n) sowie ggf. die Nutzung von Trypsin im Waschmedium (Anh. A, Kap. II, Nr. 1, i und m).*

## **6. Lagerung von Embryonen (89/556/EWG, Anh. A, Kap 2, Nr.2)**

Die Lagerräume müssen hierzu von der zuständigen Behörde zugelassen werden. Die Zulassung wird nur erteilt, wenn

- a) diese Räumlichkeiten leicht zu säubern und zu desinfizieren sind und
- b) über den Ein- und Ausgang der Embryonen laufend Aufzeichnungen gemacht werden. In diesen Aufzeichnungen ist insbesondere der Empfänger (Abnehmer) der Embryonen anzugeben.

Die zuständige Behörde kann gestatten, dass den Anforderungen der Richtlinie 88/407/EWG entsprechendes Sperma in den zugelassenen Lagerräumlichkeiten gelagert wird.

## **7. Anbieten und Abgeben (TierZG, § 3 Abs. 3, 4, 5)**

- a) Eizellen und Embryonen dürfen nur von Embryotransfereinrichtungen, Zuchtorganisationen und Mitgliedern von Zuchtorganisationen und nur dann angeboten oder abgegeben werden, wenn die Eizellen und Embryonen durch
  - eine Embryotransfereinrichtung gewonnen und behandelt worden sind
  - von Zuchttieren stammen und

- gekennzeichnet sind; befindet sich der Embryo in einem Empfängertier, so muss dieses gekennzeichnet sein.

**b)** Bei der Abgabe müssen

- die Eizellen von einer Zucht- oder Herkunftsbescheinigung für das genetische Muttertier und einem Eizellenschein der Embryotransfereinrichtung,
- die Embryonen von Zucht- oder Herkunftsbescheinigungen für die genetischen Eltern und einem Eizellenschein der Embryotransfereinrichtung begleitet sein.
- Die Blutgruppenkarte der Eltern können den Zuchtbescheinigungen zusätzlich beigelegt werden (s. Präambel in ADR-Empfehlung Nr. 7.2 "Sicherung der Identität von Embryotransfer-Nachkommen").

**c)** Eizellen und Embryonen bedürfen keiner Zucht- oder Herkunftsbescheinigung nach 7 b) wenn der Abnehmer auf sie verzichtet hat.

## **8. Durchführung der Übertragung**

**a)** Zur Sicherstellung hygienischer Übertragungsbedingungen beim Embryotransfer sind die personellen Anforderungen der ADR-Empfehlung 7.3 (Fachtechnische Hinweise zum Embryotransfer) Nr. 2 zu beachten.

**b)** Unter Beachtung der Ziffer 2.6 zur Identifikation von Embryonen stellt die den Embryotransfer durchführende Person die gesetzlich geforderten Bescheinigungen aus, die an den Eigentümer des Empfängertieres gehen.

## **9. Inkrafttreten**

Diese Regelung tritt am 1. Januar 1991 in Kraft.

© Alle Rechte vorbehalten, insbesondere das Recht auf Vervielfältigung und Verbreitung sowie Übersetzung. Kein Teil dieses Textes darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung von der ADR reproduziert werden oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

## **Ausrüstung der Embryotransfereinrichtung zur Gewinnung und Behandlung von Embryonen**

### **1. Labor**

Einrichtungen für das Säubern und Sterilisieren des Instrumentariums fließendes Wasser  
-warm, kalt  
destilliertes Wasser  
Wasserbad mit Thermostat  
Labortisch,  
verschiebbare Schränke

### **2. Embryogewinnung**

Meßzylinder 500 und 1000 ml  
Spülmedium sterilfiltriert  
Spülschläuche und Mandrin  
50 ml Spritzen (einweg)  
20 ml Spritzen (einweg)  
Péan-Klemme (klein)  
Silikonspray  
Besamungshandschuhe  
Mediumflaschen (silikonisiert)  
Thermometer

### **3. Isolierung und Beurteilung der Embryonen**

Stereomikroskop (10- und 40fache Vergrößerung)  
Warmhalteplatte  
Uhrgläser oder Petrischalen  
1 ml Spritzen  
Mikropetten  
Mikrofilter  
Auffangbehälter  
Abheberschläuche (Silikon)  
Kulturmedium, sterilfiltriert  
Stifte, alkoholfest

### **4. Transfer - nicht operativ**

Transfergeräte  
Pailletten  
Hüllen  
Besamungshandschuhe

## Beurteilung von Eizellen/Embryonen

Zur Erzielung optimaler Transferergebnisse ist eine adäquate Beurteilung der Eizellen/Embryonen nach der Gewinnung und ggf. nach dem Einfrieren/Auftauen von größter Wichtigkeit. Zum Vergleich von Spül- und Transferergebnissen sind einheitliche Aufzeichnungen über Zahl und Qualität der gewonnenen Eizellen/Embryonen unverzichtbar.

Für die Qualitätsbeurteilung eignen sich morphologische Kriterien, die mit Hilfe eines geeigneten Stereomikroskopes (10 - 60fache Vergrößerung) erhoben werden können. Grundsätzlich sind zum Transfer nur Embryonen zu verwenden, die einen ihrem Alter entsprechenden Entwicklungsstand erreicht haben und vom Aussehen her eine Weiterentwicklung nach Transfer versprechen. Am Tag 7 der Entnahme sind dafür frühe Morulae (M), kompaktierte Morulae (MM), beginnende Blastozysten (BB) und Blastozysten (B) geeignet. Unbefruchtete Eizellen (UE) und überwiegend bzw. total degenerierte Embryonen (DE) sind für den Transfer ungeeignet. In Zweifelsfällen sollte man sich bei wertvollen Embryonen allerdings für den Transfer entscheiden.

Es hat sich in der Praxis bewährt, die Eizellen/Embryonen nach folgenden Kriterien zu beurteilen:

### 1. Sehr gute Qualität

Keine Veränderungen, scharfrandiger und kompakter Zellverband, helle Farbe, intakte Zona pellucida

### 2. Gute Qualität

wenig ausgestoßene bzw. degenerierte Blastomeren, scharfrandiger und kompakter Zellverband, helle Farbe, intakte Zona pellucida

### 3. Mäßige Qualität

größerer Anteil ausgestoßener bzw. degenerierter Blastomeren, kleiner noch kompakter Zellverband, helle bis dunkle Farbe, z. T. retardierte Entwicklung oder beschädigte Zona pellucida

### 4. Schlechte Qualität

überwiegender Anteil degenerierter Blastomeren, vorwiegend lockerer Zellverband, häufig dunkle Farbe, z. T. stark retardierte Entwicklung oder beschädigte Zona pellucida (ohne Zona pellucida)

Embryonen der Kategorien (1) und (2) sind für den „Frischtransfer“, für das Tiefgefrieren, für den Export sowie für die Teilung geeignet.

Embryonen mit den Qualitätskriterien (3) und (4) sind z.T. nur mit Einschränkung für den „Frischtransfer“ geeignet, für das Tiefgefrieren, für den Export und für die Teilung sind sie ungeeignet.

Für die computergerechte Auswertung werden degenerierte Embryonen (DE) mit 5 und unbefruchtete Eizellen (UE) mit 6 codiert.

## **Desinfektion und Sterilisation von Geräten, die zur Gewinnung, Behandlung und Übertragung von Embryonen dienen**

### **1. Spül-Katheter**

Nach Benutzung des Katheters ist dieser **sofort** mit Wasser gründlich innen und außen zu reinigen. Danach wird er für zwei Stunden in eine Desinfektionslösung eingelegt. Nachdem der Katheter luftgetrocknet ist, kann er erneut zum Einsatz kommen.

Bei Gassterilisation muss eine mindestens 48-stündige Auslüftungszeit der Gasreste eingehalten werden. Der zum Spülkatheter gehörige Mandrin muss in geeigneter Form sterilisiert werden. Eine Sterilisation des Katheters im Trockensterilisator, im Dampfautoklaven oder durch Kochen ist zu unterlassen, wenn man eine angemessene Lebensdauer des Katheters erwartet.

Bis zur Wiederbenutzung muss eine Lagerung in steriler Form sichergestellt sein.

### **2. Glaswaren zur Beurteilung und Kultivierung**

Die Glaswaren werden gründlich gewaschen, gespült, in destilliertem Wasser nachgespült und im Sterilisator bei 150 °C eine Stunde sterilisiert. Es empfiehlt sich, die Glaswaren vor erstmaligem und nach mehrmaligem Gebrauch ( 4 - 5mal) zu silikonisieren.

Nach der Reinigung taucht man die Gläser in eine 0,5 - 1%ige Lösung einer Siliconölemulsion (nach Gebrauchsanweisung). Die abgetropften Gegenstände werden in Sterilisatoren eingebrannt.

Folgende Einbrennzeiten sind zu empfehlen:

bei 260 °C                    2 Stunden

bei 300 °C                    15 - 20 Min.

bei 330 °C                    10 Min.

Bis zur Wiederbenutzung muss eine Lagerung in steriler Form sichergestellt sein.

### **3. Transfergeräte**

Die Transfergeräte werden gründlich gewaschen, gespült und mit destilliertem Wasser nachgespült. Anschließend werden die Transfergeräte im Sterilisator bei 150 °C eine Stunde lang sterilisiert und bis zur Wiederbenutzung in steriler Form gelagert - sofern nicht produktionssterile Einmalpipetten verwendet werden.

## Medien zur Durchführung des Embryotransfers

### 1. Spülmedium (Angaben für 1 Liter)

Dulbecco's PBS mit Zusatz von

1000 mg Glucose

36 mg Na-Pyruvat

20 mg Penicillin

40 mg Streptomycin

Vor Gebrauch Zusatz von 200 mg BSA (Fraktion V) oder 10 ml FCS.

### 2. Kulturmedium

4 Teile fertiges Spülmedium + 1 Teil FCS oder

50 ml fertiges Spülmedium + 200 mg BSA (Fraktion V) = 0,4 % BSA in PBS-Lsg.

### 3. Tiefgefriermedium für Standardmethode

10 % Glycerin in PBS-Lsg. + 0,4 % BSA

= 10 ml 99,9 %iges Glycerin in 100-ml Messkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

### 4. Ausverdünnungsmedien

#### 6,6 % Glycerin und 0,3 molare Sucrose/PBS-Lösung

= 6,6 ml Glycerin (99,9 %ig) + 10,28 Sucrose in 100-ml Messkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

#### 3,3 % Glycerin + 0,3 molare Sucrose/PBS-Lsg.

= 3,3 ml Glycerin (99,9 %ig) + 10,28 Sucrose in 100-ml Meßkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

#### 0,3 molare Sucrose/PBS-Lsg.

= 10,28 Sucrose in 100-ml Messkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

#### Ausverdünnungsmethode

1. Stufe: 6,7 % Glycerin und 0,3 molare Sucrose/PBS-Lösung

2. Stufe: 3,3 % Glycerin und 0,3 molare Sucrose/PBS-Lösung

3. Stufe: 0,3 molare Sucrose/PBS-Lösung

4. Stufe: PBS-Kulturmedium

#### Ausverdünnungsmedien

#### 8,3 % Glycerin/PBS-Lsg.

= 8,3 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben u. mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

#### 6,6 % Glycerin/PBS-Lsg.

= 6,6 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben u. mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

#### 5,0 % Glycerin/PBS-Lsg.

= 5,0 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben u. mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

**3,3 % Glycerin/PBS-Lsg.**

= 3,3 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben u.mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

**1,7 % Glycerin/PBS-Lsg.**

= 1,7 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

**Ausverdünnungsmethode**

1. Stufe: 8,3 % Glycerin/PBS-Lösung
2. Stufe: 6,6 % Glycerin/PBS-Lösung
3. Stufe: 5,0 % Glycerin/PBS-Lösung
4. Stufe: 3,3 % Glycerin/PBS-Lösung
5. Stufe: 1,7 % Glycerin/PBS-Lösung
6. Stufe: PBS-Kulturmedium

**5. Tiefgefriermedium**

für One-Step-Methode (Methode Neustadt/Aisch)

1 Mol Glycerin

= 7,3 ml Glycerin (99,9 %ig) in 100-ml Meßkolben geben u. mit PBS-Kulturmedium auffüllen.

0,5 Mol Sucrose

= 17,12 g Sucrose in 100-ml Meßkolben geben und mit PBS-Kulturmedium auffüllen.