

수정란 이식을 통한 전염병 발생과 위생

김 용 준

전북대학교 수의과대학

Considerations on Possible Transmission of Infectious Diseases by Embryo Transfer in Domestic Animals and on *In-vitro* Sanitary Treatment for Disease Control

Kim, Yong-Jun

College of Veterinary Medicine

Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Republic of Korea

I. 서 론

가축생산에서 인공수정 및 수정란 이식술은 생산성의 증진, 가축개량, 우수가축의 확산, 번식장애 동물의 개선, 등에서 커다란 기여를 해오고 있다. 그러나 수정란 이식이 비위생적으로 처리될 때 적지 않은 문제점이 야기될 수 있다.

특히, 수정란 이식은 인공수정보다도 그 시술의 과정이 매우 복잡하여 각 단계에서 철저한 위생적 처리가 요구되며, 비위생적 처리에 의해 이식기술 각 과정에서 발생될 수 있는 감염은 수정란 자체를 감염시켜 수정란의 사멸 또는 발육장애를 일으키거나 또는 자궁내 감염에 의한 부적절한 환경으로 인하여 결국 수정란의 사멸을 일으킴으로써 불수태의 원인이 되고 있다. 따라서 아무리 수정란의 상태가 양호하고 수정란 이식 전과정의 기술이 완벽해도 위생처리가 부적절할 때 수정란 이식은 실패로 돌아갈 수 있다.

이와 관련하여 많은 연구자들은 특히, 수정란 이식 기술이 활발하게 수행되고 있는 소를 중심으로 하여 수정란이 점염성 병인체를 전파할 수 있는지를 생체와 실험실 실험을 통해 규명하고자 했으며, 이에 대한 예방처리 방법은 무엇인지를 조사한바 이를 정리하여 소개하고자 한다.

II. 인공수정 및 수정란 이식을 통해 전파될 수 있는 가축질병

1. 감염방법 (M. Perez. 1985)

1) **Gametes를 통한 감염** : 미생물은 수정시 병인체에 감염된 정자를 통해 난자내 침입할 수 있다. 미생물중 바이러스는 정자 또는 난자의 염색체내 침입해 들어갈 수 있으며, 그 결과 수정란의 세포내에서 증식될 수 있다. 미생물이 수정란내 일부분으로 존재할 경우는 태아의 발달을 저해하지 않으나 수정란 세포의 염색체와 함께 증식해나가면 수정란을 사멸시킬 수 있고 나아가 수란우에 까지 미생물이 전파되어 수란우에서 질병의 임상적 증상이 나타나며 주변동물에 대한 전염을 일으킬 수 있다.

2) **수정란이 발육되거나 환경을 통한 감염** : 수정란이 발달되는 난관액이나 자궁액이 오염되어 있을 때 또는 수정란 이식과정중 여러 가지 감염경로에 의해서 감염이 일어난다.

2. 수정란에 대한 세균감염

1) 수정란의 조기 사멸의 원인

세균은 수정란의 조기사멸을 일으킬 수 있는 것으로 보이며, 세균에 의한 수정란의 조기 사멸은 수정후 4~10일간에 자궁내에서 일어나는 것으로 보인다. 이때 세균자체가 투명대가 있는 수정란을 사멸시킨다고는 보기 어렵고, 세균에 의해 오염된 환경으로 인해 수정란 생존을 위한 적합한 환경이 조성되지 못하는 것이 원인인 것으로 보이며, 투명대가 제거된 후에는 세균이 수정란 세포를 감염시키는 것으로 보인다.

2) 수정란 사멸에 관계되는 주요세균과 수정란 감염여부

수정란 사멸에 관계되는 주요 세균 및 원충은 Table 1 과 같다.

Table 1. Major bacterial agents causing embryonic mortality in cattle

Bacterial agent	Remarks
Brucella abortus	- Increasing embryonic mortality - From over than 10 days after insemination
Campylobacter fetus	- Known to cause embryonic mortality around 2 to 3 weeks after fertilization - Known not to cause infection to embryos
Trichomonas fetus	- To take 3-4 weeks to invade into uterus - Known not to cause infection to embryo

3. 정액 및 수정란에 대한 바이러스 감염

1) 정액에서 인정되고 있는 바이러스는 Table 2 와 같다.

Table 2. Viral agents detected in bovine semen

Virus	References	Remarks
1) Virus detected in semen from the bulls in natural status.		
FMD	M. Perez (1985)	
Blue tongue	M. Perez(1985), Breckon et al (1980)	
IBR	Forster et al (1980), Philips (1986)	
BVD	Cornia & McClarkin (1978)	
Leukemia(BLV)	Lucas et al (1974)	
Lumpy skin disease	M. Perez (1985)	
2) Virus detected from the bull with viremia		
BTV	Bowen et al (1983)	
3) Cases of viral infection by semen		
BTV	Thomas et al (1985)	semen from the bull infected → negative cow
IBR	Deas & Johnston (1973) Kupferschmied, et al (1986)	
4) Virus considered to cause infection by semen		
IBRV, BVDV, FMDV	Garner & Hafez (1987)	

2) 난자 및 수정란에 대한 바이러스 감염 사례는 Table 3과 같다.

Table 3-1. Cases of viral infection to oocytes or embryo

Species	Virus	oocyte/embryo	Remarks(Ref.)
Human	Infective hepatitis v.	oocyte/embryo	To cause Down's syndrome (Stoller & Collmann, 1965)
Rabbit	Simian virus 40	Embryo	By infected semen (Brackett et al. 1971)
Mouse	viral particle	Embryo	M. Perez. Chase et al (1973)
Guinea pig		Embryo	M. Perez.
Baboon		Embryo	M. Perez.
Mouse	Leukemia v.	Embryo	Feldman & Gross (1989)

Table 3-2. Experimental infection of virus to embryos in cattle

Virus	Status of embryo	Method of infection	Detection (Result)	Ref
BTV	ZPF	In-vitro	Cell culture Immunofluorency	Bowen et al(1982)
IBRV	Hatched BL	In-vitro	Embryo death EM/cell culture	Bowen et al(1985)
IBRV BVDV	ZPF	In-vitro	Low viability	Bielanki et al(1987)

Table 3-3. Organism that penetrate the zona pellucida and infect the embryo

Pathogen	Effect	Ref
BVDV	Degeneration of embryo	Archbald (1979)
Feline leukemia virus	Replication of the virus in 3-day-old hamster embryo	Chpman (1974)
Human adenovirus	8-cell mouse embryos (development arrested/viral replication)	Chase et al (1972)
Mengo encephalitis virus	Mouse embryo (2cell-morula) replication	Gwatkin (1966, 1967, 1971)

3) 수정란 이식시 바이러스 질병이 발생된 사례는 Table 4와 같다.

Table 4. Cases of viral infection by embryo transfer

Species	Virus	References	Remarks
Bovine	BVDV	Hare (1986)	Two cases
Bovine	BLV	Digiaeomo (1986)	
Ovine	BTV	Gilbert, et al (1987)	
Swine	PrV	Bolin et al (1982)	

4) 바이러스를 임신한 동물에 인위적으로 감염시켜 그 결과를 조사한 사례는 Table 5와 같다.

Table 5. Cases of experimental in-vitro infection of virus to pregnant animals

Species	Virus	Result	Remarks	Ref
Mouse	reovirus	Fetal death in uterus Fetal absorption Fetal anomalies	0-18 days	Hassan & Cochran (1969)
Rat	Sendai (para-influenza type 1)	Fetal absorption	by aerosol	Coid & Wardmon (1971)
Bovine	BVDV	Degenerated embryo from infected ut.	-In fusion into u. -Detection by EM	Archbald (1979)
Bovine	BVDV	Decrease of number of embryo. Decrease of Hatched blastocyst	Infusion into u.	Grahn et al. (1984)

5) 바이러스가 임신한 가축에서 태반감염을 일으켜 가축수정란 또는 태아의 손실이 일어난 사실은 Table 6과 같다.

Table 6. Intrauterine transmission of virus in domestic animals

Animals	Virus	Result	Ref
Bovine	BVDV	Abortion	Kahrs (1968,1970)
		Congenital anomalies	Casaro, et al(1971) Barber et al (1985)
Bovine	BVDV	Abortion stillbirth	Kendrick(1971)
		Mummification	Reuter et al (1987)
Bovine	IBRV	Fetal death	Kendrick (1973)
			Richardson et al (1985)
Bovine	BTV	Abortion	Leudke, et al (1977)
		Anomalies	
Bovine	BLV	Abortion	Van Der Maaten et al (1981)
		Stillbirth	
Ovine	BTV	Abortion	Gibbs et al (1979)
		Stillbirth	Richardson et al (1985)

III. 수정란 이식을 통해 전염위험성이 있는 가축질병

수정란 이식을 통해 전염이 가능한 질병으로 지목되는 질병은 Table 7과 같다.

Table 7. Infection diseases transmissible by ET

Animals	Viral Diseases	Bacterial Diseases	Ref
Bovine	BVD	Haemophilus s. infection	Parez (1985)
	IBR		Singh & Hare (1986)
	Blue tongue		Kim & Jo (1989)
	FMD		
	Akabane		
	Ibaraki, etc		
Swine	African Swine fever		
	Porcine parvo		
	Pseudo rabies		
	Swine vesicular disease		
Ovine	Blue tongue		
Caprine	Caprine arthritis encephalitis		Lamara et al. (2000)

IV. 수정란 이식을 통한 질병전파 안전성 조사

1. 수정란에 대한 생체 및 실험실내에서 세균 및 바이러스 처리 실험을 통한 안전성 조사

1) 투명대가 있는 수정란(Zona pellucida intact)을 In-vitro에서 병인체에 노출시킨 결과는 Table 8과 같다.

Table 8. Embryonic development and infectivity of zona-intact embryos after pathogen exposure and washing

Pathogen	Titre of pathogen	No. Embryos Exposed	Effect of Development	% Embryos carrying pathogen
Bovine Embryo				
AV	10 ⁶ pfu/ml	80	none detected	0
BLV	Cocultivation infected cells	12	none detected	0
BTV	10 ² -10 ⁷ pfu/ml	120	none detected	0
BVDV	10 ⁴ -10 ⁵ TCID ₅₀ /ml	122	none detected	0
FMDV	10 ⁶ pfu/ml	169	none detected	0
IBRV	10 ⁶ -10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	83	none detected	70
VSV	10 ⁵ -10 ⁷ pfu/ml	96	none detected	30
B. abortus	10 ¹ -10 ⁴ cells/ml	96	dec. viability	0
Porcine Embryos				
ASFV	10 ⁶ HAdD ₅₀ /ml	80	none detected	95
FMDV	10 ⁶ pfu/ml	124	none detected	3
HCV	10 ⁴ -10 ⁶ pfu/ml	148	none detected	100
PPV	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	38	dec. viability	100
PrV	10 ⁴ -10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	257	none detected	24
SVDV	10 ⁷ pfu/ml	83	none detected	100
VSV	10 ⁵ -10 ⁶ pfu/ml	66	none detected	80
Ovine Embryos				
BDV	10 ² pfu/ml	49	Not tested	0

소에서, 수정란을 Virus에 노출시키고 나서 Washing 후 IBRV와 VSV가 수정란으로부터 확인되었으나 이 양군에서 바이러스의 증식은 일어나지 않았다. B. abortus의 경우, 수정란 발육억제가 인정되었다. 돼지에서, 바이러스에 노출시키고 나서 washing 후 Table 8의 모든 바이러스가 수정란으로부터 확인되었으나 수정란의 생존율을 감소시킨 것은 PPV 뿐이었다.

2) 수정란의 투명대를 제거하고 나서 수정란(Zona pellucida Free)을 In-vitro에서 병인체에 노출시킨 결과는 Table 9와 같다.

Table 9. Embryonic development and infectivity of zona-free embryos after pathogen exposure and washing

Pathogen	Titre of pathogen	No. Embryos Exposed	Effect on Development	Assay of Embryos
Bovine Embryos				
BLV	Cocultivation	15	none detected	Neg.
BTV	10 ⁵ pfu/ml	18	embryo death	Pos.
BVDV	10 ⁵ pfu/ml	26	none detected	Neg.
FMDV	10 ⁶ pfu/ml	42	none detected	Pos.
IBRV	10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	53	embryo death	Pos.
B.abortus	10 ¹ -10 ⁵ cells/ml	3	dec. viability	Neg.
Procine Embryos				
PrV	10 ⁴ -10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	46	not tested	Neg.

소에서는 투명대제거 수정란을 바이러스에 노출시키고 나서 washing 한 결과 BTV, FMDV, IBRV가 수정란내 존재함이 확인되었으며, IBRV와 BTV는 수정란내 증식된 것이 인정되었고 수정란의 사멸이 일어났다.

Br. abortus의 경우 수정란의 생존성은 감소되었으나 세균은 인정되지 않았다.

3) 바이러스에 감염된 동물로부터 수정란을 회수하여 수정란 이식을 한 결과는 Table 10과 같다.

돼지에서 PrV는 수정란을 통해 감염이 일어났는데 이 경우는 많은 양의 바이러스를 공란돈의 자궁내 주입한 경우 이었다. (2/5두)

Table 10. Transfer of embryos from seropositive or infected donors

Donors	No. Embryos transferred (No. Recipients)	Serological status of offspring & recipients
Bovine Embryos		
BLV-seropositive	596	Negative
BTV-infected	87(83)	Neg.
FMDV-infected	27(19)	Neg.
IBRV-infected	64 trypsin-treated(49)	Neg.
Porcine Embryos		
HCV-infected	385(17)	Neg.
PrV-seropositive	805(34)	Neg.
PrV- infected (intranasally & intrauterinely)	70(5)	2/5 sero pos.
PrV-infected (intranasally)	45(3)	Neg.
SVDV-infected	205(9)	Neg.

4) 감염된 동물로부터 회수한 수정란에 대한 병인체 분리검사는 Table 11과 같다.

Table 11. Assay of embryos derived from seropositive or infected donors

Status of Donor	No. Embryos (Eggs) Collected	Assay of Embryos
Bovine Embryos		
BLV-seropositive	60(26)	Neg.
BVDV-seropositive	2(21)	Neg.
BTV-infected	51(14)	Neg.
FMDV-infected	116	Neg.
IBRV-seropositive	13(18)	Neg.
IBRV-infected	63 trypsin-treated	Neg
B.abortus-infected	160	Neg
Porcine Embryos		
HCV-infected	19(74)	Neg.
SVDV-infected	17(95)	Neg.

바이러스 또는 부르셀라 감염동물 또는 양성반응을 보인 공란동물로부터 수정란을 회수하여 바이러스 병성 감정 결과 모두 음성을 나타내었다.

5) 병인체 감염동물로부터 자궁을 세척하여 세척액에 대한 병인체 분리검사는 Table 12와 같다.

Table 12. Assay of uterine flush fluids from seropositive or infected donors

Status of Donor Flushed	No. Positive Flushes
Bovine	
BLV-seropositive	4/25
BTV-infected	12/30
Bred with BTV-infected	0/4
FMDV-infected	12/16
IBRV-infected	9/33
B. Abortus-infected	9/89
Porcine	
HCV-infected	6/33
SVDV-infected	8/17

감염동물의 자궁세척액 모두에서 병인체들이 확인 되었다.

6) In-vitro에서 수정란을 바이러스에 노출시킨 후 수정란 이식한 결과는 Table 13과 같다.

Tble 13. Transfer of embryos exposed to pathogens in-vitro

Pathogen	Titre of Exposure Pathogen	No. Embryos Exposed and Transferred (No. Recipients)	Status of Offspring & Recipients
Bovine Embryos			
BLV	concultivation infected cells	42(2)	Neg.
IBRV	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	38 trypsin-treated(22)	Neg.
IBRV	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	8(4)	1/4 Pos.
Porcine Embryos			
PPV	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	76(4)	Pos.
PrV	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml	45(4)	Neg.
PrV	10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	79(5)	Pos.

소에서는 IBRV에 노출된 수정란을 이식후 수란우 4두중 1두에서 감염이 일어났고, 돼지에서는 PPV, RrV에 노출된 수정란 이식시 감염상태가 확인되었다.

V. In-vitro에서 수정란 처리시 수정란 자체에 대한 위생처리 방법

1. 수정란에 대한 여러번의 washing

병인체에 노출된 수정란에 대한 washing 효과는 Table 14와 같다.

Table 14. Effect of washing to remove pathogens from embryo

Virus Exposed	Animal	Times of washing	Result	Ref
ASFV	Swine	1~2	95% Pos.	Singh(1984)
IBRV	Bovine	1~2	57~64% Pos.	Singh et al(1982)
ZPI Embros				
IBRV	Bovine	3~4	All positive	Singh et al(1984, 1986)
FMDV			Decreasing Titre	Singh et al(1987)
ASFV	Swine			
SVDV		6~7	Scarcely detected	
IBR, FMD, ASF, SVD		Last 3~4	All Neg.	
Ibaraki	Mouse		All Neg.	Kim & Jo(1989)
ZPF Embryos(or Hatched)				
FMDV	Bovine (Hatched)	From the 7th washing	Neg.	Singh(1986)
Br. Abortus	(ZPF)	From the 9th washing	Neg.	Singh et al (1984, 1986)
Ibaraki v	Mouse (ZPF)	From the 10th washing	Neg.	Kim & Jo(1989)

In-vitro에서 수정란을 10회 정도의 washing은 pathogen 제거에 효과가 있음을 알 수 있었다.

2. 수정란에 대한 효소 처리

병인체에 노출된 수정란에 대한 효소처리 효과는 Table 15와 같다.

Table 15. Effect of trypsin treatment on pathogen-exposed zona-intact embryos

Pathogen	Titre of Pathogen	No. Embryos Treated with Trypsin	5 Embryos Carrying Pathogen	Ref
Bovine Embryos				
IBRV	10 ⁷ TCID ₅₀ /ml	32	0	Singh et al(1982)
VSV	10 ⁷ pfu/ml	23	0	
Porcine Embryos				
ASFV	10 ⁹ HAdD ₅₀ /ml	126	30	Singh et al(1984)
HCV	10 ⁷ pfu/ml	28	0	Dulac & Singh(1988)
PrV	10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	45	0	Singh & Thomas(1989)
SVDV	10 ⁷ pfu/ml	100	64	Singh et al(1989)
VSV	10 ⁹ pfu/ml	83	0	Singh & Thomas(1989)

소에서 Trypsin 처리는 IBRV와 VSV를 제거하거나 불활화하는데 효과가 있었고, 돼지에서 PrV, HCV, VSV 제거에 효과가 있었으나 ASFV와 SVDV 노출 수정란으로 부터는 상기 바이러스를 제거하지 못했다.

3. 수정란에 대한 항혈청 처리

특이 질병에 대한 항혈청을 사용했을 때 바이러스 제거 효과는 Table 16과 같다.

Table 16. Effect of specific antiserum to protect embryos from pathogen

Animal	Virus	Effective to remove pathogen (Non-effective)	Ref.
Cattle	IBRV	Effective	Singh et al(1983)
Swine	ASFV	Non-effective	Singh et al(1984)

4. 국제 수정란이식협회에서 추천하는 위생처리 방법

Table 17. Guideline of IETS to remove pathogen from embryos

Order	Washing No.	Guideline
1	1~5	Washing embryos with PBS(0.4% BSA, penicillin 100U/ml, SM 100µg/ml)
2	6~7	Washing in the medium containing trypsin (0.25%, pH 7.6~7.8, for 60~90 seconds)
3	8~12	Washing embryos with PBS

- N. B : 1) Only zona pellucida-intact embryos
2) To be washed in groups of 10 or fewer
3) Separate sterile micropipettes between washes

Ref. Bielanski(1998)

VI. 결 론

1. 수정란 이식을 통한 질병의 전파 가능성

- 1) 정자 및 난자를 통해 미생물의 전파가 일어날 수 있다.
- 2) 수정란이 자라거나 회수되는 환경을 통해 미생물의 전파가 일어날 수 있다.
- 3) 세균의 경우, 투명대가 있는 수정란 자체를 감염시켜 수정란을 사멸시킨다고 보기는 어렵고, 세균으로 오염된 환경은 수정란 생존에 적합하지 못한 점, 투명대로부터 Hatching 된 후 감염이 일어날 수 있어 조기사멸의 원인이 되는 것으로 보인다.
- 4) 바이러스의 경우, 투명대가 있는 수정란을 감염시킬 수 있는 바이러스가 있다(Infective hepatitis virus, Mengo encephalitis virus) 또한, 투명대가 제거된 수정란은 여러 가지 바이러스가 쉽게 감염시킨다.
- 5) 따라서, 세균이나 곰팡이가 투명대를 통과하여 수정란 세포를 직접 감염시킬 가능성은 거의 없으며 바이러스는 투명대를 통과할 수 있는 바이러스가 있어 수정란 이식에서 질병의 전파는 바이러스가 더 우려 된다. 특히 Hatching 후 감염 가능성이 높다.

2. 수정란 이식을 통해 전염성이 있는 가축 질병

소에서는 BVD, IBR, BT, BL, FMD, Akabane, Ibaraki병이, 돼지에서는 ASF, PP, Pseudorabies, SVD가 양에서는 BT가 전염 가능성이 있는 것으로 알려져 있다.

3. 수정란 이식을 통한 질병 전파 안전성

1) 실험에 이용된 모든 병인체에서는 투명대가 있는 수정란은 수정란 세포내에서 병인체의 증식이 일어나지 않았다.

2) 투명대를 제거한 경우, 세포내에서 바이러스의 증식이 일어났다(BTV, IBRV, FMDV).

3) In vitro에서는 바이러스에 노출시키고 washing 후 수정란으로부터 바이러스가 검출되었다.

소 : IBRV, VSV

돼지 : ASFV, FMDV, HCV, PPV, PrV, SDV, VSV

이러한 바이러스들은 수정란 이식을 통해 전파될 수 있음을 뜻한다.

수정란 이식을 통해 감염이 일어난 경우로서는 BVD, BT가 있다.

4) 병인체에 감염된 공란우로부터 회수된 수정란을 비감염수란우에 이식한 결과 실험된 바이러스중 어떤 바이러스도 전파되지 않았다(돼지에서 PrV는 전파되었는데 이 경우는 생식기내 많은 양의 바이러스가 주입된 경우이다.).

5) 따라서, 상기 In vivo 및 In vitro 실험결과를 볼 때 수정란을 통해 질병이 전파될 수 있는 가능성은 정액이나 생동물의 경우 보다도 현저히 적은 것으로 볼 수 있다.

4. 질병전파 방지를 위한 실험실내 수정란 위생처리 방법

1) 수정란을 최소 10회정도 washing 해야하며, 이때 수정란은 투명대가 온전한 상태이어야 한다.

2) Washing 과정중 trypsin 처리는 병인체 제거에 상당히 효과가 있다.

3) 특히 질병에 대해서는 항혈청 처리도 효과가 있다.

VII. 참고문헌

- Archbald LF, Fulton RW, Seger CL, et al. Effects of the bovine viral diarrhea(BVD) virus on preimplantation bovine embryos: A prelim. inary study. *Theriogenology* 1979;11:81-89.
- Bielanski A, Singh EL, Hare WCD. Effect of bovine rhinotracheitis virus(IBRV) and bovine viral diarrhea virus(BVDV)on survival of prehatched embryos. *Theriogenology* 1987;27:214.
- Bielanski A, Jordan L. Washing or washing and trypsin treatment is ineffectlive for removal of noncytopathic bovine viral diarrhea virus from bovine oocytes or embryos after experimental contamination of an in vitro fertilization system. *Theriogenology* 1996;46:1467-1476.
- Bielanski A, Dillbuc C. In vitro fertilization of ova from cows experimentally infected with a non-cytopathic strain of bovine viral diarrhea virus. *Anim Reprod Sci* 1995;38: 215-221.
- Bielanski A. Development of IVF embryos in the presence of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus. *Theriogenology*. 2000;52:318.
- Bielanski A. potential for disease control or transmission by embryos produced in vitro: a review of curreint literature. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy IL: IETS, 1998;45-53.
- Bolin SR, Bolin CA.. Pseudorabies virus infection of six-and ten-day-old porcine embryos. *Theriogenology* 1984;22:101-108.
- Bolin SR, Runnels LJ, Sawyer CA, et al, Resistance of porcine preimplantation embryos to pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 1981;42: 1711-1712.
- Bolin SR, Runnels LJ, Sawyer CA, et al. Experimental transmission of pseudorabies virus in swine by embryo transfer. *Am J Vet Res* 1982;43:278-280.
- Bolin SR, Turek JJ, Runnels LJ, et al. Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pellucida of the porcine embryo. *Am J Vet Res* 1983;44:1036-1039.
- Bowen RA, Elsdon RP, Seidel GE. Infection of early bovine embryos with bovine herpesvirus-1. *Am F Vet Res* 1984;185:429-432
- Boyd H. Embryonic death in cattle, sheep and pigs. *Vet Bulletin* 1965;35:251~266.
- Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, et al. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Nat Acad Sci USA* 1971;68: 353-357.
- Eaglesome MD, Hare WCD, Singh EL. Embryo transfer: A discussion on its potential for infectious disease control based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents. *Can Vet J* 1980;21:106-112.

- Eaglesome MD, Mitchell D, Betteridge KJ, et al. Transfer of embryos from bovine leukemia virus-infected cattle to uninfected recipients: Preliminary results. *Vet Rec* 1982;111:122-123.
- Gilbert RO, Coubrough RI, Weiss KE. The transmissin of bluetongue virus by embryo transfer in sheep. *Theriogenology* 1987;27:527-540.
- Grahn TC, Fahning ML, Zemjanis R. Nature of early reproductive failure caused bovine viral diarrhoea virus. *JAVMA* 1984;185:429-432.
- Gwatkin RBL, Auerbach S. Synthesis of a ribonucleic acid virus by the mammalian ovum. *Nature* 1966;209:993-994.
- Gwatkin RBL. Passage of mengovirus through the zona pellucida of the mouse morula. *J Reprod Fert* 1967;13:577-578.
- Gwatkin RBL. studying the effects of viruses on eggs. In: Daniel, JCJr, ed. *Methods in mammalin embryology*. San Francisco: W, H. freeman and Company, 1971;228-237.
- Hare, WCD, Mitchell, D, Singh, EL, et al. Embryo transfer in relation to bovine leukaemia virus control and eradication. *can Vet J* 1985;26:231-234.
- Hare,WCD.BVD virus infection and embryo transfer. *Vet Rec* 1986;118:544.
- Parez M. The most important genital diseases of cattle(control, treatment and the hygiene of semen collection. *Rev sci tech Off int Epiz* 1985;4(1):69-87.
- Shelton JN. Prospects for the use of embryos in the control of disease and the transport of genotypes. *Aust Vet J* 1987;64:6-10.
- Singh EL, Dulac GC Hare, WCD. 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. *Thriogenology* 1984;22:693-700.
- Singh EL, Eaglesome MD, Thomas FC, et al. 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 diarrhoea viruses. *Theriogenology* 1982;17:437-444.
- Singh EL, Hare WCD, Thomas, FC, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IV. NOntan smission of infectious bovine rhinotracheitis/ infectious pustular vulvovaginitis virus following trypsin treatment of exposed embryos. *Theriogenology* 1983;20:169-176.
- Singh EL, McVicar JW, Hare WCD, et al. 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* 1986;26:587-593.
- Singh EL, Thomas FC Papp-vid G, et al. 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* 1982;18:133-140.

- Singh EL, Thomas FC, Hare WCD, et al. Embryo transfer in disease control. *Theriogenology* 1982;17:108.
- Singh EL, Thomas FC, Hare WCD, et al. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. X. The in vivo exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology* 1987;27:451-457.
- Singh EL, Thomas FC. 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* 1987;27:443-449.
- Singh EL, Thomas FC. 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* 1987;28:691-697.
- Singh EL, Hare WCD. Embryo-pathogen interaction in relation to disease transmission. In: Morrow, DA ed. *Current therapy in Theriogenology*. W. B Sanders Co, 1986;84-87.
- Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology* 1987;27:9-20.
- Stringfellow DA, Riddell KP, Galik PK, et al. Quality controls for bovine viral diarrhoea virus-free IVF embryos. *Theriogenology*. 2000;53:827-839.
- Stringfellow DA, Scanlan CM, Brown RR, et al. Culture of bovine embryos after in vitro exposure to *Brucella abortus*. *Theriogenology* 1984;21:1005-1012.
- Stringfellow DA, Wolfe DF, Lauerman LH, et al. Resistance of preimplantation bovine embryos to infection with *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1986;47:1924-1927.
- Stringfellow DA. Recommendations for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In: Stringfellow DA, Seidel SM (eds), *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy IL: IETS, 1998;79-84.
- Thomson MS, Stringfellow DA, Lauerman LH. In vitro exposure of preimplantation bovine embryos to *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 1987;27:287.
- Vanroose G, Nauwynck H, Van Soom A, et al. Use of monoclonal antibodies to prevent the bovine herpesvirus-1-induced inhibition of sperm-zona pellucida binding. *Theriogenology*. 2000;52:322
- Wrathall AE, Mengeling WL. Effect of porcine parvovirus on development of fertilized pig eggs in vitro. *Br Vet J* 1979;135:249-254.
- Wrathall AE, Mengeling WL. Effects of transferring parvovirus-infected fertilized pig eggs into seronegative gilts. *Br Vet J* 1979;135:255-261.