

42. Jahrestagung

**Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder (AET-d)**

www.aet-d.de



18./19. Juni 2015

**im Leibniz-Institut für Nutztierbiologie
(FBN) Dummerstorf bei Rostock**

Programm

**Veranstaltungsort:
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie Dummerstorf, Tagungszentrum**

Donnerstag, 18. Juni 2015

- 10:00 – 12:00 Uhr** **Praktikerseminar**
Leitung: Hans-Peter Nohner, Jan Detterer

Überarbeitung der ADR-Richtlinien zum Embryotransfer
- 12:00 Uhr** **Registrierung und Willkommen – kleiner Imbiss**
- 13:00 Uhr** **Begrüßung**
Frank Becker
1. Sprecher AET-d
- 13:10 - 13:25 Uhr** **Eröffnung**
Manfred Schwerin
Vorstand FBN
- 13:25 - 13:35 Uhr** **Eröffnung**
Claudia Wesenauer
RinderAllianz GmbH, Woldegk
- 13:35 – 15:00 Uhr** **Sektion 1 – Reproduktionsphysiologie**
Leitung: Frank Becker
- 13:35 – 14:05 Uhr** **Das Testherdenprojekt der RinderAllianz - Basis für die 12**
Forschung zur Gesunderhaltung der Milchkuh
A. Boldt, B. Rudolphi, A. Römer
LFA Dummerstorf
- 14:05 -14:35 Uhr** **Fatty Pig breeds – eine reproduktionsphysiologische 14**
Übersicht
K.-P. Brüssow, I. Egerszegi, P. Garcia Casado, J. Rátky
FBN Dummerstorf, ÁTK Herceghalom, Ungarn, Zoitech-Labs Madrid,
Spanien
- 14:35 -15:00 Uhr** **Bovine embryo defense mechanism against culture 16**
induced oxidative stress condition
D. Tesfaye, M. Hölker, K. Schellander
University of Bonn
- 15:00 - 15:45 Uhr** **Kaffeepause und Industrieausstellung**

15:45 – 17:00 Uhr	Sektion 2 - IVM, IVF und Konservierung von Embryonen Leitung: Knut Roschlau	
15:45 -16:00 Uhr	Practical implications in the bovine IVF laboratory – Factors determining success L. Strøbech and B. Avery EmbryoTrans Biotech Køge, Denmark	17
16:00 – 16:15 Uhr	Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative zur Kryokonservierung - Erste Ergebnisse - N. Blad-Stahl, F. Sechser, D. Weiß, Chr. Wrenzycki Justus-Liebig-Universität Gießen	18
16:15 – 16:30 Uhr	Einfluss eines Koffeinzusatzes vor in vitro-Reifung auf die Entwicklungsfähigkeit boviner Oozyten S.M. Bernal, J. Heinzmann, D. Herrmann, U. Baulain, K.G. Hadel, P. Aldag, A. Lucas-Hahn, H. Niemann FLI Mariensee, Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A-, Bogotá, Colombia	20
16:30 – 16.45 Uhr	Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die frühe embryonale Entwicklung des Rindes in vitro J. Stöhr, H. Grothmann, Chr. Wrenzycki Justus-Liebig-Universität Gießen	22
16:45 – 17:00 Uhr	Vitrifikation von in vitro produzierten, geteilten und bioptierten Rinderembryonen M.N. Saucedo, M. Reichenbach, E. Wolf, H.-D. Reichenbach, Ludwig-Maximilian Universität München, Bayern-Genetik GmbH Grub, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Grub	24
17:30 – 19:00 Uhr	Rundgang im FBN Dummerstorf	
ab 19:15 Uhr	Abendveranstaltung in Dummerstorf	

Freitag, 19. Juni 2015

- 08:30 – 10:15 Uhr** **Sektion 3 - Besamung und Embryonenentwicklung**
Leitung: Martin Gehring
- 08:30 – 08:50 Uhr **Ein Update zum Einsatz von x-sortiertem Sperma – Bei der Besamung und beim Embryotransfer** 27
J. Detterer und M. Gehring
VOSt Südbrookmerland, Marsberg
- 08:50 – 09:05 Uhr **Befruchtungsraten und Embryonalentwicklung nach terminorientierter KB mit reduzierten Spermienzahlen im Vergleich zu Besamungen mit gesextem Sperma bei normozyklischen und superovulierten Rindern** 29
F. Becker, S. Lacaze, M. Mikkola, D. Rath
FBN Dummerstorf, MIDATEST Frankreich, FABA co-op Finnland, FLI Mariensee
- 09:05 – 09:20 Uhr **Anwendung des ET im Bereich der RinderAllianz** 30
H. Reimer
RinderAllianz GmbH
- 09:20 - 09:35 Uhr **Untersuchungen zur Spermien-induzierten Bildung von "Neutrophil Extracellular Traps (NETs)" beim Rind** 31
T. Fichtner, F. Sechser, T. Muñoz-Caro, C. Hermosilla, Chr. Wrenzycki, A. Taubert
Justus-Liebig-Universität Gießen
- 09:35 – 09:50 Uhr **Mechanisms of spontaneous embryo resorption** 33
L.E. Flores Landaverde, U. Drews, A. Kuehl, T.B. Hildebrandt, B. Drews
IZW Berlin
- 09:50 – 10:10 Uhr **Dummerstorfer auf hohe Fruchtbarkeit gezüchtete Mausmodelle: alternative Phänotypen für das Selektionskriterium 'hohe Fruchtbarkeit'** 34
J.M. Weitzel, M. Michaelis, A. Sobczak, M. Langhammer, N. Reinsch, J. Schön
FBN Dummerstorf
- 10:10 – 11:00 Uhr** **Kaffeepause und Industrieausstellung**
- 11:00 -12:45 Uhr** **Sektion 4 – Follikelwachstum und embryomaternale Interaktion**
Leitung: Christine Wrenzycki
- 11:00 – 11:15 Uhr **Auswirkungen von Hitzestress auf die Follikelfunktion von Milchkühen** 35
J. Vanselow, A. Vernunft, B. Kuhla, D. Koczan, M. Spitschak
FBN Dummerstorf, Universität Rostock

11:15 – 11:30 Uhr	Fertilitätsrelevante Effekte der Zerstörung dominanter Follikel beim Rind J. Schneebeili, Summaprada, Schweiz	37
11:30 – 11:45 Uhr	Anti-Müller-Hormon (AMH) Konzentrationen im Plasma von HF-Färsen als prognostischer Parameter für den Erfolg von Eizellgewinnung und Embryonenerzeugung A. Vernunft, M. Schwerhoff, T. Viergutz, M. Diederich, A. Kuwer FBN Dummerstorf, Masterrind GmbH, Verden	38
11:45 – 12:00 Uhr	Experimenteller Transfer von IVF Rinderembryonen im 32-Zellstadium. Einfluss der Entwicklungsumgebung auf Entwicklungsraten und Kryotauglichkeit M. Hölker, E. Held, D. Salilew-Wondim, F. Rings, K. Schellander und D. Tesfaye Universität Bonn	40
12:00 – 12:15 Uhr	Genomische Selektion: Embryobiopsie in der täglichen Routine M. Diederich, D. Roschlau, A. Kuwer, K. Roschlau Masterrind GmbH, ET-Station Nüchel	42
12:15 – 12:30 Uhr	Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen während der In-vitro-Maturation boviner Oozyten C. Blaschka, H. Grothmann, Chr. Wrenzycki Justus-Liebig-Universität Gießen	43
12:30 – 12:45 Uhr	Sind exfoliativ-zytologische Befunde der Gebärmutter beim Rind abhängig vom Entnahmeort? J. Egberts, J. Detterer, A. Park, S. Meinecke-Tillmann TiHo Hannover, Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland	45
12:45 – 13:00 Uhr	Präsentation Sponsor	
13:00 – 13:30 Uhr	Allgemeine Diskussion zur weiteren Gestaltung der AET-d Wahl des neuen 2. Sprechers der AET-d Leitung: F. Becker, H.-P. Nohner	
13:30 Uhr	Verabschiedung - Einladung zur 43. Jahrestagung AET-d und kleiner Imbiss	

Wir bedanken uns bei unseren Sponsoren für die finanzielle Unterstützung unserer Tagung.

Ganz besonders möchten wir uns beim Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf für die großzügige organisatorische und finanzielle Unterstützung unserer 42. Jahrestagung bedanken.



Silbersponsoren 2015



Bronzesponsoren 2015



Weitere Sponsoren 2015

Pharmanovo



Sponsorenadressen

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN)

Wilhelm-Stahl-Allee 2
18196 Dummerstorf
www.fbn-dummerstorf.de

SILBERSPONSOREN

Calier Deutschland GmbH

Balsenstraße 2
27472 Cuxhaven
www.calier.de

Consarctic GmbH

Postfach 1133
63821 Schöllkrippen
www.consarctic.de

IMV Technologies

Rue Clemenceau
Postfach 61300
L'Aigle, France
www.imv-technologies.com

RinderAllianz GmbH

Am Bullenberg 1
17348 Woldegk
www.rinderallianz.de

BRONZESPONSOREN

Bodinco B.V.

Hofdijkstraat 2
1814 EC Alkmaar
The Netherlands
www.bodinco.nl

RMP Medizinische Produkte

Eyber Straße 74
1522 Ansbach-Eyb
www.rmp-med-produkte.de

Labotect

Labor-Technik-Göttingen
Kampweg 12
37124 Rosdorf
www.labotect.com

MINITÜB GmbH

Hauptstraße 41
84184 Tiefenbach
www.minitube.de

Vetoquinol GmbH

Parkstraße 10
88212 Ravensburg
www.vetoquinol.de

WEITERE SPONSOREN

Pharmanovo GmbH

Sudetenstraße 19
30559 Hannover
info@pharmanovo.de

Embryotrans Biotech ApS

Nyvej 16B
DK-1851 Frederiksberg, Denmark
www.etbiotech.com

Zusammenfassungen der Vorträge

Das Testherdenprojekt der RinderAllianz - Basis für die Forschung zur Gesunderhaltung der Milchkuh

BOLDT A.,¹ RUDOLPHI B.,¹ RÖMER A.¹

¹*Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei
Mecklenburg-Vorpommern, Institut für Tierproduktion, 18196 Dummerstorf*

Mit dem Ziel, gesunde und langlebige Kühe für die Milchproduktion zu züchten, startete die Rinder Allianz im Jahr 2005 das ProFit Testherdenprojekt. Um dieses Ziel zu erreichen, war und ist es von Bedeutung, Zuchtwerte von Bullen für Fitness auf eine fundierte Datenbasis zu stellen. Dementsprechend lag der Fokus nicht auf sekundären, schon bestehenden Gesundheitsmerkmalen, wie z.B. die Zellzahl oder das Exterieur, sondern praxisbezogene Gesundheitsdaten aus den Milchviehbetrieben zu nutzen, um zusätzliche funktionale Merkmale für die genetische Selektion zu erhalten. Anhand dieser Gesundheitsdaten soll ein direkter Bezug zwischen Prävalenz einer Erkrankung und der Abstammung des Tieres hergestellt werden, wie z.B. die Mastitisanfälligkeit von Töchtern eines Bullen. Das Testherdenprojekt umfasst insgesamt 30 Betriebe mit durchschnittlich 928 Milchkuhen und einer Milchleistung von 10.373 kg/Kuh im Jahr 2014. Der kleinste Betrieb hält 245 Kühe und der größte Betrieb 2.962 Kühe. Die Besonderheit dieser 30 Betriebe liegt in der guten Dokumentation und genaueren Datenerfassung von Erkrankungen, Kalbungen, Besamungen, Trächtigkeitsuntersuchungen, Melkbarkeit, Abgangsursachen, Geburtsgewichten von Kälbern und Gewichten von Jungrindern zum Zeitpunkt der Besamung. Die Sicherung und Aufbereitung der Daten erfolgt beim VIT Verden. Die Datenanalyse liegt zum einen in der Hand der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei MV (LFA MV), was physiologische Auswertungen betrifft und zum anderen in der Hand der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und dem VIT Verden, wo die Auswertungen auf genetischer Ebene erfolgen. Über die Jahre konnten an der LFA MV zahlreiche und z.T. wegweisende Ergebnisse anhand des Datenmaterials der Testherden ermittelt werden. So konnte innerhalb einer Auswertung anhand von 15.541 abgegangenen Kühen im Zeitraum 10/2008 bis 09/2010 festgestellt werden, dass hohe Milchleistungen und eine lange Nutzungsdauer nicht im Widerspruch stehen, sondern Hochleistung und lange Nutzung auf einem hohen Niveau kombinierbar sind und in beachtenswerten effektiven Lebensleistungen resultieren. Kühe in Betrieben mit dem höchsten Leistungsniveau (Jahresmilchmenge > 10.400 kg) erreichten in 35,7 Monaten eine Lebensleistung von 32.732 kg und damit 17,4 kg Milch je Lebenstag. Im Vergleich zum niedrigsten Leistungsniveau (< 9.600 kg Jahresmilchmenge) hatten die Kühe in den Hochleistungsbetrieben eine um 5,1 Monate längere Nutzungsdauer, eine um 9.621 höhere Lebensleistung und eine um 4,1 kg höhere Lebenstageeffektivität. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit steigender Milchleistung Fruchtbarkeitsmerkmale wie ZKZ, Besamungsaufwand und Erstbesamungserfolg sich signifikant erhöhen. Anhand des Laktationsverlaufes für Jungkühe mit unterschiedlichen ZKZ konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch die Fruchtbarkeit bzw. die Trächtigkeit die Milchleistung beeinflusst. Zur ersten MLP zeigte sich nur eine geringe Differenz von 1,6 kg Milch/Tag zwischen Kühen mit ZKZ ≤ 370 Tagen und > 460 Tagen, diese erhöhte sich bis zum 300. Laktationstag auf 5,6 kg pro Tag. Kühe mit kurzer ZKZ können daher ihr Milchleistungspotential nur begrenzt ausschöpfen. Daraus resultiert auch das Ergebnis, dass mit steigenden Zwischenkalbeintervallen höhere Lebensleistungen und eine längere Nutzungsdauer

zu beobachten sind. Innerhalb einer monetären Auswertung zeigte sich, dass verlängerte ZKZ nicht zwangsläufig zu wirtschaftlichen Einbußen führen müssen, sondern im Gegenteil- mit höheren Lebensstagsleistungen eine Verbesserung des Deckungsbeitrags zu erkennen ist, selbst wenn die Kühe mehr Zeit benötigen, um wieder tragend zu werden.

Fatty Pig breeds – eine reproduktionsphysiologische Übersicht

BRÜSSOW K.P.,¹ EGERSZEGI I.,² CASADO, P.G.³, RÁTKY J.²

¹Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, ²Forschungsinstitut für Tierzucht, Tierernährung und Fleischwissenschaften (ÁTK) Herceghalom, Ungarn, ³Zoitech-Labs Madrid, Spanien

Die meisten 'Fatty Pig' Rassen sind alte Schweinerassen, die besonders an ihre regional-typischen Umwelt- und Haltungsbedingungen adaptiert sind. Obwohl deren Fleischprodukte traditionell und vorrangig regional genutzt werden, ist die Anzahl der Zuchttiere gering und sie haben es schwer, mit den modernen Rassen zu konkurrieren; u.a. sind die Fruchtbarkeitsleistungen der Fatty Pigs gering. Bislang existieren jedoch nur eingeschränkt reproduktive Forschungsergebnisse zu diesen Rassen.

Im Jahr 1996 war die Rasse der Ungarischen Mangalica extrem gefährdet und die Anzahl der Zuchtsauen war auf einem Tiefpunkt. Es existierten nur noch 170 Blonde, 18 Schwalbenbüchige und 20 Rote Mangalica. Es wurde deshalb ein Ungarisch-Deutsches Forschungsprojekt ins Leben gerufen, das das Ziel hatte, die Mangalica mittels biotechnischer Methoden zu vermehren und physiologische Ursachen der geringeren Fruchtbarkeit zu untersuchen. Mittels adaptierter Systeme zur Zyklussteuerung und Embryotransfer konnte der Mangalica-Bestand des Institutes als Nukleusherde für die Zucht installiert werden. Insgesamt wurden 202 Mangalica-Ferkel nach ET geboren. Weiterführende Arbeiten waren auf Follikel, Oozyten und Embryonen, auf die Uterusentwicklung in der Trächtigkeit und die Endokrinologie des Sexualzyklus ausgerichtet.

Auf der Grundlage von neueren Untersuchungen bei Sauen der Rassen Iberico und Mangalica sollen einige verfügbare Ergebnisse hinsichtlich der Ovarreaktion, der Entwicklung von Oozyten und Embryonen, zur Morphometrie des Genitaltraktes sowie zur Endokrinologie des Sexualzyklus dargestellt werden.

Im Vergleich zu modernen Schweinerassen (z.B. Landrasse, Large White) weisen Iberico und Mangalica eine geringere Anzahl von Ovulationen auf und die Ovarreaktion kann auch nur moderat mit exogenen Gonadotropinen stimuliert werden. Die (intrafollikuläre) Oozytenreifung ist verändert und es gibt Unterschiede im präovulatorischen Follikelwachstum, der Ovulationseffizienz und schlussendlich in der Entwicklungskompetenz von Oozyten und Embryonen. All diese Ereignisse können entscheidend für die verringerte Fruchtbarkeit bei den Fettschweinerassen sein.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass ein eingeschränktes Uteruswachstum insbesondere in der frühen Trächtigkeit vorhanden ist. Demzufolge kann die Fruchtbarkeit ursächlich negativ beeinflussen sein.

Ogleich sich die Freisetzungsmuster für Gonadotropine und Steroide bei Iberico und Mangalica nicht generell von denen 'moderner' Rassen unterscheiden, gibt es wesentliche Unterschiede. Es erfolgt ein früherer präovulatorischer Estradiol-Anstieg; die pulsatile LH-Ausschüttung während der Lutealphase des Zyklus fehlt bzw. ist unterdrückt und die Konzentrationen von Estradiol (29.6 ± 6.8 vs. 16.9 ± 9.7 pg/ml) und Progesteron (2020.4 ± 105.6 vs. 386.2 ± 113.7 ng/ml) in der Follikelflüssigkeit sind 2- bzw. 5-fach höher als bei der Landrasse.

Obwohl die Gelbkörperanzahl bei den Mangalica signifikant geringer ist (9.7 ± 2.3 vs. 20.5 ± 4.4), sind die Progesteron-Konzentrationen in der Ovar-nahen Zirkulation

dreifach höher (8.7 ± 0.7 vs. 2.8 ± 0.2 ng/ml). Die Leptin-Konzentrationen sind bei den Mangalica ebenso (vierfach) erhöht (11.3 ± 0.6 vs. 3.0 ± 0.1 ng/ml).

Zusammengefasst: obwohl reproduktive Forschungsergebnisse bei den 'Fatty Pigs' nur unzureichend vorliegen, konnte anhand der ermittelten Daten von Iberico und Mangalica aufgezeigt werden, dass sich diese Rassen hinsichtlich der Ovarreaktion, der Entwicklungskompetenz von Oozyten und Embryonen, der Uterusentwicklung und der Ausschüttung von Reproduktionshormonen wesentlich von 'modernen' Rassen unterscheiden. Diese Unterschiede können als 'kritisch' hinsichtlich der geringeren Fruchtbarkeit bei Fatty Pig-Rassen (Iberico, Mangalica) angesehen werden.

Die unzureichend vorhandenen reproduktionsphysiologischen Daten (auch bei anderen Fettschweinerassen) sollten daher eine zukünftige Herausforderung für wissenschaftliche Untersuchungen sein.

Bovine embryo defense mechanism against culture induced oxidative stress condition

TESFAYE D., HÖLKER M., SCHELLANDER K.

Institute of Animal Sciences, University of Bonn, Germany

Overcoming oxidative stress is one of the various challenges to survive under suboptimal conditions during in vitro production of bovine embryos. Despite significant developments in in vitro production of mammalian embryos, those embryos differ from their in vivo counterparts in various aspects attributed to differences between the two systems in terms of media components, pH and oxygen level. Any variation in these components from the optimal condition will result in stress for embryos as manifested by the accumulation of reactive oxygen species (ROS). The imbalance between intracellular ROS concentration and the scavenging ability of cells through antioxidants leads to the state of oxidative stress. Thus, embryo protection mechanisms against oxidative stress are one of the key elements in improving embryo survival under in vitro conditions. Efforts have been done to identify the specific stage of bovine embryo development which is sensitive to culture environment by performing an alternate culture of preimplantation embryos in vitro or in vivo with the help of nonsurgical endoscopic transfer and flushing of early stage bovine embryos. In a recent study conducted in our lab NRF2 mediated oxidative stress response pathway was identified as one of the major pathways identified comprising differentially expressed genes between blastocysts derived from the alternate culture during preimplantation period. Subsequent studies also evidenced that bovine embryos survival under suboptimal environmental conditions depends on their ability to activate their NRF2 mediated oxidative stress response pathway. Moreover, clear evidences were found between embryos NRF2 activity and mitochondrial activity and lipid metabolism. Future researches are focusing on the regulatory mechanism of this defense pathway and the potential of modulating embryos oxidative stress defense mechanisms to improve their survival under suboptimal environmental conditions.

Practical implications in the bovine IVF laboratory – Factors determining success

STRØBECH L. and AVERY B.

EmbryoTrans Biotech Køge, Denmark

Livestock production of cattle has been optimized with reproductive technologies for decades and artificial insemination (AI) has existed for over half a century, Embryo Transfer (ET) soon 20 years as an established method for cattle reproduction.

Over the past years, in vitro production (IVP) of bovine embryos has been implemented for commercial use in cattle breeding in many countries, hence increasing the focus on optimizing the yield of blastocysts.

The developmental rates and gene expression of IVP blastocysts are affected by many factors. However, the starting point, the gametes, i.e. the quality of oocytes and semen is obviously affecting the outcome. Furthermore, the subsequent procedures such as the IVF protocol, CO₂/O₂ gas conditions, temperature, amount of handling time outside the incubator, the plastic ware as well as the skills of staff are important factors in order to succeed. Finally, the use of different IVP media systems has an influence on blastocyst rates, morphology, kinetics and gene expression.

For many years nearly identical, home-made media compositions based on commercially available stock solutions have been used for bovine in vitro embryo production. With the increasing production of bovine IVP embryos commercial media are becoming available, and an increased focus on regulatory restrictions on import/export of embryos cultured in media containing serum as well as the increased risk of spreading pathogens has enlarged the wish to supplement the IVP media with bovine serum albumin (BSA) and synthetic serum replacements

More studies should be conducted to investigate the consequences and correlation to healthy live born offspring from the in vitro produced embryo quality in terms of IVP media systems as well as different laboratory procedures which influence- embryo development.

REFERENCES

- In vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. Avery B, Strøbech L, Jacobsen T, Bøgh IB, Greve T. *Theriogenology*. 2003 Feb;59(3-4):987-99.
- Development of viable mammalian embryos in vitro: Evolution of sequential media. Gardner DK, Lane M, Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD, eds. *Principles of Cloning*. New York, Academic Press. 2002;187-213.
- Re-evaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation (SPOM) system, Gilchrist RB, Zeng HT, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson JG. Received: March 20, 2015; Accepted: March 20, 2015; Published Online: April 02, 2015 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.032> Publication stage: In Press Accepted Manuscript
- The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. Gopichandran N, Leese HJ. *Reproduction* 2006;131: 269-277.
- A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, Jeucken PH, Eijkemans MJ, Fauser BC. *Hum Reprod*. 2002 Oct;17(10):2700-5.
- New culture medium affects blastocyst development and gene expression levels in *in vitro* produced bovine embryos, Nielsen JMK, Wrenzycki C, Hyttel P, Poppicht F, Stroebech L. Abstract #: 234, The 41st IETS Annual Conference.
- Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media, Simon C, Quinn, P, Kime L, Ayres C, Tyler JPP, Driscoll, GL. *Fertility and Sterility*, Volume 78, Issue 6, December 2002, Pages 1254-1260.
- Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality, Swain, JE *RBMOnline* 2010 Jul;21(1):6-16
- Importance of reproductive biotechnology in cattle in Europe, Wrenzycki C, Stinshoff H. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2015 Apr 13;43(2):115-22. doi: 10.15653/TPG-140671. Epub 2015 Mar 27.

Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative zur Kryokonservierung - Erste Ergebnisse -

BLAD-STAHN N., SECHSER F., WEISS D., WRENYCKI Chr.

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit
Tierärztlicher Ambulanz, Molekulare Reproduktionsmedizin,
Justus-Liebig-Universität Gießen*

Eine der größten und vielversprechendsten Herausforderungen in der Rinderzucht seit Einführung der genomischen Zuchtwertschätzung mittels SNP-Typisierung ist die genomische Zuchtwertschätzung früher Embryonen. Für die Ermittlung des genomischen Zuchtwertes (gZW) anhand der DNA ist eine Biopsie des Embryos nötig. Die Zeit bis zur Bekanntgabe beträgt ca. sieben Tage. Während dieser Zeitspanne sollte der Embryo ohne Einbuße seiner Entwicklungsfähigkeit konserviert werden können. Zurzeit stehen als Möglichkeiten der Frischtransfer der bioptierten Embryonen auf Empfängertiere oder die Kryokonservierung zur Verfügung. Eine Alternative zur Aufbewahrung früher Embryonalstadien für einige Tage ohne Tiefgefrieren stellt die Flüssigkonservierung bei Temperaturen um 4°C dar. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zeigen, dass die 7-tägige Lagerung in vivo generierter Embryonen (nicht-bioptiert) zu ähnlichen Trächtigkeitsraten nach Transfer der Embryonen im Vergleich zu denen frischübertragener führt. Nach Transfer in vitro produzierter (IVP) Blastozysten, die für 1-2 Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurden, betrug die Trächtigkeitsrate an Tag 28 50,0% (9/18) und an Tag 45 44,4% (8/18; K. Roschlau, persönliche Mitteilung).

Ziel dieses Projektes ist es, ein praxistaugliches Verfahren der Flüssigkonservierung in vitro produzierter bioptierter boviner Embryonen zu entwickeln.

Für die In-vitro-Produktion (IVP) boviner Embryonen werden die Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) aus den Ovarien geschlachteter Kühe mittels der Slicing-Methode gewonnen. Nach einer Reifungsdauer von 24 Stunden werden die KOK in vitro fertilisiert und für sechs Tage im Inkubator kultiviert. An Tag 6 werden die Embryonen nach dem ITES-Standard beurteilt und die Teilungs- und Entwicklungsraten dokumentiert. Für die weiteren Versuche werden die zur Morulae entwickelten Embryonen verwendet. Mit dem Mikromanipulator wird mittels der Nadeltechnik die Zona pellucida perforiert und Zellen aus dem Embryo aspiriert. Nach der Biopsie werden die Embryonen für weitere 24 Stunden in den Brutschrank verbracht. Anschließend erfolgt die Konservierung.

Als Konservierungsmedium wird TCMair verwendet. Dem Konservierungsmedium wird Serum (FBS 25% und 50%), BSA (1 mg/ml und 10 mg/ml) oder Antifreeze-Protein Type III (1 mg/ml und 10 mg/ml) als Proteinquelle zugesetzt. Die Embryonen werden mit dem entsprechenden Medium in 250µl-Pailletten überführt und für 7 Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Als Kontrolle werden in den jeweiligen Medien nicht-bioptierte Embryonen auf die gleiche Weise gelagert. Zusätzlich wird eine Gruppe vollständig bis Tag acht im Inkubator belassen.

Untersuchungen zur Qualitätsbestimmung der Embryonen erfolgen morphologisch mittels unterschiedlicher Färbemethoden und auf molekularer Ebene zur Bestimmung entwicklungsrelevanter Gentranskripte mit Hilfe der RT-qPCR. Erste Ergebnisse der Lebend-Tod-Färbung zeigen folgende Resultate. Embryonen der Gruppe 25% FBS ohne (N=10) und mit (N=3) Biopsie wiesen ähnliche Zellzahlen auf (Gesamtzellzahl: 97,4±29,3 vs 96,3±5,2; lebende Zellen: 77,5±28,1 vs 81,7±4,1; tote

Zellen: $19,9 \pm 8,0$ vs $14,7 \pm 2,5$). Auch bei den Embryonen der Gruppe 50% FBS ohne (N=12) und mit (N=5) Biopsie konnte kein Unterschied nachgewiesen werden (Gesamtzellzahl: $102,3 \pm 31,2$ vs $76,0 \pm 9,4$; lebende Zellen: $85,7 \pm 27,5$ vs $63,6 \pm 13,1$; tote Zellen: $16,6 \pm 6,1$ vs $12,4 \pm 4,3$).

Diese ersten, vielversprechenden Ergebnisse lassen vermuten, dass die Flüssigkonservierung bei Temperaturen um 4°C eine Alternative zur Aufbewahrung früher Embryonalstadien für einige Tage ohne Tiefgefrieren darstellt.

Wir danken dem Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Einfluss eines Koffeinzusatzes vor *in vitro*-Reifung auf die Entwicklungsfähigkeit boviner Oozyten

BERNAL S.M.,^{1,2} HEINZMANN J.,¹ HERRMANN D.,¹ BAULAIN U.,¹ HADELER K.G.,¹
ALDAG P.,¹ LUCAS-HAHN A.,¹ NIEMANN H.¹

¹*Forschungsbereich Biotechnologie, Institut für Nutztiergenetik (FLI), Mariensee
31535 Neustadt*

²*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Ciencias Aplicadas y
Ambientales -U.D.C.A-, Bogotá, Colombia*

Obwohl die *in vitro* Oozytenreifung (IVM) eine gängige Praxis in der Rinderzucht ist, ist auch bekannt, dass die an der meiotischen Wiederaufnahme beteiligten Mechanismen in unphysiologischer Weise beginnen. Der zyklische AMP- (cAMP) Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Wiederaufnahme der Meiose. Wenn die Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) mechanisch aus dem Follikel gewonnen werden, verringert sich der cAMP-Spiegel in den unreifen KOK, was wiederum die Meiosefortsetzung bewirkt. Es wird vermutet, dass eine Modulation von cAMP in den KOK vor IVM die Blastozystenraten beim Rind *in vitro* erhöhen könnte. Koffein ist ein nicht-spezifischer kompetitiver Phosphodiesterase (PDE) -Inhibitor und hemmt die meiotische Wiederaufnahme der Oozyten durch Beeinflussung des cAMP-Spiegels. Es wurde berichtet, dass die Behandlung von Gameten mit Koffein das Entwicklungspotenzial erhöhen kann. Die vorliegende Studie untersuchte den Einfluss verschiedener Koffeinkonzentrationen in der Prä-IVM-Kultur auf die Entwicklungsraten von Blastozysten und deren Zellzahlen. Bovine Ovarien stammten von einem örtlichen Schlachthof. Kumulus-Oozyten-Komplexe wurden durch Slicing generiert. Insgesamt 3468 KOK wurden in den verschiedenen *in vitro* Behandlungen eingesetzt. Vier verschiedene Koffeinkonzentrationen wurden während des Slicings, Suchens und einer 2- stündigen Prä-IVM-Kultur verwendet: 1, 5, 10, 20 mM. Eine Kontrollgruppe mit 2-stündiger Prä-IVM-Kultur ohne Koffein (0 mM) und eine Standard-Kontrolle wurden ebenfalls mit geführt. Nach Prä-IVM wurden die Oozyten gewaschen und für 24 Stunden ohne Koffein *in vitro* gereift. Nach der Reifung wurden Oozyten und Spermien über 19h ko-kultiviert und die Zygoten *in vitro* 8 Tage kultiviert, um die Entwicklung bis zum Blastozystenstadium zu bewerten. Teilungs- und Blastozystenraten wurden ausgewertet. Expandierte Blastozysten aus allen Behandlungen wurden einer Differenzialfärbung unterzogen. ANOVA von R-Software wurde angewendet, um Unterschiede in Teilungsraten, Blastozystenanzahlen und Blastozystenanzahlzellen statistisch zu berechnen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 dargestellt. Teilungs- und Blastozystenraten sowie die Zellzahl (ICM, TE und Gesamtzahl) zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen *in vitro* Behandlungen. Diese vorläufigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Koffeinergänzung vor IVM keinen oder kaum Einfluss auf die spätere Embryoentwicklung und -qualität hat.

Tabelle 1. Entwicklungsraten boviner Embryonen nach Koffeinzusatz vor der *in vitro* Reifung.

Behandlung	Teilung (%)	Blastozysten (%)	ICM (n)	TE (n)	Gesamtzahl (n) der Zellen
Koffein 0mM	57.7±4.9	26.2±3.0	46.0±4.1	111.6±13.6	157.6±14.0
Koffein 1mM	56.5±3.8	14.9±2.8	43.2±3.7	115.4±7.8	158.6±6.9
Koffein 5mM	62.7±3.2	22.4±3.8	61.4±7.8	106.4±3.5	167.8±11.0
Koffein10mM	52.5±5.1	23.7±2.1	53.0±6.5	102.6±8.3	155.6±6.7
Koffein 20mM	54.4±6.0	21.4±4.1	49.4±5.6	118.4±14.6	167.8±12.6
Standard	60.3±2.3	26.6±2.4	50.0±4.4	119.6±11.7	169.6±11.6

Daten werden in Mittelwert ± SEM dargestellt, $p > 0,05$.

Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die frühe embryonale Entwicklung des Rindes in vitro

STÖHR J., GROTHMANN H., WRENZYCKI Chr.

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,
Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen*

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist eine farblose Flüssigkeit, die gut und schnell biologische Membranen penetriert. Daher wird DMSO gern als Lösungsvermittler in der Zell- und Embryonenkultur und als Gefrierschutzmittel eingesetzt. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Glasbildung wird DMSO hauptsächlich bei der Vitrifikation eingesetzt.

In vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass das Vorhandensein von DMSO während der In-vitro-Reifung ab einer Konzentration von 0,4% die weitere Entwicklungsfähigkeit boviner in vitro produzierter Embryonen negativ beeinflusst (Avery und Greve 2000). Die Supplementierung von 0,1% DMSO während der In-vitro-Kultivierung hatte keinen Einfluss auf die Teilungsraten, führte jedoch zu signifikant höheren Entwicklungsraten. Ebenso konnte ein Effekt auf das Expressionsmuster entwicklungsrelevanter Gentranskripte verzeichnet werden (Stinshoff et al., 2013). Die Vitrifikation ohne DMSO scheint keine Alternative zu sein, da bei Vitrifikation im DMSO-haltigen Medium die Anzahl überlebender Embryonen im Vergleich zur Vitrifikation ohne DMSO erhöht ist. Dennoch konnte auch hier beobachtet werden, dass die Embryonen, welche einer DMSO-Exposition ausgesetzt waren, eine reduzierte Qualität auf molekularer Ebene vorwiesen (Beuing 2013).

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Einfluss unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen im Kultivierungsmedium auf die embryonale Entwicklung in vitro zu klären.

Hierfür werden mit der Slicing-Methode Kumulus-Oozyten-Komplexe aus Schlachthof Ovarien gewonnen und für 24h gereift, anschließend in vitro fertilisiert und für 8 Tage in vitro kultiviert. Während der In-vitro-Kultivierung wird DMSO in folgenden Konzentrationen supplementiert: 0,05%, 0,1%, 0,15%, 0,2% und 0,25%. Anschließend erfolgt die Beurteilung der Qualität der Embryonen an Tag 8. Zunächst werden die Teilungs- und Entwicklungsraten der Embryonen in den verschiedenen Gruppen ermittelt. Die morphologische Qualität der Embryonen wird mit unterschiedlichen Färbemethoden dargestellt. Zum Nachweis der Lebend-Tot-Ratio werden expandierte Blastozysten einer Lebend- Tot- Färbung unterzogen.

Desweiteren wird zur Detektion des Apoptose-Indexes die TUNEL-Färbung angewandt. Die Analyse des ICM/Trophektoderm-Verhältnisses der embryonalen Zellen soll ebenfalls zur Untersuchung der zelltoxischen Wirkung des DMSO beitragen. Zusätzlich wird die intraembryonale Fettakkumulation mittels Red-Oil-Färbung detektiert, um festzustellen, ob das Vorhandensein von DMSO die Aufnahme von im Medium vorhandenen Lipiden beeinflusst.

Die molekulare Qualität der Embryonen wird ebenfalls an expandierten Blastozysten via RTq-PCR hinsichtlich Expression entwicklungsrelevanter Gentranskripte (PDHA1, PDHA2, ACAA1, ACAA2; FASN, STAR, CYP11A1, HSP1A1) bestimmt.

Die Teilungs- und Entwicklungsraten ergaben keine signifikanten Unterschiede bei den Embryonen der unterschiedlichen Gruppen (0%: 58,3%±10,6% und 28,4%±9,2%, 0,05%: 59,4%±11,5% und 26,1%±7,4%, 0,1%: 57,6%±6,6% und 21,7%±7,1%, 0,15%: 58,1%±7,8% und 27,8%±5,6%, 0,2%: 56,6%±7,3% und 24,5%±7%, 0,25%: 56,6%±10,9% und 23,5%±9,9% [p > 0,05]).

Bei der Ermittlung der Lebend-Tot-Ratio fiel auf, dass bei den Embryonen aus der Gruppe, die mit einem Zusatz von 0,1% DMSO kultiviert wurden, die Lebend-Tot-Ratio signifikant höher war (0% DMSO: 22,6%±13,5%, 0,05% DMSO: 23,4%±10,4%, 0,1% DMSO: 40,1%±23,1%, 0,15% DMSO: 24,2%±14,6%, 0,2% DMSO: 22,7%±14%, 0,25% DMSO: 20,3%±9,9% [$p \leq 0,05$]).

Die TUNEL-Färbung ergab eine signifikant niedrigere Anzahl an apoptotischen Zellen in den Embryonen der Gruppe mit der 0,1- und 0,2-prozentigen DMSO-Konzentration im Vergleich zu den Embryonen der Kontrollgruppe. Zusätzlich wiesen die Embryonen aus der 0,05 % DMSO-Gruppe eine geringere Anzahl an apoptotischen Zellen im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe auf ($p = 0,08$).

Der apoptotische Index wies ebenfalls einen niedrigeren Wert in den Embryonen der Gruppen, die mit 0,1% und 0,2% DMSO supplementiert wurden, im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ohne DMSO-Zusatz auf (0% DMSO: 3,8%±1,6%, 0,05% DMSO: 2,6%±1,6%, 0,1% DMSO: 2,3%±1,8%, 0,15% DMSO: 3,2%±1,5%, 0,2% DMSO: 2,2%±1,5%, 0,25% DMSO: 3,1%±1,7% [$p = 0,09$; $p = 0,06$]).

Die Ermittlung der intraembryonalen Fettakkumulation mittels Red-Oil-Färbung ergab eine signifikant höhere Fettakkumulation in den Embryonen, die mit 0,15% DMSO kultiviert wurden, im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe (0% DMSO: 6616,9 $\mu\text{m}^2 \pm 2703,0 \mu\text{m}^2$, 0,05% DMSO: 7346,3 $\mu\text{m}^2 \pm 1981,3 \mu\text{m}^2$, 0,1% DMSO: 6975,5 $\mu\text{m}^2 \pm 1847,9 \mu\text{m}^2$, 0,15% DMSO: 9301,1 $\mu\text{m}^2 \pm 1703,3 \mu\text{m}^2$, 0,2% DMSO: 8675,1 $\mu\text{m}^2 \pm 2271,4 \mu\text{m}^2$, 0,25% DMSO: 8300,7 $\mu\text{m}^2 \pm 2711,0 \mu\text{m}^2$ [$p \leq 0,05$]).

Die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass eine DMSO-Konzentration von 0,1% und 0,2% bei der In-vitro-Kultivierung die Qualität der Embryonen auf morphologischer Ebene beeinflusst.

Um den Einfluss des DMSOs auf die Differenzierung embryonaler Zellen zu ermitteln, wird zurzeit die Färbung von den Zellen der inneren Zellmasse und des Trophektoderms durchgeführt.

Desweiteren steht die RTq-PCR-Analyse hinsichtlich des Einflusses des DMSOs auf entwicklungsrelevante Gentranskripte und damit die molekulare Qualität der Embryonen noch aus.

Wir danken dem Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF) für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Vitrifikation von *in vitro* produzierten, geteilten und biopsierten Rinderembryonen

SAUCEDO M.N.,¹ REICHENBACH M.,² WOLF E.,¹ REICHENBACH H.D.³

¹Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Ludwig-Maximilian Universität, München

²Bayern-Genetik GmbH, Grub

³Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierzucht, Grub

Die Biopsie von Embryonen für die genomische Evaluation erfordert das Eröffnen der Zona pellucida. Diese wiederum stellt eine wichtige Schutzhülle u.a. beim Einfrieren dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung des Einflusses von Entwicklungsstadium auf die Ergebnisse der Vitrifikation von geteilten und biopsierten *in vitro* produzierten Embryonen. Parallel hierzu wurden Embryonen im Vergleich konventionell in 1,5 M Ethylenglykol (EG) tiefgefroren. Die *in vitro* Produktion der Embryonen erfolgte nach einem Standardprotokoll. Eizellen aus Ovarien geschlachteter Rinder wurden nach 23 h Maturation in MPM, angereichert mit 0,025 U/ml FSH, 0,0125 U/ml LH und 5% OCS, mit Spermia nach Swim-up befruchtet. Die vermeintlichen Zygoten wurden vortexiert und für 6-7 Tage in 400 µl SOF (5% OCS, 40 µl BME und 10 µl BME) unter Öl kultiviert. Teilung und Biopsie erfolgten unter Stereomikroskop mit einem Mikroskalpell (Morulae, n=93; Frühe Blastozysten, n=122; Blastozysten, n=147) (Abb.1, A). Im ersten Versuch wurden die Embryonen vitrifiziert. Im zweiten Versuch wurden die Embryonen (n=22) geteilt und jeweils eine Hälfte vitrifiziert und die andere Hälfte konventionell tiefgefroren. Im dritten Versuch wurden die Embryonen am Trophoblasten biopsiert (Abb.1, B) und unmittelbar danach (n=29), 3 h (n=29) oder 24 h (n=29) später konventionell tiefgefroren. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte (n=27) Embryonen.

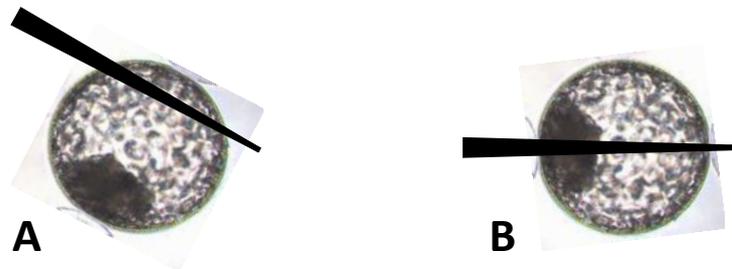


Abbildung 1: Biopsie *in vitro* produzierter Embryonen. A) Biopsie; B) Splitting

Die Vitrifikation der Embryonen erfolgte nach dem Verfahren von CryoLogic (CVM), CryoLogic® Australia (Saucedo et al., AETd Tagung 2014). Das konventionelle Einfrieren von geteilten und biopsierten Embryonen erfolgte in 1,5 M EG bei 0,5°C/min bis -28°C und anschließender Lagerung in LN₂. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 26°C. Die aufgetauten Embryonen wurden in SOF für 24 h kultiviert. Die Reexpansionsrate wurde 4 bzw. 24 h nach dem Auftauen beurteilt.

Nach Vitrifikation wurden mit Morulae, frühe Blastozysten und Blastozysten Reexpansionsraten von 59,0; 67,2 und 90,0% erreicht (Abb. 2).

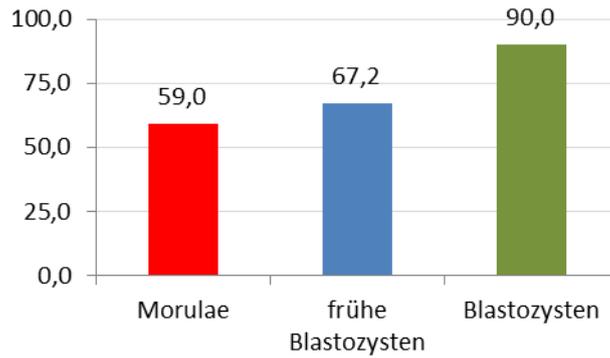


Abbildung 2: Überlebensraten von Demi-Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium. (P=0.057; Kruskal-Wallis Test).

Im zweiten Versuch wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Vitrifikation und des konventionellen Einfrierens mit Embryohälften beobachtet (Abb. 3).

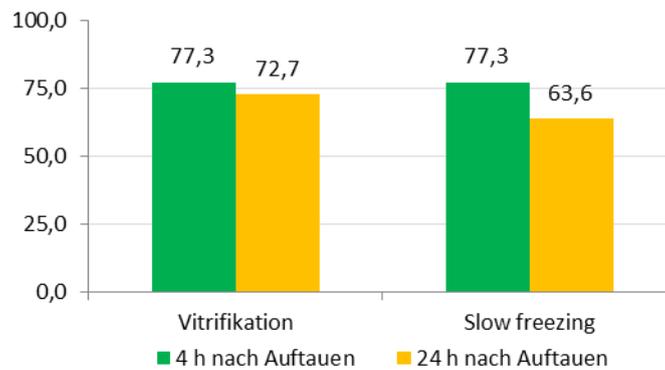


Abbildung 3: Reexpansionsraten nach Vitrifikation oder konventionellen Einfrieren von Embryo-Hälften

Der beste Zeitpunkt für das Einfrieren der Embryonen lag bei ca. 3 h nach Biopsie (Abb. 4).

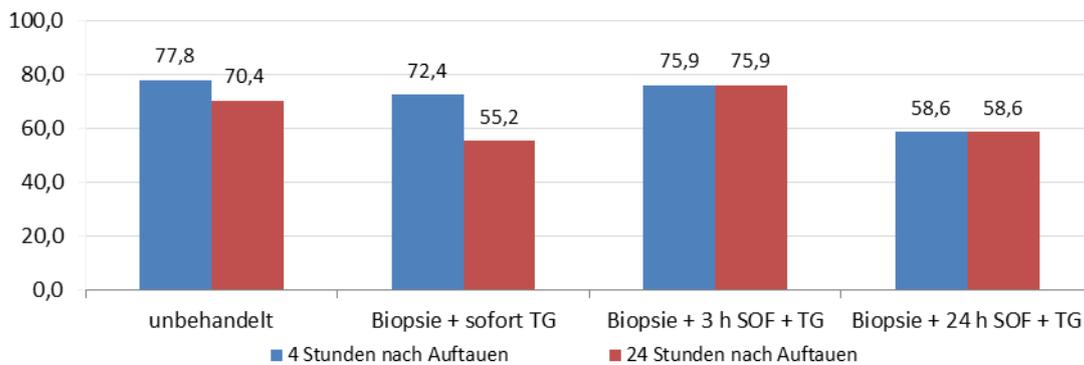


Abbildung 4: Weiterentwicklungsraten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Einfrierens nach Embryo-Biopsie

Die Ergebnisse zeigen, dass gute Ergebnisse sowohl bei der Vitrifikation als auch beim konventionellen Einfrieren von in vitro produzierten, geteilten und biopsierten Embryonen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium und der Qualität erreicht werden können.

Gefördert durch die Bayer. Forschungstiftung (AZ 1031-12; DOK-153-12).

Ein Update zum Einsatz von x-sortiertem Sperma - Bei der Besamung und beim Embryotransfer

DETTNERER J.¹ und GEHRING M.²

¹Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland

²Tierärztliche Gemeinschaftspraxis Dr. Hoffmeister, Gehring & Partner, Marsberg

Seit Herbst 2007 wird im Gebiet des Vereins Ostfriesischer Stammviehzüchter (VOST) X-sortiertes Sperma bei der Besamung eingesetzt. Die zunächst geringere Akzeptanz war in erster Linie mit den schlechteren Konzeptionsraten gegenüber unsortiertem Sperma zu begründen. Eine kontinuierliche Verbesserung bei den Befruchtungsraten hat inzwischen zu einer weiten Verbreitung des Einsatzes von sortiertem Sperma geführt. So werden ca. 10% aller Erstbesamungen mit x-sortiertem Sperma durchgeführt.

Die im Gebiet des VOST eingesetzten Portionen werden zum größten Teil im Labor von ST-Germany in Cloppenburg produziert. Dort erfolgte ab Herbst 2013 die Umstellung auf das Verfahren „SexedULTRA™“, was in erster Linie auf einer Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte des flowzytometrischen Trennverfahrens beruht (Konstanter Temperatur-verlauf, sofortige Standardisierung der pH-Werte und Konzentration der gewonnenen Ejakulate, Verminderung des oxidativen Stresses). In einem Besamungsversuch mit SexedULTRA™ bei der Rinderzucht Schleswig-Holstein konnten erstmals mit konventionellem Sperma vergleichbare Konzeptionsraten erzielt werden.

Erfahrungen beim ET im Gebiet der Besamungs- und ET-Station Georgsheil:

Im letzten Jahr konnten wir die ersten vielversprechenden Ergebnisse beim Einsatz von x-sortiertem Sperma bei superovulierten Holsteinkühen vorstellen. Allerdings lagen damals nur die Daten von 13 Spülungen vor.

Inzwischen können wir über 31 Embryonengewinnungen nach Besamung mit x-sortiertem Sperma berichten, die im Zeitraum vom 26.11.2013 bis zum 20.05.2015 im Gebiet des VOST durchgeführt wurden. Zum Vergleich dienten 113 Embryonengewinnungen bei abgekalbten Kühen im selben Zeitraum, die mit konventionellen Portionen besamt wurden.

Die mit x-sortierten Portionen besamten Kühe hatten durchschnittlich $4,0 \pm 1,9$ Laktationen und am Tag der Spülung eine durchschnittliche Rastzeit von 272 ± 190 Tagen. In der Gruppe mit den konventionellen Portionen lagen diese Werte bei ebenfalls $4,0 \pm 1,9$ Laktationen und bei 245 ± 197 Tagen Rastzeit.

In der Gruppe mit sortiertem Sperma kamen Portionen mit 8 Millionen Samenzellen pro Dosis von 12 verschiedenen Bullen zum Einsatz. Die Portionen wurden im Labor von ST-Germany in Cloppenburg hergestellt. Bei der ET-Besamung wurden 2 Besamungen im Abstand von 12 Stunden mit je einer Portion mit 8 Millionen x-sortierten Samenzellen durchgeführt.

Bei 31 Spülungen mit sortiertem Sperma konnten 286 Embryonen/Eizellen ($\bar{9},2 \pm 6,5$) gewonnen werden; davon waren 25 Embryonen degeneriert (8,7%) und 79 Eizellen unbefruchtet (27,6%). 182 Embryonen ($\bar{5},9 \pm 5,0$) waren transfertauglich, was einem Prozentsatz von 63,7% transfertauglicher Embryonen pro Spülung entspricht.

Bei den im selben Zeitraum nach Besamung mit konventionellen Sperma (2 x 15 Mio. Samenzellen; 64 verschiedene Bullen) gespülten Kühen wurden 892 Embryonen/Eizellen (\bar{x} 7,9 \pm 6,0) gewonnen; davon waren 87 Embryonen degeneriert (9,8%) und 269 Eizellen unbefruchtet (30,1%). 536 Embryonen (\bar{x} 4,7 \pm 4,4) waren transfertauglich, was einem Prozentsatz von 60,1% transfertauglicher Embryonen pro Spülung entspricht.

Ein Vergleich der Embryoqualitäten (Beurteilung nach IETS) ergab bei den Spülungen mit gesextem Sperma 79,4% Klasse 1 Embryonen, 13,7% Klasse 2 und 4,9% Klasse 3. Bei den Spülungen mit konventionellen Portionen waren es 72,2% Klasse 1, 19,4% Klasse 2 und 7,4% Klasse 3 Embryonen.

Erfahrungen beim ET im Gebiet der tierärztlichen Gemeinschaftspraxis Dr. Hoffmeister, Gehring & Partner:

Vom 1.1. 2013 bis zum 20.5.15 wurden bei 19 Holsteinkühen nach Besamung mit sortiertem Sperma (überwiegend Portionen mit 2,1 Millionen Samenzellen) im Durchschnitt 4,9 transfertaugliche Embryonen gewonnen, was einem Anteil von 36,4% an allen gewonnen Embryonen/Eizellen entspricht. Im selben Zeitraum konnten bei 134 konventionell besamten Kühen 6,5 transfertaugliche Embryonen gewonnen werden (Anteil von 64,4%). Der Anteil an Embryonengewinnungen ohne transfertaugliche Embryonen lag nach Besamungen mit sortierten Portionen bei 26,3%, bei den konventionell besamten Spendertieren dagegen nur bei 17,2%.

Beim Einsatz von sortierten Portionen mit 2,1 Millionen Samenzellen sind Einbußen bei der Anzahl transfertauglicher Embryonen zu verzeichnen.

Werden aber Portionen mit einer Konzentration von 8 Millionen Samenzellen pro Dosis verwendet, können ET-Ergebnisse erreicht werden, die mit Embryonengewinnungen nach Besamung mit konventionellem Sperma vergleichbar sind.

Eine noch größere Bullenauswahl ist aber für eine stärkere Verbreitung notwendig!

Befruchtungsraten und Embryonalentwicklung nach terminorientierter KB mit reduzierten Spermienzahlen im Vergleich zu Besamungen mit gesextem Sperma bei normozyklischen und superovulierten Rindern

BECKER F.,¹ LACAZE S.,² MIKKOLA M.,³ RATH D.⁴

¹*Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf,*

²*MIDATEST, Frankreich,*

³*FABA co-op, Viking Genetics, Finnland,*

⁴*Institut für Nutztiergenetik (FLI), Mariensee*

Verschiedene Faktoren beeinflussen den Besamungserfolg sowohl bei normozyklischen als auch bei superovulierten Rindern. Wichtige Faktoren sind u.a. die Spermienzahl und der Aspekt einer möglichen Spermisortierung. In den eigenen Experimenten (A) wurden drei verschiedene Spermienkonzentrationen (15×10^6 , 5×10^6 und 1×10^6 je Straw) nach TOB bei zyklischen Jungrindern genutzt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Befruchtungsraten (93,3; 96,2 und 78,8 % nach Eileiterspülung am d4) und in der Embryonalentwicklung beobachtet (84,6, 80,7 und 75,8 % erwartete Embryonalstadien). Signifikante Unterschiede wurden in der Zahl akzessorischer Spermien gefunden. Nach Nutzung geschlechtssortierter Spermien (Experiment B) nach KB in unstimulierten JR wurde eine Befruchtungsraten von 84,0 % am Tag 4 beobachtet.

Nach Verwendung von geschlechtssortierten Spermien bei superovulierten Tieren und Spülung am Tag 7 (Experiment C; n=8 Tiere) wurden nach zweimaliger Besamung (TOB mit je $2,3 \times 10^6$ Spermien) durchschnittlich 4,2 ttE gegenüber 5,9 bzw. 4,8 ttE bei Verwendung von konventionellem Sperma (15×10^6 bzw. 1×10^6) gewonnen.

Nach Auswertung aktueller Untersuchungen in Finnland wurden bei 335 Spülungen von Jungrindern keine signifikanten Unterschiede in der Gewinnung von transfertauglichen Embryonen nach Verwendung von sortiertem bzw. konventionellem Sperma beobachtet. Insgesamt wurden 6,1 ttE nach Verwendung gesextem Spermas im Vergleich zu 7,3 ttE nach Nutzung konventionellen Spermas gewonnen. Bei Kühen wurden demgegenüber bei 122 Spülungen nach KB mit gesextem Sperma durchschnittlich 5,0 ttE ausgespült. Das unterscheidet sich signifikant vom Ergebnis nach Verwendung von konventionellem Sperma (509 Spülungen mit durchschnittlich 9,1 ttE). Von ähnlichen Ergebnissen wird aus Frankreich berichtet.

Anwendung des ET im Bereich der RinderAllianz

REIMER H.

RinderAllianz GmbH

Untersuchungen zur Spermien-induzierten Bildung von "Neutrophil Extracellular Traps (NETs)" beim Rind

FICHTNER T.,^{1,2} SECHSER F.,² MUÑOZ-CARO T.,¹ HERMOSILLA C.,¹
WRENZYCKI Chr.,² TAUBERT A.¹

¹*Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen*

²*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,
Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen*

Einleitung

Je nach Tierart wird das Spermia beim Deckakt an unterschiedlichen Stellen im weiblichen Genitaltrakt deponiert. Das Ejakulat wird dabei entweder im kranialen Bereich der Vagina wie bei Rind, Schaf und Ziege ("Scheidenbesamer") oder wie bei Pferd und Schwein transzervikal in den Uterus ("Uterusbesamer") abgesetzt. Bei der instrumentellen Besamung erfolgt jedoch die Platzierung der Besamungsdosis beim Rind intrauterin. Somit gelangen neben den Spermien auch Anteile des Seminalplasmas und Verdünerbestandteile in den Uterus, die natürlicherweise in der Vagina verbleiben bzw. dort (im Uterus) nicht vorkommen. Polymorphkernige mononukleäre Granulozyten (PMN) gehören zu den Immunzellen, die im Rahmen nicht-adaptativer Immunreaktionen als erste Zellpopulation vor Ort mit Abwehrreaktionen gegen Fremdartigen reagieren. Neben ihrer Fähigkeit zur Phagozytose oder Sekretion immunmodulatorischer Moleküle können PMN als wichtigen gegen extrazelluläre Pathogene gerichteten Effektormechanismus sog. "Neutrophil Extracellular Traps (NETs)" ausbilden. Hierbei kommt es im Rahmen des Zelltods der PMN zur NADPH-Oxidase-abhängigen Freisetzung von mit Effektormolekülen [wie neutrophiler Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO) oder Histonen (H1, H2A/H2B, H3, H4)] bestücktem Chromatin. NETs bestehen somit aus einem DNA-Grundgerüst, assoziiert mit Histonen, Proteasen und antimikrobiellen Peptiden (AMPs), welches nach Entlassung in den extrazellulären Raum ähnlich einem Spinnennetz zum Abfangen von Pathogenen dient. Kürzlich wurde berichtet, dass auch sowohl equine als auch bovine Spermien bzw. Seminalplasma NETs induzieren können.

Ziele

In der vorliegenden Arbeit sollten Techniken zum Nachweis von NETs etabliert werden und mittels dieser Techniken erste Untersuchungen zur grundsätzlichen NET-Induktion über Spermien, Seminalplasma sowie unterschiedlicher Verdüner erarbeitet werden.

Material und Methoden

Über einen Ficoll[®]-Gradienten wurden bovine PMN gewonnen und mit Spermien (Frisch- oder TG-Sperma) und/oder Seminalplasma in unterschiedlichen Verhältnissen (0,5 Mio. PMN : 0,5 Mio. Spermien; 0,5 Mio. PMN : 1,5 Mio. Spermien; 0,5 Mio. PMN : 3 Mio. Spermien) sowie über unterschiedliche Zeitspannen (1, 2, 3 h) konfrontiert. Weiterhin erfolgte der Einsatz verschiedener Verdüner (Ei-, Sojaverdünner). Um den Einfluss der Motilität der Spermien zu überprüfen, wurden entweder frisch aufgetaute, aufgereinigte (Zentrifugation mit SpermFilter[®]) oder tote Spermien verwendet. Als Positivkontrolle zum Nachweis der NET-Induktion diente die Stimulation der PMN mit Zymosan. Die NET-Induktion wurde über eine fluoreszenzbasierte Messung extrazellulärer DNA quantifiziert. Zur molekularen Charakterisierung der NET-Strukturen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie Kolokalisationsexperimente zur simultanen Darstellung von extrazellulärer DNA und

NE, MPO oder Histonen durchgeführt. Zudem wurden Spermien-induzierte NETs über rasterelektronenmikroskopische (REM) Techniken visualisiert.

Ergebnisse

Die Konfrontation der PMN mit Seminalplasma oder Spermien führte zu einer signifikanten Bildung von NETs. Frischsperma bewirkte eine stärkere NETosis als TG-Sperma. Wie erwartet, wurde diese Reaktion über den Zusatz von DNase I signifikant gehemmt. Die verwendeten Verdüner zeigten eine ähnliche NET-Induktion. Weiterhin war festzustellen, dass die Induktion von NETs durch TG-Sperma dosisabhängig, im Rahmen von ein bis drei Stunden jedoch nicht zeitabhängig ist. Auch die Motilität der Spermien hatte keinen Einfluss auf die Stärke der NET-Induktion. Kollokalisationsstudien zu NE, MPO und Histonen sowie REM-Analysen bestätigten typische Charakteristika von NETs und weisen auf eine Immobilisation von Spermien über angeheftete, faserähnliche Strukturen hin.

Schlussfolgerung

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass bovine Spermien grundsätzlich NETs induzieren. Durch die resultierende Einschränkung der Motilität könnte dies zu einer Beeinträchtigung der Fertilität führen.

Ausblick

Um ein besseres Verständnis über die Charakteristika der NET-Bildung zu erlangen, wird gegenwärtig die Auswirkung potentieller NET-Inhibitoren erfasst und Versuche zu beteiligten Signalkaskaden durchgeführt. Zudem soll über funktionelle Experimente zur Fertilität von Spermien die tatsächliche Bedeutung der NETosis für die instrumentelle Besamung weitergehend untersucht werden.

Mechanisms of spontaneous embryo resorption

FLORES LANDAVERDE L.E., DREWS U., KUEHL A., HILDEBRANDT T.B.,
DREWS B.

Leibniz-Institut für Zoo- und Wildtierforschung (IZW), Berlin

Embryo resorption can be caused by multiple factors and occurs throughout pregnancy. The clearance of the dead embryonic cells in an immune privileged environment without disturbing neighboring, healthy conceptuses is a challenge for the mother.

In our study we describe the process of embryonic perishment and the subsequent degradation of the implantation site in a murine model.

Spontaneous embryo resorptions were identified *in vivo* by ultra-high frequency ultrasound in a previous study at the earliest stage possible. In total, eight embryo resorptions were identified between day 8 and 11 of pregnancy (N=30 pregnancies). Upon detection of embryo resorption, the respective female was sacrificed and the impaired and normal control implantation sites were analyzed by immunohistochemistry. Specific markers for macrophages (F4/80), neutrophils (MPO-7), and lymphocytes (B220) were used and apoptotic cells were detected via Caspase 3 staining. The thickness of the decidua capsularis, which forms the barrier between the implantation chamber and the uterine lumen, was evaluated.

The resorption process commenced with the apoptosis of the embryo proper. Early in gestation (day 8), an inflammatory process in the decidua capsularis was observed, accompanied by a local swelling and disintegration of the decidua capsularis. Massive maternal hemorrhage occurred in the decidua basalis. Degraded material and maternal blood were found in the uterine lumen. Later in gestation, when the embryo proper had increased in size, the inflammatory process resulted in the rupture of the decidua capsularis and the release of the embryo under resorption in the uterine lumen. Degradation of the embryo was supported by specialized erythrocytes, most likely of embryonic origin. In the allantoic bud as well as in the embryo proper itself, a mélange of maternal and embryonic blood was observed.

The implantation site is cleared by expulsion of embryonic material or the whole embryo via the uterine lumen. The degradation of the placenta seems to follow a different pathway.

**Dummerstorfer auf hohe Fruchtbarkeit gezüchtete Mausmodelle:
alternative Phänotypen für das Selektionskriterium 'hohe Fruchtbarkeit'**

WEITZEL J.M., MICHAELIS M., SOBCZAK A., LANGHAMMER M., REINSCH N.,
SCHÖN J.

*Institut für Fortpflanzungsbiologie und Institut für Genetik & Biometrie;
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN),
18196 Dummerstorf*

Mausmodelle stellen wertvolle Tiermodelle zur Untersuchung von reproduktionsbiologischen Fragestellungen dar. Weltweit stehen >1000 verschiedene Mausmodelle mit einem Reproduktionsphänotyp zur Verfügung. Die große Mehrheit dieser Mausmodelle (>99%) zeigt eine Sub- oder Infertilität. Im Gegensatz dazu existieren fast keine Modelle, die eine erhöhte Fruchtbarkeit aufweisen.

In Dummerstorf wird seit den 1970er Jahren der Ansatz verfolgt, Mäuse mit erhöhter Fruchtbarkeit zu selektionieren. Als Selektionskriterium wurde ein gemischter Index herangezogen, in welchen sowohl die Anzahl der Nachkommen (die Wurfgröße) als auch das Gesamtgeburtsgewicht des Wurfes eingeht. Nach über 40 Jahren Selektion befinden sich diese Auszuchtmauslinien mittlerweile in der 172. Generation. Die Wurfgröße hat sich in dieser Zeitspanne von ca. 10 Nachkommen in unselektionierten Mäusen auf >20 Nachkommen verdoppelt. Eine Verdopplung ist auch beim Gesamtgeburtsgewicht erfolgt. Es wurden zwei Mauslinien generiert (Fruchtbarkeitslinien 1 und 2 – FL1 und FL2), wobei eine Linie (FL2) in den ersten 23 Generationen zyklussynchronisiert wurde.

Die beiden, auf hohe Fruchtbarkeit selektionierte Mauslinien realisieren den Phänotyp ‚hohe Fruchtbarkeit‘ auf unterschiedlichen molekularen, physiologischen und endokrinologischen Wegen. So zeigen Weibchen der FL2 einen erhöhten Progesteronspiegel während des Zyklus – ein Phänomen, das weder Weibchen der Kontrolllinie noch Weibchen der FL1 aufweisen. Auch Männchen der verschiedenen Linien unterscheiden sich in ihren hormonellen Parametern. So zeigen Männchen der Linie FL1 erhöhte Testosteronspiegel – wiederum ein Phänomen, das weder Männchen der Kontrolllinie noch Männchen der Linie FL2 zeigen. Darüber hinaus haben beide Fruchtbarkeitslinien verschiedene Strategien zur Ovulation einer erhöhten Anzahl von Oozyten pro Zyklus entwickelt. So ovulieren Weibchen der FL1 ca. 30 Oozyten pro Zyklus. Trotz erhöhter embryonaler Verluste (ca. 1/3) erfolgt die Geburt von ca. 20 Nachkommen pro Wurf. Im Gegensatz dazu ovulieren Weibchen der Linie FL2 ca. 22 Oozyten pro Zyklus, von denen ebenfalls ca. 20 vitale Nachkommen geboren werden.

Diese Untersuchungen zeigen, dass der Phänotyp ‚hohe Fruchtbarkeit‘ durch unterschiedliche molekulare Strategien ermöglicht werden kann. Die Dummerstorfer Mauslinien stellen somit eine wertvolle Ressource in der reproduktionsbiologischen Forschung dar.

Dieses Projekt wird gefördert durch eine Sachbeihilfe der DFG (WE2458/10-1).

Auswirkungen von Hitzestress auf die Follikelfunktion von Milchkühen

VANSELOW J.,¹ VERNUNFT A.,¹ KUHLA B.,² KOCZAN D.,⁴ SPITSCHAK M.³

Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) Dummerstorf, ¹Institut für Fortpflanzungsbiologie, ²Institut für Genombiologie, ³Institut für Ernährungsphysiologie; ⁴Universität Rostock, Institut für Immunologie

Die Menschheit wird sich in Zukunft im Zuge des Klimawandels auf höhere Jahresdurchschnittstemperaturen einstellen müssen. Aber auch Wetterextreme werden nach den gängigen Rechenmodellen des Bundesumweltamtes, des BMBF und des PIK Potsdam zunehmen. So wird sich im Besonderen der Süden Deutschlands auf bis zu 50 Sommertage (über 25°C) und bis zu 30 heiße Tage (30°C) zusätzlich im Jahr einstellen müssen. Die heißen Tage sind besonders für laktierende Rinder mit einem Hitzestress verbunden, da ihr eigener hoher Stoffwechsel und Ruminieren bereits viel Wärme erzeugen, die nicht ausreichend abgegeben werden kann. Anhaltende Hitzeperioden haben einen signifikant depressiven Effekt auf die Fortpflanzungsleistungen bei Rindern und auf den Erfolg von reproduktionsbiotechnologischen Techniken (F. De Rensis et al., 2003, THERIOGENOLOGY, 60).

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen eines definierten Hitzestresses auf die Genexpression von Granulosazellen des bovinen Brunstfollikels *in vivo* zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst vier HF-Kühe in der Spätlaktation in einer Klimakammer bei 28°C für vier Tage gehalten (Hitzestress-Gruppe, HS). Nach einem Tag Adaptationszeit wurde eine Brunst mit einem PGF_{2α} Analogon induziert und nach 48 Stunden mit einem GnRH Analogon die Ovulation terminiert. 23 Stunden nach der GnRH-Gabe wurden die Tiere unmittelbar nach Verlassen der Klimakammern geschlachtet und Gewebe gewonnen. Eine Kontrollgruppe von weiteren vier Tieren wurde bei 15°C gehalten und nach dem gleichen Schema behandelt. Ihre Futterrationen wurden aber an die der HS-Gruppe angepasst d.h. sie wurde prozentual um den Anteil verkleinert, den die Tiere unter Hitzestress gegenüber ihrer vorherigen Trockenmasseaufnahme weniger gefressen hatten (Pair-fed-Gruppe, PF). Von den Brunstfollikeln wurden die Follikelflüssigkeiten gewonnen, die muralen Granulosazellen herauspräpariert und deren Expressionsprofile mittels mRNA Microchip Analyse (Affymetrix) untersucht.

Morphologisch und endokrinologisch stellten sich die beprobten Follikel als präovulatorische Follikel dar, wobei die Follikel der HS-Gruppe mit ca. 13 mm durchschnittlich kleiner waren als die der PF-Gruppe mit ca. 21 mm Durchmesser. Von 19988 aktiv exprimierten Transkripten kamen 142 ausschließlich in der HS und 275 ausschließlich in der PF-Gruppe vor. 196 der Transkripte waren signifikant auf und 59 herabreguliert (ANOVA $p < 0,05$; Fold Change $< -1,5$ und $> 1,5$). Eine Clusteranalyse der Expressionsdaten zeigte klare Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Expressionsdaten bestätigen zudem die Klassifizierung der Follikel als präovulatorisch anhand von Post-LH-Markergenen. 18 der different exprimierten Gene wurden über eine quantitative real-time RT-PCR (qPCR) re-evaluiert, wobei sich 12 auch in der qPCR als signifikant different exprimiert bestätigt haben. Nach ersten Auswertungen lassen sich die different exprimierten Gene den Signalwegen der Zell- und Gewebeentwicklung sowie dem Tumorwachstum und endokrinem System zuordnen.

Zusammenfassend zeigen unsere ersten Ergebnisse, dass Hitzestress im präovulatorischen Zeitraum bei Rindern in den Zellen der Granulosa zu einem spezifisch veränderten Expressionsprofil führt.

Fertilitätsrelevante Effekte der Zerstörung dominanter Follikel beim Rind

SCHNEEBELI J.

Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Während der Luteinisierungsphase des Rindes scheint es zu komplexen Interaktionen zwischen dem neu entstehenden Corpus luteum (CL), dem Uterus und den wellenförmig auftauchenden dominanten Follikeln (DF) zu kommen. Es lassen sich nicht nur spezifische Unterschiede zwischen der CL-Aktivität zyklischer, erfolgreich und erfolglos belegter Rinder erkennen, sondern die Intensität der Progesteronsekretion (P4) ist auch mit dem Rhythmus des DF-Wachstums korreliert. Das primäre Ziel dieser Studie bestand darin abzuklären, welche Auswirkungen die Entfernung des ersten post ovulationem entstehenden DF (DF1) auf den Verlauf der Lutealphase hat. Als Versuchstiere dienten unbelegte und belegte Braunvieh Milchkühe und Rinder, deren Ovaritätigkeit kontinuierlich überwacht wurde (rektale Ovarpalpation alle 1-2 Tage; tägliche P4-Bestimmung im peripheren Blut mittels RIA). Indem der DF1 dieser Tiere entweder intakt belassen ($^{\circ}$) oder anlässlich der Ovarkontrollen zwischen D6 und D15 (D1 = Brunst) manuell entfernt wurde (*), lagen schliesslich Referenz- und Testdaten für die Gruppen "zyklisch" (c°/c^*) [n = 194]; "erfolgreich belegt" (s°/s^*) [n = 172] und "erfolglos belegt" (u°/u^*) [n = 81] vor. Zusätzlich wurden die DF-Manipulationen als "früh" (D6-9) oder "spät" (D10-15) klassifiziert.

Pauschal betrachtet liessen sich in den Gruppen c°/c^* und u°/u^* keine Unterschiede zwischen dem mittleren Verlauf der P4-Sekretion behandelter und unbehandelter Tiere erkennen. In Gruppe s°/s^* hingegen war die mittlere CL-Aktivität während der ganzen Luteinisierungsphase in s^* leicht tiefer als jene in s° , stimmte aber gleichzeitig mit jener in Gruppe u°/u^* überein. In den Sub-Gruppen c^* und u^* , aber nicht in s^* , entwickelten sich die CL der Tiere, deren DF1 "früh" bzw. "spät" entfernt wurde, unterschiedlich. Die zeitliche Manifestation der Differenzen spricht allerdings dagegen, darin eine Folge der DF-Manipulation zu sehen. Durch "frühe" Zerstörung des DF1 wurde die Anbildung eines Nachfolgers (DF2) beschleunigt; nach "später" Entfernung des DF1 blieb der spontane Rhythmus der Follikelwellen unverändert. Belegte Tiere, deren DF1 manuell entfernt wurde, wiesen eine um 8% erhöhte Trächtigkeitsrate auf.

Durch die Zerstörung des DF1 wird offensichtlich eine Kaskade von Ereignissen ausgelöst, die auch den Uterus betreffen. Obwohl die Studie Unterschiede im Luteinisierungsverlauf der Sub-Gruppen s° und s^* aufzeigt, sprechen die Ergebnisse insgesamt eher gegen einen direkten Einfluss der DF-Manipulationen auf die CL-Aktivität. Angesichts der Ähnlichkeit der P4-Sekretion in s^* und u°/u^* , und auch angesichts der erhöhten Trächtigkeitsrate behandelter Tiere, lässt sich vermuten, dass DF-Manipulationen das Überleben von Embryonen begünstigen können, wenn eine relativ zögerliche CL-Entwicklung eher ein Umrindern erwarten liesse. Jeder durch Entfernung eines DF erzielte "Behandlungserfolg" erhöht somit nicht nur die Trächtigkeitsrate, sondern trägt indirekt auch zu einer Senkung des mittleren P4-Spiegels der Gesamtheit trächtig gewordener Tiere bei. Zweifellos bedarf diese Hypothese weiterer Abklärungen. Bereits die jetzt vorliegenden Ergebnisse lassen aber die Entfernung des DF1 bei Embryo-Rezipienten als eine sinnvolle und einfache Massnahme zur Optimierung der Anwachsrates erscheinen.

Anti-Müller-Hormon (AMH) Konzentrationen im Plasma von HF-Färsen als prognostischer Parameter für den Erfolg von Eizellgewinnung und Embryonenerzeugung

VERNUNFT A.¹, SCHWERHOFF M.², VIERGUTZ T.¹, DIEDERICH M.²,
KUWER A.²

¹*Institut für Fortpflanzungsbiologie, Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN),
18196 Dummerstorf;* ²*MASTERRIND GmbH, 27283 Verden*

Das Anti-Müller-Hormon (AMH) wird in adulten weiblichen Tieren ausschließlich von Granulosazellen und hauptsächlich von kleinen, wachsenden Follikeln während der Follikelrekrutierung im Eierstock gebildet. Je mehr vitale, kleine Follikel und Eizellen ein Individuum besitzt, umso höhere Spiegel des Hormons lassen sich im Blut messen. Dieser Pool an Follikeln wird auch als „ovarielle Funktionsreserve“ bezeichnet. Der Blutspiegel des Hormons korreliert auch stark mit der Anzahl größerer Follikel (>3mm) auf den Ovarien von Kühen ($r = 0,88$, Rico et al., 2011). Zudem bleibt der Parameter AMH über den Zyklusverlauf weitestgehend auf konstantem, wiederholbarem Niveau. AMH gilt deshalb als unabhängiger Parameter, um die ovarielle Funktionsreserve zu bestimmen. Erste Untersuchungen an Kühen haben bereits gezeigt, dass die Tiere mit einer hohen ovariellen Funktionsreserve, bessere individuelle Fruchtbarkeitsleistungen (Mossa et al., 2012) und bessere Ergebnisse bei einer Embryonenspülung aufweisen (Monniaux et al., 2010). Während in der Humanmedizin AMH zu den Standardparametern in der Reproduktionsmedizin gehört, wird sein Potenzial in der Tierzucht bislang kaum beachtet.

Ziel dieser Untersuchung war es, die prognostische Aussagekraft des AMH-Plasmaspiegels von Rindern für Ergebnisse eines OPU-IVF- oder MOET-Programms unter den Praxisbedingungen eines deutschen Zuchtprogrammes zu testen.

Dazu wurden auf zwei ET-Stationen Plasmaproben von insgesamt 64 Färsen ($11,7 \pm 0,2$ Monate alt) gewonnen. Um eventuelle Einflüsse durch den Zyklusstand zu verhindern und um sicherzustellen, dass die Tiere postpubertär sind, wurden die Proben während einer Brunst gewonnen. Danach wurden bei den Tieren wiederholt Oozyten gewonnen (OPU) und für eine IVP genutzt sowie wiederholt Superovulationsbehandlungen (Pluset®) mit anschließenden Embryonenspülungen durchgeführt. Insgesamt flossen die Ergebnisse von 202 OPU-IVF Zyklen und 90 Embryonenspülungen in die Untersuchung ein. Die Plasmaproben wurden mit einem ELISA-Kid (DSL-10-144400, Beckman Coulter, USA) auf ihren AMH Gehalt untersucht.

Insgesamt wurden durchschnittlich AMH Konzentrationen von $0,37 \pm 0,03$ ng/ml (0,09 bis 1,39 ng/ml) gemessen, $9,1 \pm 0,5$ Follikel pro OPU-Sitzung aspiriert (1 bis 35 Follikel), dabei $7,2 \pm 0,3$ Oozyten gewonnen (0 bis 20 Oozyten) und daraus $1,3 \pm 0,1$ Blastozysten pro IVP-Zyklus produziert. Nach Superovulationsbehandlung wurden durchschnittlich $4,5 \pm 0,6$ Embryonen gespült. Die AMH Konzentrationen im Plasma waren signifikant mit der Anzahl an aspirierten Follikeln pro OPU-Sitzung korreliert ($R = 0,45$), sowie mit der Anzahl an gewonnenen Oozyten ($R = 0,43$) und erzeugten Embryonen nach IVF ($R = 0,28$). Eine hohe Korrelation ergab sich zwischen der Anzahl an aspirierten Follikeln und der Anzahl an gewonnenen Oozyten ($R = 0,88$).

Jedoch wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen den AMH Konzentrationen und den Ergebnissen der Embryonenspülungen nach Superovulation festgestellt. Eine Gruppeneinteilung nach AMH Konzentrationen zeigte, dass die 25% der Tiere mit den niedrigsten AMH Konzentrationen im Plasma signifikant schlechtere Ergebnisse beim OPU erbrachten als die 25% der Tiere mit den höchsten AMH Konzentrationen (oberes Quartil, siehe Tabelle). Jedoch wurden auch dabei keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich ihrer Ergebnisse von der in vivo Embryonenerzeugung beobachtet.

Tabelle

Average results of repeated Ovum-Pick-Up followed by in vitro embryo production and embryo flushing after superovulation of Holstein-Friesian heifers (n = 64), divided into groups (quartiles) according to their Anti-Muellerian-Hormon (AMH) plasma levels

		Lower Quartile AMH ≤ 25%	Middle Quartiles 25% > AMH < 75%	Upper Quartile AMH ≥ 75%
AMH	(ng/ml)	0.185 ± 0.011 ^a	0.321 ± 0.001 ^c	0.634 ± 0.073 ^b
Follicles per OPU	(n)	7.7 ± 0.6 ^a	9.9 ± 0.8	11.9 ± 2.0 ^b
Oocytes per OPU	(n)	5.7 ± 0.5 ^a	7.4 ± 0.6	8.2 ± 0.8 ^b
IVF blastocysts per OPU	(n)	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Flushed embryos	(n)	3.9 ± 1.1	4.3 ± 0.8	5.4 ± 1.3
Transferable embryos	(n)	3.3 ± 1.1	3.0 ± 0.5	3.7 ± 0.8

Values are presented as means ± SE. Values with different superscripts in rows differ significantly (P<0.05).

Zusammenfassend können wir sagen, dass sich auch unter Praxisbedingungen signifikante Zusammenhänge zwischen den AMH Plasmakonzentrationen junger HF-Färsen und den Ergebnissen einer In-vitro-Embryonenerzeugung (IVP) zeigen. Jedoch erscheinen uns die Zusammenhänge als zu gering, um den AMH Wert eines Einzeltieres zur genauen Vorhersage der Ergebnisse eines bestimmten OPU-IVF Zyklus oder einer Embryonenspülung zu nutzen. Es lassen sich aber sehr wohl Gruppen von Tieren identifizieren, die sich als gute oder schlechte Donoren erweisen werden.



Wir bedanken uns beim "Förderverein Bioökonomieforschung e.V. (FBF)" für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Untersuchung.

Experimenteller Transfer von IVF Rinderembryonen im 32-Zellstadium. Einfluss der Entwicklungsumgebung auf Entwicklungsraten und Kryotauglichkeit

HÖLKER M., HELD E., SALILEW-WONDIM D., RINGS F., SCHELLANDER K.,
TESFAYE D.

Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn

Die In vitro Produktion von Rinderembryonen wird bereits seit über 30 Jahren erfolgreich durchgeführt. Die Effizienz dieser Methode, wie auch die Qualität der resultierenden Embryonen, ist jedoch immer noch begrenzt. Rinderembryonen werden in der Regel in einem statischem Kultursystem für 7-9 Tage in vitro in Medien kultiviert, welche sich in ihrer Zusammensetzung an der Eileiterflüssigkeit (SOF = Synthetic Oviductal Fluid) orientieren, obwohl seit langem bekannt ist, dass Rinderembryonen in vivo um den 5. Entwicklungstag in den Uterus gelangen, welcher vollkommen andere Umgebungsbedingungen als der Eileiter aufweist. Es stellt sich also die Frage, ob eine Modifikation der in vitro Kulturbedingungen, in Anlehnung an die Umgebungsbedingungen im Uterus, ab Kulturtag 5 positive Effekte auf die Entwicklung der Embryonen ausüben kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Rinderembryonen im 32-Zellstadium in den Uterus von Rindern übertragen, welche zuvor auf Zyklustag 5 synchronisiert worden waren. Diese Embryonen hatten sich zuvor in vitro in SOFaa + Serum (Gruppe: Serum – Uterus) oder SOFaa + fatty acid free BSA (Gruppe: BSA - Uterus) entwickelt. Dies erlaubte eine Weiterentwicklung der IVP Embryonen unter physiologischen Bedingungen im Uterus. Nach anschließender Rückgewinnung der Stadien an Tag 7 durch klassische Embryonenspülung folgte der Vergleich der Entwicklungsraten mit vollständig In vitro produzierten Embryonen (Gruppe: Serum - Serum & Gruppe: BSA - BSA). Bis dato wurden 1031 in vitro produzierte 32-Zeller auf 21 synchronisierte Rinder übertragen. Bei allen Tieren erfolgte zur Rückgewinnung der Embryonalstadien eine Uterusspülung an Tag 7. Letztlich wurden in 21 durchgeführten einseitigen Spülungen von 1031 transferierten Embryonen insgesamt 680 Embryonalstadien und UFOs durch Uterusspülung zurückgewonnen, was einer Rückgewinnungsrate von 66 % entspricht. Während 68% der statisch in Serum weiterkultivierten 32-Zeller an Kulturtag 7 das Blastozystenstadium erreicht hatten, waren dies bei den statisch in BSA kultivierten Embryonen mit 41 % signifikant weniger ($p < 0.05$). Interessanterweise erreichten jedoch Embryonen die bis zum 32-Zellstadium in SOFaa + Serum kultiviert worden waren und danach in den Uterus übertragen wurden (Serum - SOF) signifikant geringere Blastozystenraten an Tag 7 als ihre statisch in SOF + Serum kultivierten Kontrollembryonen (12,9 % vs. 68,4 %). Ebenfalls erreichten Embryonen die bis zum 32-Zellstadium in SOFaa + fatty acid free BSA kultiviert worden waren und danach in den Uterus übertragen wurden (BSA - SOF) signifikant geringere Blastozystenraten an Tag 7 als ihre statisch in SOF + BSA kultivierte Kontrollgruppe (16,0 % vs. 40,1 %). Diese statistischen Unterschiede hinsichtlich der Entwicklungsrate hoben sich jedoch nach Weiterkultivierung in vitro bis Tag 9 auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass Serumzusatz zum Kulturmedium die

Entwicklung von IVP Embryonen beschleunigt während die Entwicklung der Embryonen in der uterinen Umgebung langsamer verläuft als in der In vitro Kultur.

Genomische Selektion: Embryobiopsie in der täglichen Routine

DIEDERICH M., ROSCHLAU D., KUWER A., ROSCHLAU K.

Masterrind GmbH, ET-Station Nückel

Auf der ET-Station der Masterrind GmbH in Nückel werden seit 1991 Embryonen mittels Aspirationstechnik bioptiert, um deren Geschlecht schon vor dem Transfer zu diagnostizieren. Mit Einführung der genomischen Selektion 2010 hat die Biopsie von Embryonen einen noch höheren Stellenwert bekommen. Im Idealfall wird die Biopsie in frühen Embryonalstadien (Morula-Stadium) durchgeführt. An den entnommenen Zellen erfolgt die Geschlechtsbestimmung und anschließend die Schätzung des genomischen Zuchtwertes (gZW) bei den männlichen Embryonen. Die Schätzung des Zuchtwertes erfolgt auf Basis der SNP (Single Nucleotide Polymorphism) - Muster nach Abgleich der Daten mit der Referenzgruppe. SNP's kommen im Genom millionenfach vor und könnten über eine Sequenzanalyse alle erfasst werden. Kostengünstiger ist heute die Nutzung von SNP-Chips (Illumina 50k-Chip, Euro G 10k-Chip), mit denen zumindest ein Teil der SNP's gefunden wird. Da das Genom im Moment der Befruchtung fertig ausgeprägt ist, können Zuchtwerte schon in sehr frühem Embryonalstadium ermittelt werden. Jedoch stellt die Biopsie auch eine Herausforderung dar. Die Qualität der Embryonen bzw. Zellen ist ein wichtiges Kriterium. Es werden ausschließlich Embryonen der Qualität 1 und 2 aus IVP und Spülung für die Biopsie genutzt. Bei der Biopsie werden 10-15 Zellen entnommen, sodass nach einer „whole genome amplification“ ausreichend intakte DNA für die Analyse vorhanden ist, um ein sicheres Ergebnis für den gZW zu erhalten. In der Praxis hat sich gezeigt, dass Embryonen aus Spülungen nach der Biopsie ohne größere negative Einflüsse auf die Anwachsrate TG-gelagert werden können. Die Embryonen aus der IVP dagegen weisen nach der Biopsie und der TG-Lagerung eine zu geringe Anwachsrate auf, weshalb sie zurzeit direkt übertragen werden. Neben den oben aufgeführten Anforderungen sind weitere Faktoren (u.a. der Analyse-Chip) für die korrekte Ermittlung des gZW wichtig. Mit Beginn dieses Jahres wurde die genomische Zuchtwertschätzung von dem 50k = 50000 SNP Chip auf den 10k = 10000 SNP Chip umgestellt. Dies könnte möglicherweise zur Folge haben, dass es bei einer geringeren Anzahl an gelesenen SNP auf dem 10k-Chip und der notwendigen Einführung des „Imputing“ zu einer Verringerung der „call rates“ und damit zu einer reduzierten Auswertbarkeit der Embryonen führt.

Verlauf der Steroidhormonkonzentrationen während der In-vitro-Maturation boviner Oozyten

BLASCHKA C., GROTHMANN H., WRENZYCKI Chr.

*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,
Lehrstuhl für Molekulare Reproduktionsmedizin
Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland*

Die Bedingungen der derzeit in der In-vitro-Maturation (IVM) eingesetzten Systeme spiegeln die In-vivo-Situation nicht vollständig wider. In Folge dessen weisen in vitro gereifte Oozyten eine niedrigere Qualität auf als ihre in vivo gereiften Gegenstücke. In den fein abgestimmten Prozessen der Follikel- und Oozytenreifung und -entwicklung spielen Steroidhormone eine wichtige Rolle. Die während der finalen Maturation statt findende Verschiebung von der Östradiol- in der ersten Hälfte hin zur Progesterondominanz in der zweiten Hälfte ist in der Literatur gut beschrieben (Dieleman et al. 1983; J Reprod Fertil 69, 641–649). Dieser Wechsel geht einher mit einer Wiederaufnahme der Meiose und resultiert in der Reifung der Eizellen. Ziel dieser Studie ist es, den zeitlichen Verlauf der Steroidhormonkonzentration während der In-vitro-Maturation boviner Kumulus-Oozyten-Komplexen (KOK) zu ermitteln.

Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) wurden aus Schlachthofovarien mittels der Slicing-Methode gewonnen. Die In-vitro-Reifung von jeweils 30 KOK der Kategorien 1-3 erfolgte im Basismedium TCM 199 (Tissue Culture Medium 199) mit je drei verschiedenen Supplement-Kombinationen für insgesamt 24 Stunden bei 39°C und 5% CO₂ ohne Ölüberschichtung. Die erste Supplement-Kombination war eCG (equines Choriongonadotropin) und hCG (humanes Choriongonadotropin). Das Reifungsmedium wurde nach definierten Zeitpunkten gesammelt und bei -20°C bis zur Hormonbestimmung eingefroren. Als zweite Kombination wurde FSH und LH zugesetzt. Die Gonadotropine wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Zudem wurden die Oozytengruppen in diesem Medium gewaschen und dies gesammelt. Ausschließlich wurde das IVM-Medium ohne Hormone als dritte Variante verwendet. Das Reifungsmedium der beiden letzten Supplement-Kombinationen wurde nach 24h gewonnen und bei -20°C bis zur Hormonbestimmung eingefroren. Mittels Radioimmunoassay (RIA) wurden 17β-Östradiol (E₂) und Progesteron (P₄) im Maturationsmedium bestimmt.

Das Basismedium TCM 199 mit BSA plus eCG und hCG wurde vor dem Einsetzen der KOK (0h, Kontrolle) und nach 4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h analysiert (Tabelle 1). Es konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden. P₄ und E₂ wurden im Kontrollmedium nicht nachgewiesen. Während der In-vitro-Maturation stieg die P₄-Konzentration an, wohingegen die E₂-Konzentration unverändert blieb.

Tabelle 1: Steroidhormon-Konzentration im IVM-Medium unter Zusatz von eCG und hCG

	E₂ [pg/ml]	P₄ [ng/ml]
0h (Kontrolle, ohne COC)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
4h	52,8 ± 12,1	3,3 ± 1,0
8h	54,6 ± 7,9	6,2 ± 3,3
12h	63,8 ± 15,2	6,5 ± 2,0
16h	54,2 ± 16,3	6,8 ± 1,1
20h	77,1 ± 40,1	7,3 ± 1,8
24h	74,7 ± 32,4	10,4 ± 1,6

In der weiteren Supplement-Kombination (FSH und LH) konnte nach der Hormonanalyse beobachtet werden, dass im Medium mit dem Zusatz von jeweils 0,05 IE, die E₂-Konzentration ähnlich der wie nach Zusatz von eCG und hCG war (Tabelle 2). Auch mit dem Einsatz von jeweils 0,01 IE zeigte sich, dass die E₂- und P₄-Konzentration ähnlich blieben (Tabelle 3). Zudem konnte beobachtet werden, dass bereits nach dem Waschschrift P₄ und E₂ im Maturationsmedium zu messen waren.

Tabelle 2: Steroidhormon-Konzentration im IVM-Medium unter Zusatz von 0,05 IE FSH und LH

	E₂ [pg/ml]
0h (Kontrolle)	6,2 ± 5,7
Waschmedium	26,0 ± 10,8
24h	59,7 ± 20,1

Tabelle 3: Steroidhormon-Konzentration im IVM-Medium unter Zusatz von 0,01 IE FSH und LH

	E₂ [pg/ml]	P₄ [ng/ml]
0h (Kontrolle)	3,3 ± 3,2	nicht nachweisbar
Waschmedium	19,6 ± 4,2	0,3 ± 0,1
24h	58,4 ± 24,1	17,3 ± 3,5

Nach der Hormonanalyse des Mediums ohne Zusatz von Gonadotropinen konnten folgende Konzentrationen von P₄ und E₂ gemessen werden (Tabelle 4):

Tabelle 4: Steroidhormon-Konzentration im IVM-Medium ohne Zusatz von Gonadotropinen

	E₂ [pg/ml]	P₄ [ng/ml]
0h (Kontrolle)	4,1 ± 5,7	nicht nachweisbar
Waschmedium	29,5 ± 12,6	0,3 ± 0,1
24h	82,6 ± 50,8	6,3 ± 0,4

Der Hormonverlauf von E₂ und P₄ während der In-vitro-Maturation entspricht nicht dem beobachteten Muster während der finalen Maturation in der Follikelflüssigkeit und verdeutlicht, dass die derzeitigen Bedingungen der IVM die In-vivo-Situation nur unvollständig imitieren und einer weiteren Optimierung bedürfen.

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; FOR 1369).

Sind exfoliativ-zytologische Befunde der Gebärmutter beim Rind abhängig vom Entnahmeort?

EGBERTS J.,^{1,2} DETTERER J.,² PARK A.,² MEINECKE-TILLMANN S.¹

¹*Institut für Reproduktionsbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover*

²*Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland*

Unbefriedigende Ergebnisse bei der Embryonengewinnung von superovulierten Kühen, wie zum Beispiel eine niedrige Ausspülrate oder schlechte Embryoqualitäten, könnten ihre Ursache auch im Vorliegen einer subklinischen Endometritis haben. Im Rahmen eines umfangreicheren Projekts beschäftigen wir uns mit dieser Fragestellung.

Im ersten Schritt sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob bei der zytologischen Untersuchung des Uterus, welche als zuverlässige Methode zur Diagnose der subklinischen Endometritis beim Rind gilt, eine einzige Probe repräsentativ für den Status des gesamten Uterus ist. Das Ziel dieser Untersuchung ist, zu klären, ob die Ergebnisse der exfoliativ-zytologischen Befunde abhängig vom Entnahmeort sind.

Zwanzig deutsche Holstein Kühe (2. - 8. Laktation) wurden während des Interöstrus (Tag 7 - 12) mittels einer modifizierten Cytobrush[®]-Entnahmemethode an drei verschiedenen intrauterinen Lokalisationen im Rahmen der Voruntersuchung als ET-Spendertiere vor der Einleitung der Superovulation beprobt. Die Beprobung erfolgte in beiden Gebärmutterhörnern ca. 1,5 cm cranial der Bifurcation, bzw. im Gebärmutterkörper ca. 0,5 cm cranial des inneren Muttermundes.

Das gewonnene Zellmaterial wurde auf Objektträger aufgebracht und mit der DiffQuick[®]-Methode gefärbt. Anschließend wurde der zytologische Status mikroskopisch ausgewertet. Der Anteil polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) wurde an Hand der Beurteilung von 300 Zellen pro Ausstrich bestimmt. Der Schwellenwert für eine subklinische Endometritis wurde bei einem Anteil von 5 % PMN festgelegt.

Obwohl der durchschnittliche Prozentsatz an PMN im Gebärmutterkörper ($0,7 \pm 1,5$), im rechten Uterushorn ($1,5 \pm 3,6$) und im linken Uterushorn ($1,4 \pm 2,5$) bei den untersuchten Tieren keinen signifikanten Unterschied ($P = 0,42$) aufzeigte, wurden Differenzen zwischen den Entnahmeorten beim Einzeltier offensichtlich. Eine subklinische Endometritis (SE) wurde bei 15 % der Kühe diagnostiziert. Jedoch wurde der PMN Schwellenwert bei keinem der drei Tiere in allen drei Lokalisationen überschritten. Lediglich eine oder zwei der beprobten Stellen ließen auf eine subklinische Endometritis schließen: bei einem Tier in beiden Hörnern, bei einem anderen in einem Horn und im Uteruskörper und beim dritten Tier in nur einem Horn. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zytologische Proben von mehr als einer Lokalisation entnommen werden sollten, um eine subklinische Endometritis sicher zu diagnostizieren.

Notizen