

AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer deutschsprachiger Länder

44. Jahrestagung

www.aet-d.de

8. und 9. Juni 2017 in Wieselburg, Österreich



Hans-Peter Nohner
Andrea Lucas-Hahn
Friedrich Führer



AET-d

Arbeitsgemeinschaft Embryotransfer
deutschsprachiger Länder

www.aet-d.de

**44. Jahrestagung in Wieselburg
8. und 9. Juni 2017**

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

Goldsponsor 2017



Silbersponsoren 2017



Bronzesponsoren 2017



Sponsorenadressen

Goldsponsor

Vetoquinol GmbH
Parkstraße 10
D - 88212 Ravensburg

Silbersponsoren

CRV
Rottmoos 5
D - 83512 Wasserburg

Genetic Austria GmbH
Dr. Otmar Föger Strasse 1
A - 4921 Hohenzell

Genostar Rinderbesamung GmbH
Holzingerberg 1
A - 3254 Bergland - Wieselburg

IMV Technologies
ZI 1 EST, Postfach 61300
F - L'Aigle

OÖ Besamungsstation
Dr. Otmar Föger Strasse 1
A - 4921 Hohenzell

Worthington - Austria
Beim Flaschenwerk 1
A - 3291 Kienberg bei Gaming

Bronzesponsoren

Bodinco B.V.
Hofdijkstraat 2
NL - 1814 EC Alkmaar

BVN
Besamungsverein Neustadt a.d.Aisch e.V.
Karl-Eibl-Straße 17 - 27
D - 91413 Neustadt an der Aisch

Calier Deutschland GmbH
Balsenstraße 2
D - 27472 Cuxhaven

Ceva Tiergesundheit GmbH
Kanzlerstraße 4
D - 40472 Düsseldorf

Consarctic GmbH
Postfach 1133
D - 63821 Schöllkrippen

MINITÜB GmbH
Hauptstrasse 41
D - 84184 Tiefenbach

Pharmanovo
AniMed Service AG
Liebochstrasse 9
A - 8143 Dobl

RMP Medizinische Produkte
Eyber Straße 74
D - 91522 Ansbach-Eyb

Veyx-Pharma
Söhreweg 6
D - 34639 Schwarzenborn

Programm

Donnerstag, 8. Juni 2017

- 10:00 Praktikerseminar**
Besichtigung des Reproduction centre Wieselburg der Vet. Med Uni Wien
Rottenhauserstr. 30, 3250 Wieselburg
- 11:00 IVF-Workshop und Diskussion im Tagungsraum der Messe Wieselburg, Volksfestplatz 3 (5 min Autofahrt)**
Leitung: U. Besenfelder, V. Havlicek
- 12:30 Registrierung und Willkommen – kleiner Imbiss**
- 13:30 Begrüßung**
H.-P. Nohner, 1. Sprecher AET-d
Besamung und Biotechnologie in der österreichischen Rinderzucht
F. Führer, GENOSTAR Rinderbesamung, Bergland, Österreich
Überblick über die Rinderzucht in Österreich, Vorstellung der österreichischen Zuchtprogramme
J. Miesenberger, OÖ. Besamungsstation, Hohenzell, Österreich
-
- 14:15-15:15 Sektion I - Fruchtbarkeit beim Rind** 8
Leitung: H. Tenhumberg
-
- 14:15-14:30 Beziehungen zwischen Plasma Anti-Müller-Hormon (AMH) Konzentrationen von Holstein-Färsen und ihren späteren Fruchtbarkeitsparametern als Milchkuh** 9
A. Vernunft, A. Boldt, T. Viergutz, JM Weitzel - Dummerstorf
- 14:30-15:15 Antral follicle count of New Zealand registered Angus heifer ovaries and the correlation with fertility outcomes** 11
N. Sanderson, D. Robertson, H. Newton – New Zealand
-
- 15:15-16:00 Kaffeepause und Industrieausstellung**

Donnerstag, 8. Juni 2017

- 16:00-17:05 Sektion II** 12
In Vitro Produktion von Rinderembryonen
Leitung: C. Wrenzycki
-
- 16:00-16:15 Entwicklung von bovinen Embryonen auf differenzierten Eileiterepithelzellen: Erste Ergebnisse** 13
V.A. van der Weijden, S. Chen, S. Bauersachs, S.E. Ulbrich, J. Schön
Zürich, Dummerstorf
- 16:15-16:30 Zusatz von Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) zum Kulturmedium – Einflüsse auf die Entwicklungsrate und die Tiefgefriertauglichkeit von Rinderembryonen** 14
F. Hüter, E. Held-Hölker, F. Rings, D. Tesfaye, K. Schellander, M. Hölker
Bonn, Königswinter
- 16:30-16:45 Bildung von spermien-induzierten „Neutrophilen Extrazellular Traps (NETs)“ beim Rind** 16
T. Fichtner, F. Kotarski, J. Stöhr, T. Munoz-Caro, C. Hermosilla,
A. Taubert, C. Wrenzycki - Gießen
- 16:45-17:05 In vitro embryo production (IVEP) and pregnancy rates in Bos indicus heifers of Gir breed submitted to transvaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up)** 17
J.C. Gutiérrez-Anez, R. González-Fernández - Venezuela
-
- 17:05-17:20 Produktvorstellung des Sponsors: Worthington Cylinders GmbH, Kienberg, Österreich** 20
- 17:20 Wahl des neuen 2. Sprechers der AET-d (Praxis)**
- Pause**
- Ab 19:30 Abendveranstaltung im Hotel-Restaurant Schachner in Maria Taferl**

Freitag, 9. Juni 2017

- 8:30–10:15 Sektion III** 21
Berichte aus der Praxis
Leitung: A. Kuwer
-
- 8:30-9:00 Auswertung der Trächtigkeits- und Abkalbeergebnisse** 22
in einem Jungviehbetrieb mit Nutzung von ET und KB
J. Melbaum, H. Melbaum, M. Schwerhoff, M. Jung, K. Mense, S. Peter,
R. Waßmuth – Osnabrück, Haselünne, Borken, Bernau
- 9:00-9:15 Embryotransferaktivitäten in Ungarn** 24
T. Zubor und J. Seregi, Embryo Kft. Pecs, Ungarn
- 9:15-9:30 Zusammenfassung der diesjährigen kleinen Fachtagung** 25
„Embryotransfer beim Rind“ am IFN Schönow
K. Mense - Berlin
- 9:30-9:45 Überprüfung und Optimierung des Hygienekonzepts** 27
eines Embryotransferteams
F. Ippen, J. Detterer, J. Egberts, C. Gallert – Emden, Georgsheil
- 9:45-10:00 Effekt der Superovulation beim Rind auf die frühe** 29
Embryogewinnung und deren Weiterentwicklung in vitro
V. Havlicek, F. Rings, E. Held, K. Radefeld, S. Papp, D. Tesfaye,
K. Schellander, G. Brem, U. Besenfelder, M. Hölker – Wien, Bonn
- 10:00-10:15 Spontane Variabilität der Corpus luteum-Aktivität beim** 31
Rind; eine diagnostische Herausforderung
J. Schneebeili – Schweiz
-
- 10:15–11:00 Kaffeepause und Industrieausstellung**

Freitag, 9. Juni 2017

- 11:00-12:00 Sektion IV** 32
Endoskopie und Kaltlagerung
Leitung: M. Hölker
-
- 11:00-11:15 Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative** 33
zur Kryokonservierung
N. Blad-Stahl, F. Kotarski, H.-P. Nohner, C. Wrenzycki - Gießen
- 11:15-11:30 Kaltlagerung boviner Ovarien – eine Option zur** 35
Erzeugung boviner Embryonen in vitro nach
Langstreckentransport
M. Diederich, K. Roschlau, A. Kuwer, H. Grothmann – Nüchel, Loxstedt
- 11:30-11:45 Transvaginale Endoskopie zur Untersuchung boviner** 37
Eileiterflüssigkeit
S. Papp, K. Radefeld, V. Havlicek, M. Kösters, T. Fröhlich, G. Arnold,
G. Brem, U. Besenfelder – Wien, München
- 11:45-12:00 Endoskopisch geleitete intratubale Besamung beim Rind** 39
K. Radefeld, S. Papp, V. Havlicek, J.M. Morrell, G. Brem, U. Besenfelder
Wien, Schweden
-
- 12:00-12:10 Überlegungen zur Homepage der AET-d** 41
J. Detterer, U. Andresen – Georgsheil, Osteel
- 12:10 Verabschiedung**
Einladung zur 45. Jahrestagung AET-d in Mariensee
14. und 15. Juni 2018

Zusammenfassungen der Vorträge

Sektion I

Fruchtbarkeit beim Rind

Beziehungen zwischen Plasma Anti-Müller-Hormon (AMH) Konzentrationen von Holstein-Färsen und ihren späteren Fruchtbarkeitsparametern als Milchkuh

A Vernunft¹, A. Boldt², T Viergutz¹, JM Weitzel¹

¹Institut für Fortpflanzungsbiologie, Leibniz Institut für Nutztierbiologie, Dummerstorf

²Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Institut für Tierproduktion, Dummerstorf

Plasmakonzentrationen des Anti-Müller-Hormons (AMH), die ausschließlich von Granulosazellen erzeugt werden, reflektieren die Anzahl an Oozyten und die Anzahl an antralen Follikeln eines Rindes (auch als „Ovarielle Funktionsreserve“ bezeichnet, Monniaux et al., 2013). Die Einschätzung der ovariellen Funktionsreserve mittels der AMH-Spiegel kann helfen Tiergruppen zu identifizieren, die sich besonders gut oder auch schlecht für Reproduktionsbiotechnologien wie MOET oder OPU-IVF eignen (Vernunft et al., 2015). Studien aus den letzten Jahren deuteten an, das hohe AMH-Plasmawerte positiv mit der Fertilität eines (Milch-) Rindes korreliert sein könnten (Jimenez-Krassel et al., 2015; Ribeiro et al., 2014).

Mit dieser Untersuchung wollten wir prüfen, ob die AMH-Plasmakonzentrationen von HF-Färsen geeignet sind um Voraussagen über ihre spätere Fertilität als Milchkuh zu tätigen.

Dazu wurden in 923 Blutproben von postpubertären HF-Jungsrindern ($16 \pm 2,3$ Monate) aus fünf Herden mittels humanen, aber für bovine Proben validierten ELISA-Kit (DSL-10-144400, Beckman Coulter, USA) die AMH Konzentrationen bestimmt und mit diversen Daten aus den Betrieben in Beziehung gesetzt.

Durchschnittlich wurde eine AMH-Konzentration von 0.493 ± 0.3 ng/ml bei den Färsen festgestellt. In einem ersten Schritt der Auswertung haben wir mögliche individuelle oder betriebliche Einflussgrößen auf die AMH-Konzentrationen der Tiere geprüft. Wir konnten keine signifikante Effekte des Herkunftsbetriebes, Alters, Gewicht, Widerristhöhe, BCS, der Progesteronkonzentration oder des Trächtigkeitsstatus zum Zeitpunkt der Probengewinnung oder der späteren Milchleistung, Fett- und Proteingehalt der Milch auf die AMH-Werte feststellen ($r < 0.1$, $p > 0.1$). Im nächsten Schritt haben wir Zusammenhänge zwischen den AMH-Werten der Jungtiere und ihren Fertilitätsparametern als Färse und denen aus ihrer ersten Laktation analysiert. Dazu standen 672 vollständige Datensätze zur Verfügung. Wir konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den AMH-Werten der Färsen und ihren Erstbesamungsalter, Besamungsindex oder Erstkalbealter feststellen.

Ebenfalls konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den AMH-Werten der Färsen und ihren späteren Rast- und Gützeiten oder dem Besamungsaufwand und den Konzeptionsraten in der ersten Laktation festgestellt werden ($r < 0.1$, $p > 0.1$).

Unsere Ergebnisse unterstützen die Auffassung, dass der individuelle AMH-Wert eines Tieres weitestgehend unabhängig von äußeren und inneren Faktoren ist und eine einmalige Beprobung als repräsentativ gelten kann (Gobikrushanth et al., 2017; Pfeiffer et al., 2014; Ribeiro et al., 2014). Im Gegensatz zu anderen kleineren Studien (Jimenez-Krassel et al., 2015; Ribeiro et al., 2014) sahen wir an unserem relativ umfangreichen Daten keinen Zusammenhang zwischen den AMH-Werten der Färsen und ihren späteren Fertilitätsleistungen. Daher erscheint uns der einmalig an Jungrindern mit einem humanen AMH ELISA-Kit gemessene AMH-Wert nicht als Biomarker geeignet um die Fruchtbarkeit eines Tieres objektiv einschätzen zu können. Vielleicht würde ein anderes Schema zur Probennahme oder die Verwendung eines speziellen bovinen AMH-ELISA-Kits zu anderen Ergebnissen führen (Arouche et al., 2015).

Da der AMH-Wert nur eine geringe Aussage über die individuelle Fruchtbarkeit eines Rindes zulässt, scheint auch eine Beurteilung von ET-Rezipienten mittels AMH wenig erfolgsversprechend.



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

Antral follicle count of New Zealand registered Angus heifer ovaries and the correlation with fertility outcomes

Neil Sanderson, BVSc, MVSc¹
Dave Robertson BVSc (dist), BSc²
Dr Hamish Newton PhD, BVSc²

Study sponsor: Beef + Lamb New Zealand Genetics

¹ Advanced Genetics Limited, 100 Paradise Gully Road, Otago
neilsanderson27@gmail.com

² Veterinary Centre – Oamaru, 311 Thames Street Oamaru
hamish@vet111.co.nz, dave@vet111.co.nz

Abstract

This study measured the antral follicle counts (AFC) with ultrasound on the ovaries of rising two year old pedigree Angus heifers from 13 herds throughout New Zealand. The relationship between the AFC and the pregnancy status of these animals was then examined.

The study findings were that heifers with high AFC had a higher pregnancy rate than those with a low AFC.

Naturally mated heifers with high AFC had higher pregnancy rate in the first cycle and will calve earlier than those with medium and low AFC. Heifers with high AFC and which were inseminated with frozen semen via fixed time insemination (FTAI) had a higher pregnancy rate than those with medium or low AFC.

Therefore it can be concluded that heifers with a higher ovarian antral follicle count achieve greater in-calf rates and will tend to calve earlier through better first service conception rates.

In this study, the spread of AFC scores within each group of Angus heifers was examined. The proportion of high AFC heifers within a farm was not associated with the farm's pregnancy rate. However, on 12/13 farms sampled, the high AFC heifers had better pregnancy rates than the low AFC heifers on that farm.

The AFC of a heifer, has been described as a relatively constant parameter and appears to be a predictor of reproductive performance. As it can be objectively measured it could well become a standard breeding tool in order to select higher fertility heifers before mating as a yearling.

This study has concluded that AFC is associated with reproductive outcomes in Angus heifers. We postulate that it is possible that this technology could become part of the estimated breeding values (eBVs) measured in pedigree and performance recorded cattle. If an eBV for AFC can be generated it will give farmers further options on which to base selection pressure for the elusive fertility traits.

AFC could be used to gather data on herds with lower than desirable reproductive success. Many environmental and management factors contribute to beef cattle in-calf rates. However there are currently no methods to identify genetic influence in beef cattle on the pregnancy outcomes.

Sektion II

In Vitro Produktion von Rinderembryonen

Entwicklung von bovinen Embryonen auf differenzierten Eileiterepithelzellen: erste Ergebnisse

VERA A. VAN DER WEIJDEN¹, SHUAI CHEN², STEFAN BAUERSACHS¹, SUSANNE E. ULBRICH¹, JENNIFER SCHOEN²

¹ETH Zürich, Departement Umweltsystemwissenschaften, Institut für Agrarwissenschaften, Forschungsgruppe Tierphysiologie; ²Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Institut für Fortpflanzungsbiologie

Wir konnten kürzlich ein Air-Liquid-Interphase basiertes Kultursystem für die Langzeitkultivierung von bovinen Eileiterepithelzellen (ALI-BOEC) entwickeln. Die Zellen sind hochdifferenziert und generieren nach vier Wochen Kulturdauer eine Art „Eileiterflüssigkeit“. Das In-vitro-Modell erlaubt in Kokultur (ohne Zugabe von Embryokulturmedium) die Entwicklung von Zygoten bis zum Blastozystenstadium.

Für eine initiale Charakterisierung der so entstandenen Embryonen wurde im Achtzell- und Blastozystenstadium die RNA-Expression von 41 Genen mittels 48.48 Dynamic Array™ auf einem Biomark HD Instrument gemessen. Als Vergleich wurden konventionell erzeugte IVP-Embryonen, sowie ein im Internet verfügbarer Transkriptom-Datensatz (GSE12327) von bovinen In-vivo-Embryonen herangezogen. Die Re-Analyse dieses Datensatzes ergab, dass die In-vivo-Expression von sechzehn der ausgewählten Gene zwischen dem Achtzellstadium und dem Blastozystenstadium signifikant reguliert war. Die In-vitro-Embryonen zeigten hinsichtlich dieser Gene ähnliche Expressionsmuster wie die In-vivo-Embryonen. Sowohl bei den Achtzellern als auch bei den Blastozysten führten die unterschiedlichen Kulturbedingungen zu differentieller Genexpression (Achtzeller: *CDH1*, *NOS2*, *OVGP1*, *APEX1*, *REX1*, *PLAGL*, *BAX*, *SREBP1*, *SMPD2*; Blastozysten: *CCL26*, *CDH1*, *NID2*, *IFNAR1*, *SLC2A5*, *SREBP1*, *SERPINE1*, *LDLR*, *CYP51A1*). Fünf der Gene, die im Blastozystenstadium in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen von den Embryonen differentiell exprimiert wurden (*LDLR*, *CDH1*, *NID2*, *SLC2A5* und *CYP51A1*), sind bereits aus früheren Publikationen als zwischen In-vivo- und In-vitro-Blastozysten differentiell exprimiert bekannt. Die im ALI-BOEC System erzeugten Embryonen zeigten bei allen fünf Genen ein eher in-vivo-ähnliches Expressionsmuster.

Da ein direkter Vergleich mit in-vivo-produzierten Embryonen fehlt, muss die biologische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse sehr vorsichtig diskutiert werden. Das ALI-BOEC Kokultursystem ist hinsichtlich der Entwicklungsraten bisher wesentlich weniger effizient als herkömmliche IVP Systeme. Um das System zu optimieren, wird zurzeit ein Protokoll zur Hormonstimulation der Epithelzellen etabliert, welches das dynamische hormonelle Millieu und die daraus resultierenden Veränderungen der Funktion des Eileiterepithels in den ersten Zyklustagen simuliert. Weiterhin könnte ein sequentielles Kultursystem, dass aus Eileiter- und Uterusepithelzellen besteht, die Effizienz der Kokultur sowohl quantitativ als auch qualitativ erhöhen.

Zusatz von Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) zum Kulturmedium - Einflüsse auf die Entwicklungsrate und die Tiefgefrierfähigkeit von Rinderembryonen.

HUETER F.^{1,2}, HELD-HÖLKER E.^{1,2}, RINGS F.^{1,2}, TESFAYE D.², SCHELLANDER K.², HÖLKER M.^{1,2}

¹ *Versuchsstation Frankenforst, Landwirtschaftliche Fakultät, Universität Bonn, Königswinter;*

² *Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Universität Bonn, Bonn*

Die In vitro Produktion (IVP) von Rinderembryonen stellt eine seit langem etablierte Methodik darstellt. Dennoch unterscheiden sich Rinderblastozysten aus der IVP hinsichtlich ihrer Tiefgefrierfähigkeit deutlich von In vivo entwickelten Blastozysten. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass der Zusatz von Serum zum Kulturmedium einerseits einen erhöhtem Lipidgehalt und andererseits eine reduzierte Kryotauglichkeit der Rinderblastozysten bedingt. Darüber hinaus konnten wir kürzlich in einer Studie zeigen, dass neben dem Lipidgehalt insbesondere der Gehalt an freien Radikalen (Reactive Oxygen Species, ROS) innerhalb der Embryonen mit deren Tiefgefrierfähigkeit korreliert. Neuere Studien legen darüber hinaus nahe, dass der Gehalt an freien Radikalen zusätzlich durch Endoplasmatischem Retikulum Stress (ER-Stress) erhöht wird. ER-Stress wiederum kann durch Zusatz von Serum zum Kulturmedium ausgelöst werden. Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb den Einfluss von Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), einem Inhibitor für ER-Stress, auf die frühembryonale Entwicklung von Rinderembryonen sowie auf deren Tiefgefrierfähigkeit zu untersuchen.

Hierzu wurden in vitro produzierte Rinderzygoten in einem Vorversuch zufällig in 5 Gruppen zu jeweils ~60 Embryonen aufgeteilt und unter Standardbedingungen (5% CO₂, 20% O₂, 38,5 °C) in 400µl SOFaa + 0,6% BSA Medium unter Mineralöl bis Tag 9 weiterkultiviert wobei den verschiedenen Experimentellen Gruppen TUDCA in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 25, 50, 100 & 200 µM) zugesetzt wurde. Hierbei zeigte sich, dass der Zusatz von TUDCA im Rahmen der von uns gewählten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Entwicklung der Rinderembryonen ausübte.

In einem weiteren Experiment teilten wir in vitro produzierte Zygoten zufällig in 2 Gruppen zu jeweils ~60 Embryonen auf und kultivierten diese in 400µl SOFaa + 10% Serum unter Mineralöl (5% CO₂, 20% O₂, 38,5 °C) entweder unter Zusatz von 200 µM TUDCA (TUDCA) oder ohne weiterem Zusatz (Kontrolle) bis Tag 9 weiter. Hierbei zeigte sich, dass der Zusatz von TUDCA zu einem Kulturmedium welches Serum (10%) enthält die Blastozystenraten an Tag 8 und Tag 9 signifikant erhöht (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einfluss von TUDCA-Zusatz (200 µM) zum Embryokulturmedium auf die weitere Entwicklung von Rinderembryonen in vitro

	Replikate	total	Entwicklungsrate zur Blastozyste			
			Teilung	Tag7	Tag8	Tag9
Kontrolle	10	616	82,7%	21,2 %	31,2 % ^a	35,8 % ^a
TUDCA	10	614	84,8%	23,8 %	37,5 % ^b	42,2 % ^b

(a:b : p<0,05, ANOVA)

In einem finalen Experiment wurden dann expandierte Tag 7 Blastozysten aus der Kontroll- und der TUDCA-Gruppe nach einem Standardverfahren in Ethylenglycol kryokonserviert (Seeding bei -6°C, schrittweises Abkühlen um 0,5 °C / sec) und nach mindestens 1 Woche wieder aufgetaut (5 Sekunden an der Luft, 15 Sekunden in 25°C warmen Wasser) und in SOFaa+10% Serum für 86h weiterkultiviert um die gruppenspezifischen Überlebens- und Schlupfraten zu ermitteln. Hierbei zeigte sich, dass Embryonen welche sich unter Zusatz von TUDCA zur Blastozyste entwickelt hatten eine signifikant höhere Überlebensrate (Abb.1) und eine signifikant höhere Schlupfrate (Abb.2) nach dem Auftauen aufwiesen.

Abb. 1: Einfluss von TUDCA auf die Überlebensrate nach

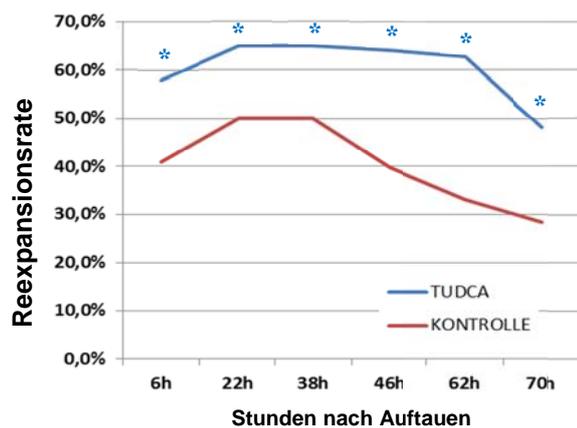
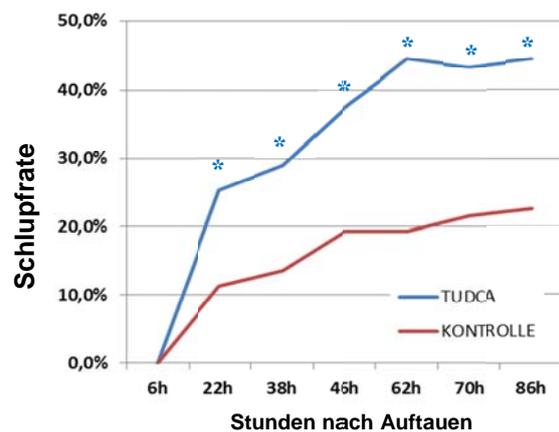


Abb. 2: Einfluss von TUDCA auf die Schlupfrate nach



*: Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.05$)

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass der Zusatz von TUDCA zu einem Medium welches 10% Serum enthält eine signifikant höhere Blastozystenrate und ebenso eine signifikant verbesserte Tiefgefriertauglichkeit der Embryonen bedingt. Weitere Studien zur Aufklärung der Mechanismen sind beabsichtigt.

Bildung von spermien-induzierten "Neutrophilen Extrazellular Traps (NETs)" beim Rind

Theresa Fichtner^{1,2}, Franziska Kotarski¹, Judith Stöhr¹, Tamara Muñoz-Caro², Carlos Hermosilla²,
Anja Taubert², Christine Wrenzycki¹

¹*Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere,
Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen*

²*Institut für Parasitologie, Justus-Liebig-Universität Gießen*

Tierartlich unterschiedlich wird das Sperma beim Deckakt an divergenten Stellen im weiblichen Genitaltrakt abgesetzt. Das Ejakulat wird bei den Scheidenbesamern, zu denen Rind, Schaf und Ziege zählen, im kranialen Bereich der Vagina und bei den Uterusbesamern, wie Schwein und Pferd, transzervikal in den Uterus appliziert. Bei Durchführung einer instrumentellen Besamung hingegen wird die Besamungsdosis intrauterin platziert. Somit gelangen neben den Spermien auch Bestandteile des Verdünners sowie Anteile des Seminalplasmas in den Uterus, die unter natürlichen Bedingungen bei den Scheidenbesamern in der Vagina verbleiben. Polymorphkernige mononukleäre Granulozyten (PMN) gehören zu den Immunzellen, die im Rahmen einer nicht-adaptiven Immunreaktion als erste Zellpopulation am Ort des Geschehens mit Abwehrreaktionen gegen Fremdartige reagieren. PMN besitzen neben der Fähigkeit zur Phagozytose oder Sekretion immunmodulatorischer Moleküle einen gegen extrazelluläre Pathogene gerichteten Effektormechanismus, die Ausbildung sog. "Neutrophil Extracellular Traps (NETs)".

Im Rahmen des Zelltods der PMN kommt es zur NADPH-Oxidase-abhängigen Freisetzung von mit Effektormolekülen [wie neutrophiler Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO) oder Histonen (H1, H2A/H2B, H3, H4)] bestücktem Chromatin. Somit bestehen NETs aus einem DNA-Grundgerüst, das mit Histonen, Proteasen und antimikrobiellen Peptiden (AMPs) assoziiert ist und nach seiner Freisetzung in den extrazellulären Raum wie eine Art Spinnennetz zum Abfangen von Pathogenen dient. In der Literatur wird berichtet, dass sowohl equine als auch bovine Spermien bzw. Seminalplasma NETs induzieren können.

Über einen Ficoll®-Gradienten wurden bovine PMN gewonnen. Diese wurden mit Spermien, sechs verschiedenen Verdünnern oder Seminalplasma (SP) in unterschiedlichen Konzentrationen (1%, 5%, 10%) von Jung- und Altbullen inkubiert. Die Quantifizierung der NETs-Induktion erfolgte über eine fluoreszenzbasierte Messung extrazellulärer DNA.

Die Konfrontation der PMN mit Tiefgefrier- (TG) und Frisch-Sperma führte zu einer signifikanten Bildung von NETs. Wie erwartet, wurde diese Reaktion über den Zusatz von DNase I gehemmt. Auch durch den Zusatz eines NADPH-Oxidase-Hemmers konnte eine Reduktion der NETs-Bildung erreicht werden. Untersuchungen bezüglich der Kinetik zeigten, dass die Induktion der NETs bereits nach einer Stunde abgeschlossen war. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Motilität der Spermien keinen Einfluss auf die Stärke der NETs-Induktion hat. Spermien allein bewirkten im Vergleich zu der gesamten Besamungsportion oder auch dem abzentrifugierten Überstand ohne Spermien eine geringere NETs-Bildung. Alle getesteten Verdüner riefen eine NETs-Induktion hervor. Die NETs-Bildung durch SP von Jung- und Altbullen war ähnlich. Bereits ab einem Anteil von 1% SP wurde die NETs-Bildung ausgelöst.

Die Ergebnisse zeigen, dass SP die Bildung der NETs bereits in geringen Konzentrationen auslöst und dass diese Reaktion unabhängig vom Alter des Bullen ist.

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

***In vitro* embryo production (IVEP) and pregnancy rates in *Bos indicus* heifers of Gir breed submitted to transvaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up)**

Juan C. Gutiérrez-Añez^{1*}, Rumualdo González-Fernández².

¹ *Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento Médico Quirúrgico. Cátedra de Ginecología y Obstetricia Veterinaria.*

² *Venezolana de Inseminación Artificial y Transferencia de Embriones (VIATECA).*

*Corresponding author: juan.gutierrez@fcv.luz.edu.ve

Introduction

Gir breed (*Bos indicus*), constitutes for some to be a really productive cattle under grazing tropical conditions. Some improved genetic lines in Brazil have reached peaks of production of 60 liters of milk per day. In addition, *Bos indicus* cattle have a higher potential for the production of embryos through OPU and IVF than *Bos taurus* cattle (Pontes et al., 2010). The aims of this study were (i) to evaluate the potential of oocytes yield, (ii), performance and factors which affected of in vitro embryo production (IVEP) of *Bos indicus* heifers of Gir breed submitted to transvaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up).

Materials and methods

The study was developed in a tropical dry forest (N: 10° 12.110' and W: 072° 24.126'). 27 heifers of Gir breed with 24-36 months of age were subjected to repeated Ovum Pick up (OPU) and in vitro fertilization (IVF) sessions (OPU-IVF session). Animals were maintained under the same nutrition, management, and environmental conditions. Heifers were submitted to four consecutive OPU trials with an interval of approximately 21 days between sessions. The cumulus-oocyte-complex (COCs) was classified according to quality as follows: Grade 1, Grade 2, Grade 3 and grade 4. Quality COCs, 1 and 2 were regarded as feasible and quality 3 and 4 as not viable. IVF was performed using semen from different bulls (Gir, n = 3 (*Bos indicus*), Black Holstein: BH, n = 2 and Red Holstein: RH, n = 2 (*Bos taurus*). The variables evaluated were: number of total oocytes (COCs total), number of viable oocytes (COCs viable), COCs viability (%), number (N°) of blastocysts, blastocysts rate (BR) (%), number of pregnancies per session (PS) and pregnancy rates (PR) (%) per donor. All variables (continuous data) as COCs total, COCs viable, COCs viability (%), number of blastocysts, blastocysts rate (BR) (%), pregnancies per session (PS), were analyzed by ANOVA using a mixed model (PROC MIXED procedure of SAS, Version 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, 2001); considering the effect of the donor, OPU-FIV session (S1, S2, S3, S4), and their interactions. Replicate and interactions among the previous variables were considered as fixed effects in the statistical model. Statistical analyses for pregnancy rate (PR) (categorical data) were performed through logistic regression using Proc Logistic of SAS. Differences were defined as P<0.05 (P-values less than 0.05 were considered significant).

Results

General mean and the effects of OPU-FIV session and individual donor comparisons (higher versus lower) on all variables evaluated are shown in Table 1. OPU-IVF session affected the means per donor of COCs total ($P=0.0366$), COCs viable ($P=0.0358$), number (N°) of blastocysts ($P=0.0396$), blastocysts rate (BR) ($P=0.0240$), number (N°) of blastocysts per session ($P=0.0001$), number of pregnancies per session (PS) ($P=0.0040$) and pregnancy rate (PR) ($P<0.0001$). COCs viability was not affected by the OPU-IVF session ($P=0.3364$). Donor showed significant effect on COCs total ($P=0.0001$), COCs viable ($P=0.0001$), COCs viability ($P=0.0002$), number of blastocysts ($P=0.0002$), pregnancies per session (PS) ($P=0.0365$) and global pregnancy rate (PR) ($P=0.0167$). Blastocysts rate (BR) was not affected by donor ($P=0.3332$) (Table 1). Donors' variables which affecting the number of pregnancies per session were: COCs viable ($P=0.0376$) and COCs viability ($P=0.0023$); while COCs total had no significant effect ($P=0.2466$). Additionally, the effect of breed of the bull and individual bull on the number of blastocysts, blastocysts rate (BR), number of pregnancies per OPU-FIV session (PS) and pregnancy rates (PR) are shown in Table 2. The breed of the bull shown a significant effect on the number of blastocysts ($P=0.0045$), and on the blastocysts rate (BR) ($P=0.0012$), but was no affect the pregnancies per session (PS) ($P=0.1039$) and pregnancy rates (PR) ($P=0.8039$). Individual bulls influenced the number of blastocysts ($P=0.0030$) and blastocysts rate (BR) ($P=0.0001$), but had no effect on the number of pregnancies per session (PS) ($P=0.2968$), or on the pregnancy rate (PR) ($P=0.8317$).

Conclusions

In conclusion, dairy Gyr breed (*Bos indicus*) heifers subjected to Ovum Pick up (OPU) showed to be an alternative with a high potential for bovine embryo production. Furthermore, a high variability between donors was found, suggesting that intrinsic genetic factors, regardless of breed, are involved in the efficiency of in vitro embryo production. Pregnancy rate and number of pregnancies per session were affected in an important manner by COCs viability, factors involve in this way should be investigated in depth. Finally, the breed of the bull and individual bulls affected the efficiency of in vitro production of embryos in *Bos+ indicus* heifers of Gir Breed.

Table 1. Effect of session and donors category on number of COCs retrieved (total, viable), COCs viability, number of blastocysts, blastocyst rate (BR), number pregnancies per session (PS) and pregnancy rates (PR) in *Bos indicus* heifers of Gir breed submitted transvaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up) and *in vitro* fertilization (IVF).

Variable	Item category								
	General Mean	OPU-FIV session				<i>P value</i>	Individual donor effect		
		S1	S2	S3	S4		Category		<i>P value</i>
						Higher	Lower		
COCs total	19.4±2.1	20.3±1.1 ^a	18.8±1.1 ^{ab}	16.9±1.1 ^b	21.4±1.1 ^a	P=0.0366	42.0±2.9 ^b	6.5±2.9 ^o	P<0.0001
COCs viable	15.7±2.8	17.6±1.1 ^c	15.8±1.1 ^{cd}	13.1±1.1 ^d	16.4±1.1 ^c	P=0.0358	34.0±2.9 ^p	3.8±2.9 ^q	P=0.0001
COCs viability (%)	70.9 %	72.5±2.7	74.0±2.7	68.2±2.7	68.9±2.7	P=0.3364	87.3±7.8 ^f	49.3±6.7 ^s	P=0.0002
N° of Blastocysts	4.2±1.5	4.8±0.6 ^f	5.0±0.6 ^f	3.9±0.5 ^{fg}	2.9±0.6 ^g	P=0.0001	9.3±1.5 ^t	0.8±1.5 ^u	P=0.0002
BR (%)	27.3 %	32.4±3.8 ^h	32.3±3.7 ^h	26.3±3.7 ^{hi}	18.1±3.7 ⁱ	P=0.0240	50.0±9.6 ^{*v}	9.9±9.6 ^{*w}	P= 0.0041
PS	0.6±0.4	0.3±0.1 ^j	1.1±0.1 ^k	0.5±0.1 ^j	0.4±0.1 ^j	P=0.0040	2.3±0.6 ^x	0.09±0.4 ^y	P=0.0365
PR (%)	27.9 %	5.8±5.5 ^l	36.1±5.5 ^m	31.1±5.9 ^m	37.6±6.2 ^m	P<0.0001	66.7 % ^z	7.1% ^β	P= 0.0167

Mean with different superscript into rows within category differ significantly. *vw The General effect of blastocyst rate was not affected significantly by donor (P=0. 3332). OPU-FIV session (S1, S2, S3, and S4): Sessions (S) 1 to 4. BR: Blastocysts rate. PS: Pregnancies per OPU-FIV session. PR: Pregnancy rate (%).

Table 2. Effect of breed of the bull and individual bulls on number of blastocysts, blastocyst rate, number pregnancies and pregnancy rates in *Bos indicus* heifers of Gir breed submitted to transvaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up) and *in vitro* fertilization (IVF).

Variable	Item category						
	Breed of the bull			<i>P value</i>	Individual bulls effect		
	Gir	BH	RH		Category		<i>P value</i>
				Higher	Lower		
N° of Blastocysts	5.0±0.4 ^a	3.94±0.8 ^{ab}	2.28±0.7 ^b	P=0.0045	5.9±0.6 ^e	0.81±0.5 ^f	P=0.0030
BR (%)	32.19±2.4 ^c	26.5±4.4 ^c	15.14±3.8 ^d	P=0.0012	37.94±3.2 ^g	7.1±5.3 ^h	P<0.0001
PS	0.63±0.1	0.80±0.1	0.21±0.1	P= 0.1039	0.87±0.3	0.11±0.2	P=0.2968
PR (%)	25.4±3.8	31.1±8.0	28.1±7.2	P= 0.8039	35.7±11.9	23.5±5.6	P=0.8317

Mean with different superscript into rows within category differ significantly. Gir: Gir breed, BH: Black Holstein; RH: Red Holstein. BR: Blastocysts rate. PS: Pregnancies per OPU-FIV session. PR: Pregnancy rate (%).

**Produktvorstellung des Sponsors:
Worthington Cylinders GmbH, Kienberg, Österreich**

Ohne Abstract - Platz für Ihre Notizen

Sektion III

Berichte aus der Praxis

Auswertung der Trächtigkeits- und Abkalbeergebnisse in einem Jungviehbetrieb mit Nutzung von ET und KB

J. Melbaum¹, H. Melbaum², M. Schwerhoff³, M. Jung⁴, K. Mense⁴, S. Peter⁴ und R. Waßmuth¹

¹ Hochschule Osnabrück, Oldenburger Landstr. 24, 49090 Osnabrück

² MASTERRIND GmbH, Feldstr. 22, 49740 Haselünne

³ Rinder-Union West (RUW) eG, Vardingholter Str. 21, 46325 Borken

⁴ Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere (IFN) e.V., Bernauer Allee 10, 16321 Bernau

Bei der durchgeführten Analyse eines Jungrinderbestandes in Niedersachsen wurden 656 Belegungen bei 398 Tieren erfasst. Diese Belegungen umfassten in einem Zeitraum von zwei Jahren 410 Transfers von in vivo gewonnenen Embryonen (frisch (245) bzw. TG (165)) sowie 246 Belegungen durch künstliche Besamung. Neben den Trächtigkeitsraten entsprechend den genannten Belegarten sind auch die Abort- und Totgeburtenrate sowie der Trächtigkeitserfolg in Abhängigkeit der Belegnummer analysiert worden. Das Ziel der Untersuchung bestand zum einen in der Bestimmung der Fruchtbarkeitskennzahlen, darüber hinaus wurde auch beabsichtigt, mögliche Erkenntnisse für die effizientere Nutzung der Empfängertiere bei zukünftigen Belegungen zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Analyse lag die Trächtigkeitsrate nach Erstbelegung insgesamt bei zufriedenstellenden 60,7 Prozent. Bei der detaillierten Betrachtung lagen die Trächtigkeitsraten bei der Belegung mit nicht kryokonservierten Embryonen (ET frisch) bei 58 Prozent, mit kryokonservierten Embryonen (ET TG) bei über 40 Prozent und bei der künstlichen Besamung (KB) bei größer 76 Prozent (Tab. 1).

Tabelle 1: Belegungen und Trächtigkeiten (n, %) für die verschiedenen Belegarten

	Belegungen (n)	Belegungen (%)	Trächtigkeiten (n)	Trächtigkeiten (%)
ET frisch	245	37,3 %	142	58,0 %
ET TG	165	25,2 %	67	40,6 %
KB	246	37,5 %	189	76,8 %
Summe	656	100 %	398	60,7 %

Eine weitere Erkenntnis der Auswertung liegt darin, dass mit zunehmender Belegnummer bei der Belegung mittels ET frisch oder TG die Trächtigkeitsraten um bis zu zehn Prozent je Belegung absinken. Diese Beobachtung konnte hingegen bei der künstlichen Besamung der erfassten Tiere nicht gemacht werden. Daraus ergibt sich die Empfehlung für die Praxis, bei der Übertragung von Embryonen möglichst die erste Belegung zu nutzen (Tab. 2).

Tabelle 2: Anzahl Beobachtungen (n) und Trächtigkeitsergebnisse (%) für unterschiedliche Belegarten in Abhängigkeit von der Belegnummer

	Belegnummer				
	1	2	3	4	5
ET frisch übertragen (n)	162	54	21	7	1
ET frisch tragend (n)	99	29	8	6	0
Trächtigkeit (%)	61 %	54 %	38 %	86 %	0 %
ET TG übertragen (n)	104	41	15	5	
ET TG tragend (n)	47	14	4	2	
Trächtigkeit (%)	45 %	34 %	27 %	40 %	
KB (n)	95	67	43	27	14
KB tragend (n)	72	52	30	21	14
Trächtigkeit (%)	76 %	78 %	70 %	78 %	100 %

Bei der Überprüfung der Abortraten konnten deutliche Unterschiede zwischen ET- und KB-Trächtigkeiten festgestellt werden. Die Abortraten für die Belegung mittels Embryonen, unabhängig davon ob diese kryokonserviert waren oder nicht, lag in der durchgeführten Auswertung fünffach über der Abortrate von Tieren, die mittels KB belegt waren. Die Totgeburtenrate ist bei beiden Gruppen annähernd identisch (Tab. 3).

Tabelle 3: Lebend-, Totgeburten und Aborte (n, %) der entsprechenden Belegart

Belegart	Lebend- geburten (n)	Lebend- geburten (%)	Totgeburten (n)	Totgeburten (%)	Aborte (n)	Aborte (%)
ET frisch	109	77 %	10	7 %	23	16 %
ET TG	53	79 %	4	6 %	10	15 %
KB	167	88 %	17	9 %	5	3 %
Summe	329	83 %	31	8 %	38	9 %

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass besonders für den ET die Nutzung der Erstbelegung die effektivste ist und deshalb in der Praxis angestrebt werden sollte. Weiterhin ist zu beachten, dass die Abortraten nach ET gegenüber der künstlichen Besamung deutlich erhöht sind.

Embryotransfertigkeiten in Ungarn

T. Zubor und J. Seregi, Embryo Kft. Pecs, Ungarn

Ohne Abstract - Platz für Ihre Notizen

Zusammenfassung der diesjährigen kleinen Fachtagung „Embryotransfer beim Rind“ am IFN Schönow

K. Mense¹; J. Detterer²

¹ IFN Schönow e.V., Bernau bei Berlin

² Besamungs- und ET-Station Georgsheil, VOST Südbrookmerland

Die diesjährige kleine Fachtagung „Embryotransfer beim Rind“ fand am Freitag, den 12.05.2017 am IFN in Schönow statt. Nach einem gemeinsamen Begrüßungsimbiss hatten die angereisten ET-Praktiker die Möglichkeit das Gendiagnostische Labor des Instituts zu besichtigen. Begleitet wurden sie hierbei von Herrn Dr. Jung, Direktor des IFN und Frau Dr. Wagener, Leiterin des gendiagnostischen Labors. Sie erläuterten die praktischen Abläufe und standen für Fragen und Diskussionen zu molekularen Methoden in der Tierzucht zur Verfügung. Das gendiagnostische Labor hat momentan einen Probendurchsatz von wöchentlich 3000 SNP-Typisierungen.

Nach der Laborbesichtigung fanden sich alle Gäste im pünktlich fertiggestellten neuen Lektionsraum des Instituts ein. Den Anfang des Vortragsprogrammes machte Herr R. Becker, der zusammen mit seinem Bruder den Wagyu-Zucht-Betrieb „Wagyu Thüringen Becker & Becker GbR“ (eigene Vermarktung: Genusswert) in Friedrichswerth leitet und ausbaut und dabei vor allem auf Embryotransfer setzt. Er gab den sehr interessierten Tierärzten einen umfassenden Einblick in die Zucht der Kobe-Rinder, dessen Fleisch als bestes und teuerstes der Welt gilt. Seine eigenen Zuchtziele sind besonders gute Mutterkuheigenschaften, eine gute Schlachtkörperausbeute und tägliche Zunahmen. Außerdem berichtete er zusammen mit Herrn Dr. Leonhardt von seinen Erfahrungen mit Embryotransfer bei dieser Rinderrasse. Hier die Ergebnisse der Spülungen und Transfers auf seinem Betrieb (Tab. 1.):

Spülungen 2016	Ø transfert. Embryonen/Spülung	Anwachsrate Frischtransfer	Anwachsraten TG-Embryonen
25	7,1	62%	41%

Tab. 1: ET Spül- und Transferergebnisse auf dem Betrieb Wagyu Thüringen Becker & Becker GbR

Anschließend stellte Herr Dr. Melbaum, Masterrind die ET Spül- und Transferergebnisse eines von seinem ET-Team betreuten Wagyu-Betriebes vor (Tab. 2.) und berichtete von seinen Erfahrungen vor allem bei Spülungen von Jungrindern und bedeutenden Einflussfaktoren auf deren Erfolg.

Spülungen insges.	Ø transfert. Embryonen/Spülung	Anwachsrate Frischtransfer und TG-Embryonen (D)	Anwachsrate TG- Embryonen (AUS)
17	3,6	75%	50%

Tab. 2: ET Spül- und Transferergebnisse auf Wagyu-Betrieb im Emsland, Auswertung für den Zeitraum 01.10.2015 – 18.04.2017, D: Deutschland – MAR, AUS: australische Import-Embryonen

Danach rückte das Thema „Superovulation“ in den Fokus der Tagungsrunde. Herr Dr. Detterer, VOST schilderte aktuelle Erfahrungen mit dem Einsatz von Folltropin[®], die er zusammen mit seiner Kollegin Frau J. Egberts und dem Kollegen Herrn P. Henningsen, ET-Service Schleswig- Holstein dokumentiert und ausgewertet hat. Er berichtete von 7,6 transfertauglichen Embryonen nach Superovulation mit Pluset[®] bei 118 Rinderspülungen im Zeitraum: 01.07.2015 bis 30.04.2016.

Danach kam es zu einer Verschlechterung der Ergebnisse und dem verstärkten Einsatz von Folltropin®. Er stellte die verwendeten Superovulationsschemata vor und verglich die eigenen Erfahrungen mit bereits in der Literatur dokumentierten Studien. Die Ergebnisse (Tab. 3. und 4.) seiner Auswertung stießen auf reges Interesse. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Superovulationsbehandlungen mit Folltropin® (Frühjahr 2017) und Pluset® (Herbst/Winter 2016) nicht im gleichen Zeitraum stattfanden.

	Embryonen/ Eizellen gesamt	Embryonen tauglich	Eizellen unbefruchtet	Embryonen degeneriert	Anzahl Spülungen
Folltropin® gesamt	13,5	9,6	2,7	1,2	33
-Rinder	13,8	10	2,5	1,3	30
-Kühe	10,3	5	5	0,3	3
Pluset® gesamt	9,4	5,7	2,6	1	122
-Rinder	8	5,5	0,9	1,4	52
-Kühe	10,4	5,8	3,8	0,8	70
Gesamt	10,3	6,5	2,6	1,1	155

Tab. 3.: Spülergebnisse (VOST) nach Superovulationsbehandlung mit Folltropin® im Vergleich zu Pluset®, bitte beachten: nicht komplett gleiche Zeiträume der Behandlung

	Embryonen/Eizellen gesamt	Embryonen tauglich	Anzahl Spülungen
Folltropin® gesamt	10,2	7,3	93
-Rinder	10,7	7,9	68 (ca. 50% Wagyu)
-Kühe	9,8	5,7	25
Pluset® gesamt	5,2	2,9	24
-Rinder	6,1	3,3	15
-Kühe	3,6	2,1	9

Tab. 4.: Spülergebnisse (ET-Service S-H) nach Superovulationsbehandlung mit Folltropin® (bis September 2016) im Vergleich zu Pluset® (ab Oktober 2016)

Danach fand unter der Leitung von Dr. Küchenmeister, BioS GmbH eine angeregte Diskussion über verschiedene Details der Superovulationsbehandlung und der anschließenden Besamung statt. Es wurde unter anderem besprochen, zu welchem Zeitpunkt nach der Superovulationsbehandlung optimalerweise mit gesextem Sperma besamt werden sollte, welche Erfahrungen zum Einsatz von Dinolytic® 12-16 h vor der Spülung vorliegen und wann die einzelnen ET-Teams die Superovulationsbehandlung mit einer Spirale ergänzen.

Nach einer gemeinsamen Kaffeepause stellte Frau S. Peter, IFN Schönow eine Idee für ein mögliches neues Diagnostikwerkzeug für subklinische Endometritiden vor, welches auch für die Untersuchung von ET-Rezipienten interessant sein könnte. Danach präsentierte Frau Dr. Schwerhoff, RUW die Ergebnisse einer Auswertung der Trächtigkeits- und Abkalbeergebnisse in einem Jungviehbetrieb mit Nutzung von ET und KB. Die Ergebnisse finden Sie im Abstract auf Seite 22 dieses Tagungsbandes. Um den Ursachen für erhöhte embryonale und fetale Mortalität (EM/FM) nach ET im Vergleich zur KB auf den Grund zu gehen, wurde auf dem besagten Jungviehbetrieb im letzten Jahr ein Forschungsprojekt gestartet, welches Frau Dr. Mense, IFN Schönow e.V. im Anschluss vorstellte. Ferner zeigte sie die Ergebnisse eines Projektes zum Auftreten von EM/FM nach KB. Abschließend wurden weitere aktuelle Themen diskutiert. Ein gemeinsames Abendessen rundete die Veranstaltung ab. Ein besonderer Dank gilt der Firma Minitüb für die freundliche Unterstützung dieser kleinen Fachtagung „Embryotransfer beim Rind“.

Überprüfung und Optimierung des Hygienekonzepts eines Embryotransferteams

Freya Ippen¹, Jan Detterer², Janna Egberts² und Claudia Gallert¹

¹Hochschule Emden-Leer, Fachbereich Technik,
Abteilung Naturwissenschaftliche Technik, Emden

²Besamungs- und ET-Station Georgsheil, Südbrookmerland

Ein gutes Hygienekonzept ist eine der Grundvoraussetzungen für das Erzielen von guten Ergebnissen beim Embryotransfer. In der ADR-Empfehlung 7.1 über die Hygienebedingungen für die Gewinnung, Behandlung sowie Übertragung oder Abgabe von Rinderembryonen werden wichtige Grundsätze dafür beschrieben:

- Die räumlichen Gegebenheiten der ET-Einheiten müssen seuchenhygienisch angemessene Voraussetzungen für den ET bieten.
- Zur Embryogewinnung, deren Isolierung und Beurteilung sowie während des Transfers werden ausschließlich Chemikalien und Geräte verwendet, die den GMP-Kriterien (Good Manufacturing Practice) entsprechen.
- Der Transfer muss den seuchenhygienischen Kriterien gerecht werden.
- Die Laborausstattung muss eine ausreichende Sterilisation und Desinfektion der verwendeten Geräte gewährleisten. Bei der Gewinnung und beim Transfer sind – wo möglich – Einweg-Utensilien zu verwenden.
- Sämtliche verwendete, kommerziell bezogene Medien müssen GLP-Standards (Good Laboratory Practice) aufweisen.
- Auf den Stationen angesetzte Medien werden steril filtriert oder – wenn möglich – autoklaviert.

Details werden in Kapitel 8 des Handbuches der IETS beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, das Hygienekonzept eines ambulant arbeitenden ET-Teams zu überprüfen und gegebenenfalls zu optimieren.

Dazu wurde bei insgesamt sechs Embryonengewinnungen eine mikrobiologische Stufenkontrolle durchgeführt. Die ersten drei Beprobungen dienten zur Bestandsaufnahme. Danach wurden Optimierungen durchgeführt, welche bei den nächsten drei Embryonengewinnungen überprüft wurden. Proben wurden vom Arbeitstisch im Stall, vom Labortisch im ET-Mobil und vom Auftauchergerät genommen. Weiterhin wurden die verwendeten Medien (Spülflüssigkeit, Haltemedium, Tiefgefriermedium und das Trypsin) und die Gerätschaften (Pipettenspitzen und Petrischalen) beprobt. Außerdem wurden im Laborteil des ET-Mobils Luftkeimproben gewonnen.

Es wurde für die Untersuchungen ein „Universalmedium“ verwendet, auf dem viele Bakterien und Pilze wachsen können. Da es keinen Nährboden gibt, auf dem alle Mikroorganismen (es wurden nur die aeroben betrachtet) wachsen können, wurde dieser so gewählt, dass ein möglichst großes Spektrum an aeroben Bakterien und Pilzen auf diesem ohne größere Probleme anwachsen können. Dazu wurde die Zusammensetzung aus dem Mikrobiologiepraktikum der Hochschule Emden-Leer in Anlehnung an den Hefeextraktagar aus der DIN EN ISO 6222 (1999) gewählt.

Die Agarnährböden wurden bei 30°C inkubiert. Nach 48 und nach 72 Stunden wurden die Agarnährböden ausgezählt, da einige Kolonien nach 48 Stunden noch nicht gut sichtbar waren und nach 72 Stunden die Nährböden teilweise überwuchert waren, sodass nicht mehr alle Kolonien erfasst werden konnten. Ausgezählt wurden die Kolonien mit dem „bloßem“ Auge ohne Vergrößerung, in Anlehnung an die DIN EN ISO 6222 (1999). Diese besagt, dass zur Koloniezahlbestimmung keine Vergrößerung notwendig ist.

Die mikrobiologische Stufenkontrolle ergab, dass die Medien keimfrei, die Petrischalen und Pipettenspitzen keimarm bzw. keimfrei waren. Stärkere Keimbelastungen konnten auf den Arbeitsflächen und im Auftaugerät nachgewiesen werden. Die ab der vierten Embryonengewinnung durchgeführten Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen brachten eine deutliche Verminderung der Keimbelastung.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden folgende Optimierungsvorschläge erarbeitet:

- Täglich:
Wechseln des Wassers im Auftaugerät, dabei das Auftaugerät säubern
- Wöchentlich:
Desinfizieren des Auftaugerätes
- Täglich (vor und nach der Arbeit):
Reinigung und Desinfektion des Stalluntersuchungstisches
- Täglich (vor und nach der Arbeit):
Reinigung und Desinfektion des Labortisches
- Immer:
Vor der Arbeit im ET-Mobil Hände waschen und desinfizieren

Mit Hilfe eines Hygienechecks können Schwachstellen aufgedeckt werden. Mit relativ einfach umsetzbaren Maßnahmen kann der Hygienestatus auch beim ambulant durchgeführten Embryotransfer deutlich verbessert und dauerhaft aufrechterhalten werden.

Effekt der Superovulation beim Rind auf die frühe Embryogewinnung und deren Weiterentwicklung in vitro

V. Havlicek¹, F. Rings^{2,3}, E. Held^{2,3}, K. Radefeld¹, S. Papp¹, D. Tesfaye³, K. Schellander³, G. Brem¹, U. Besenfelder¹, M. Hoelker^{2,3}

¹*Reproduktionszentrum Wieselburg (RCW), Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärmedizinische Universität Wien*

²*Versuchsstation Frankenforst, Landwirtschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn*

³*Institut für Tierwissenschaften, Tierzucht und Tierhaltung, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn*

Die frühembryonale Entwicklung wird sehr stark durch Faktoren der Umwelt beeinflusst. Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass die In vitro-Entwicklung von Rinderembryonen deutlich von der Embryokultur im Eileiter abweicht. Zudem wurde gezeigt, dass auch die frühe Embryonalkultur in den ersten 7 Tagen im superovulierten vs. einfach ovulierten Tier Unterschiede in der Entwicklung aufweisen.

Ziel der vorliegenden retrospektiven Studie war es deshalb das Entwicklungspotential von Embryonen, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus superovulierter Donoren gespült wurden und in der Folge in vitro bis zur Blastozyste weiterkultiviert wurden, zu erfassen.

Für diese Studie wurden die Ergebnisse von 85 Spülungen von Fleckvieh Kalbinnen analysiert. Die Tiere wurden durch eine zweimalige Gabe von PGF₂ α im Intervall von 11 Tagen und durch die Injektion von GnRH 48 Stunden nach jeder PGF₂ α synchronisiert. Der Tag nach der zweiten GnRH Injektion wurde hierbei als Tag 0 definiert. Am Tag 9 wurde der dominante Follikel abpunktiert. Ab Tag 11 wurde die Superstimulation mit FSH (Stimufol oder Folltropin) begonnen. FSH wurde zweimal täglich für 4 Tage in senkenden Dosen appliziert. Die Dosierung wurde an das Gewicht der Tiere angepasst. Die Luteolyse wurde bei der sechsten und siebten FSH Injektion durch PGF₂ α initiiert. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten FSH Injektion mit frischem verdünnten Samen inseminiert und gleichzeitig wurde der LH-Peak durch GnRH Injektion ausgelöst, wobei die Hauptovulation 12 Stunden darauf erwartet wurde. Die Embryonengewinnung wurde mit Hilfe der transvaginalen Endoskopie durchgeführt. Hierzu wurde in den verschiedenen Versuchsgruppen eine kombinierte Eileiter- und Gebärmutterspülung am Tag 1 (Gruppe 1), am Tage 2 (Gruppe 2), am Tag 3 (Gruppe 3) oder am Tag 4 (Gruppe 4) nach der Hauptovulation durchgeführt. Vor der Embryogewinnung wurde die Anzahl der Ovulationsstellen durch endoskopische Adspektion erfasst. Die gewonnenen Embryonen wurden gemäß ihres Entwicklungsstadiums klassifiziert und in vitro in Gruppen gleichen Entwicklungsstadiums bis Tag 9 weiterkultiviert. Die Entwicklungsraten zur Blastozyste wurden sodann am Tag 7, 8 und 9 erhoben.

Insgesamt wurden nach der Spülung von 85 Kalbinnen 1578 Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gewonnen und in der Folge in vitro bis Tag 9 weiterkultiviert, wobei sich 1033 Embryonalstadien zur Blastozyste entwickelt haben. Eine Übersicht über die durchschnittliche Anzahl an Ovulationsstellen, der gewonnenen und geteilten Embryonen sowie der in Folge produzierten Blastozysten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Die durchschnittliche Anzahl von Ovulationsstellen, gewonnenen und geteilten Embryonen und produzierten Blastozysten nach der Embryogewinnung und nachfolgender in vitro Kultur bis Tag 9

Gruppe	Tiere n	Ovulationsstellen n	Gewonnene Embryonen n	Geteilte Embryonen n	Blastozysten am Tag 9 n
1	41	20,8	21,9	18,9	14,5
2	14	23,2	23,6	21,7	17,9
3	22	15,5	12,1	8,7	5,8
4	8	14,1	10,6	8,6	7,4

In den Gruppen 1 und 2 war die Anzahl von gefundenen Embryonen mit der Anzahl gezählter Ovulationsstellen identisch. Demgegenüber war die Findungsrate in den Gruppen 3 und 4 um ein Viertel niedriger. Die Anzahl unbefruchteter Eizellen lag zwischen 8,2%-28,2%. Von den geteilten Embryonen haben sich in vitro 66,5%-85,5% bis zum Blastozystenstadium weiterentwickelt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Die Embryogewinnungsrate, Teilungsrate und Blastozystenrate nach der Superovulation und folgende in vitro Kultur bis Tag 9

Gruppe	Embryogewinnungsrate	Teilungsrate	Blastozystenrate
1	105,0	86,5	76,9
2	101,8	91,8	82,6
3	77,8	71,8	66,5
4	75,2	81,2	85,5

Gruppe 1: Embryogewinnung ein Tag nach dem Hauptovulationszeitpunkt
 Gruppe 2: Embryogewinnung zwei Tage nach dem Hauptovulationszeitpunkt
 Gruppe 3: Embryogewinnung drei Tage nach dem Hauptovulationszeitpunkt
 Gruppe 4: Embryogewinnung vier Tage nach dem Hauptovulationszeitpunkt
 Embryogewinnungsrate: bezogen auf Ovulationsstellen
 Teilungsrate: bezogen auf gefundene Embryonen
 Blastozystenrate: bezogen auf geteilte Embryonen

Die an den verschiedenen Tagen gewonnenen Embryonalstadien (Gruppe 1: 2-4-Zeller, in Gruppe 2: 8-Zeller, in Gruppe 3: 16-Zeller und in Gruppe 4: 32-Zeller) wurden entsprechend ihres Entwicklungsstadiums wiederum verschiedenen Kulturgruppen zugeordnet und haben sich zu 85% bis 100% zur Blastozyste weiterentwickelt. Zumeist wurde das Blastozystenstadium schon am Tag 7 erreicht. Je jünger das Stadium der gespülten Embryonen innerhalb der einzelnen Gruppen war, desto später wurde das Blastozystenstadium erreicht und desto niedriger fiel die Entwicklungsrate zur Blastozyste aus (33%-70%).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Superovulationsmilieu einen sichtbaren Effekt auf die Embryogewinnung ab Tag 3 hat. Embryonen, die in ihrer Entwicklung relativ zu den Embryonen aus ihrer Gruppe hinterherhinken, erreichen das Blastozystenstadium später und weisen eine geringere Entwicklungsrate auf. Analog zur IVP scheinen auch Embryonen aus der Superovulation mit verzögerter Teilung einen Mangel an Entwicklungskompetenz aufzuweisen.

Spontane Variabilität der Corpus luteum-Aktivität beim Rind; eine diagnostische Herausforderung

Schneebeli Jürg; Schauenberg 91; CH-7421 Summaprada; Schweiz

Semiquantitative Schnelltests zur Messung der Progesteronkonzentration (P4) in der Milch oder im Blut gelten als Verfahren, das beim Rind unter Feldbedingungen eine objektive Interpretation des ovariellen Funktionstatus ermöglicht. Als Indikation für solche Tests wird unter anderem auch die Prüfung auf Spender- oder Empfängertauglichkeit im Rahmen des ET genannt. In diesem Beitrag wird zunächst am Beispiel eines umfangreichen Datenpools veranschaulicht, wie stark die spontane Variabilität der Sekretionsleistung boviner CL den diagnostischen Aussagewert einzelner P4-Messwerte limitiert. Im Weiteren wird ein Versuch, die schlechte Interpretierbarkeit der CL-Aktivität aus physiologischer Sicht zu verstehen zur Diskussion gestellt. Alle hier erwähnten Beobachtungen stammen von Erhebungen an Braunvieh-Milchkühen und -Rindern, deren Ovaraktivität langfristig, kontinuierlich überwacht wurde (tägliche Messung der P4-Konzentration im peripheren Blut mittels RIA; Ovarpalpation alle 1 - 2 Tage).

Eine Gemeinsamkeit zahlreicher bisher bekannter Korrelationen zwischen der P4-Konzentration im peripheren Blut und anderen fertilitätsrelevanten Parametern (uteriner Status; Rhythmus des Wachstums dominanter Follikel) besteht darin, dass sie mit Veränderungen der CL-Aktivität einhergehen, die im Vergleich zur gesamten Variabilität als wenig erheblich erscheinen. Diese Feststellung gilt es allerdings mit Vorsicht zu gewichten, weil im komplexen Geflecht der utero-ovariellen und intraovariellen Interaktionen auch mit einander gegenseitig kompensierenden Effekten zu rechnen ist, und weil dem CL je nach Situation eine aktive oder passive Rolle zukommen kann. Gemäss neuen Erkenntnissen wird die Intensität der P4-Sekretion nicht zuletzt auch durch indirekte zyklusübergreifende Interaktionen zwischen Vorgänger- und Nachfolge-CL moduliert, indem lokale Hemmeffekte des CL auf ipsilateral heranwachsende ovulatorische Follikel die sekretorische Kapazität des eigenen Nachfolgers beeinträchtigen. Ein weiterer, bisher unbeachteter Faktor, der zur Variabilität peripher messbarer P4-Konzentrationen beiträgt, ist die offenbar generell erhöhte Aktivität der auf dem rechten Ovar gelegenen CL.

Die Liste der bisher bekannten Modulatoren der CL-Aktivität deckt zweifellos nur einen Teil aller physiologisch relevanten Faktoren ab. Bereits die vorliegenden Erkenntnisse belegen aber, wie illusorisch es ist, von P4-Messungen allein mehr als nur sehr approximative Informationen über den entsprechenden ovariellen Funktionsstatus zu erwarten. Sogar bei Verfügbarkeit umfangreicher Vergleichsdaten besteht kaum eine Möglichkeit, nur schon klare Aussagen über "Normalbereiche" zu machen. Diese diagnostischen Schwierigkeiten könnten sich damit erklären lassen, dass Ergebnisse von P4-Messungen im peripheren Blut des Rindes lediglich die Gesamtbilanz zahlreicher, aber noch unvollständig verstandener, Modulationsfaktoren reflektieren.

Sektion IV

Endoskopie und Kaltlagerung

Flüssigkonservierung boviner Embryonen als Alternative zur Kryokonservierung

Nadja Blad-Stahl¹, Franziska Kotarski¹, Hans-Peter Nohner², Christine Wrenzycki¹

¹Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Professur für Molekulare Reproduktionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen

²Besamungsverein Neustadt a.d Aisch e.V., Neustadt a.d. Aisch

In der modernen Rinderzucht sind die Reproduktionsbiotechnologien mittlerweile fester Bestandteil. Eine der jüngsten Methoden ist die genomische Zuchtwertschätzung mittels SNP-Typisierung. Für die Ermittlung des genomischen Zuchtwertes (gZW) anhand der DNA ist eine Biopsie des Embryos nötig. Der gZW liegt dann ca. sieben Tage nach der Biopsie des Embryos vor. 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. Die Trächtigkeitsraten nach Transfer bioptierter und kryokonservierter Embryonen liegen durchschnittlich bei 30-60%, wobei die Raten abhängig von der Herkunft der Embryonen (in vivo/in vitro), der Biopsiemethode und der verwendeten Kryokonservierungstechnologie sind (Ponsart et al. 2013). Eine weitere vielversprechende Möglichkeit könnte die Flüssigkonservierung bei Temperaturen um 4°C darstellen. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass in vivo produzierte, nicht-bioptierte Embryonen, für sieben Tage flüssigkonserviert, ähnliche Trächtigkeitsraten lieferten wie frischtransferierte (flüssigkonserviert: 75% vs. frischtransferiert 77%; Ideta et al. 2013).

Ziel des Projektes war es, ein praxistaugliches Verfahren zur Flüssigkonservierung (FK) bioptierter, in vivo oder in vitro produzierter boviner Embryonen zu entwickeln, welches deren Entwicklungsfähigkeit nach Flüssigkonservierung für sieben Tage bei niedrigen Temperaturen erhält.

Für die Versuche wurden zunächst nach einem Standard-IVP-Protokoll bovine Morulae produziert, an Tag 6 bioptiert und anschließend für weitere 24 Stunden kultiviert. An Tag 7 erfolgte die Flüssigkonservierung der Embryonen. Das Konservierungsmedium setzte sich aus dem Basismedium TCMair und unterschiedlichen Proteinquellen [BSA (0,1% und 1%), FBS (25% und 50%), BSA und FBS kombiniert (25% und 50% FBS mit jeweils 0,1% BSA) sowie Antifreezeprotein (AFP) Typ III in Kombination mit FBS (0,1% und 1% AFP mit jeweils 25 % FBS)] zusammen. Nicht-bioptierte Embryonen wurden unter den gleichen Bedingungen konserviert (Kontrollgruppe). Bei diesen Untersuchungen mit in vitro produzierten Embryonen erzielten die aus der Gruppe mit 25% FBS als Proteinquelle im Vergleich zu denen der anderen Gruppen die vielversprechendsten Ergebnisse. Untersucht wurden die Überlebensraten (Reexpansions- und Schlupfraten) sowie die Anzahl lebender und toter Blastomeren dargestellt als Lebend-Tot-Ratio.

Die Spülung in vivo generierter Embryonen erfolgte nach Superovulation der Spendertiere an Tag 6. Die als transfertauglich eingestuften Embryonen wurden bioptiert und anschließend sofort in TCMair und 25% FBS flüssigkonserviert. Um die Reexpansions- und Schlupfraten zu bestimmen, wurden die Embryonen nach FK für maximal 72 Stunden kultiviert, jeweils mit oder ohne Biopsie (jeweils 12 Embryonen). Embryonen ohne FK, aber mit oder ohne Biopsie, dienten als Kontrolle (jeweils 5 Embryonen).

Darüber hinaus wurde die Qualität der Embryonen mittels der Lebend-Tod-Färbung ermittelt. Die Lebend-Tod-Ratio wurde zusätzlich in Embryonen direkt nach der FK bestimmt (jeweils 10 Embryonen).

Die Schlupfraten zwischen den Embryonen der Gruppen ohne (oFK) und mit FK (mFK) sowie mit und ohne Biopsie [oFK+Biopsie 80 % (4/5), oFK-Biopsie 100 % (5/5) vs. mFK+Biopsie 0 % (0/12), mFK-Biopsie 8,3 % (1/129)] waren signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$).

Beim Vergleich der Schlupfraten der In-vivo- mit denen der entsprechenden In-vitro-Embryonen konnten signifikant höhere Schlupfraten in der Gruppe der bioptierten In-vitro-Embryonen nach FK ermittelt werden [in-vitro mFK+Biopsie 56,5 % (13/23) vs. in-vivo mFK+Biopsie 0 % (0/12); ($p \leq 0,05$). Weitere signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar (in-vitro mFK-Biopsie 37,5 % (9/24); in-vivo mFK-Biopsie 8,3 % (1/19); $p > 0,05$].

Um die Gesamtzellzahl und die Lebend-Tod-Ratio zu bestimmen, wurde die Lebend-Tod-Färbung sowohl nach den jeweils 72 Stunden Kultivierung (mFK+/-Biopsie, oFK+/-Biopsie) als auch direkt nach der FK (dirFK+/-Biopsie) durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse ergaben eine signifikant höhere Gesamtzellzahl der Embryonen oFK zu denen der Gruppen dirFK und mFK (oFK+Biopsie $121,8 \pm 29,5$; oFK-Biopsie $122,4 \pm 29,0$ vs. dirFK+Biopsie: $77,2 \pm 27,2$; dirFK-Biopsie $73,3 \pm 15,4$; mFK+Biopsie $81,5 \pm 31,6$; mFK-Biopsie $84,1 \pm 20,0$; $p \leq 0,05$). Im Vergleich der Gesamtzellzahl direkt nach FK unterschieden sich die In-vitro- und In-vivo-Embryonen signifikant (in-vitro dirFK+Biopsie $110,1 \pm 21,5$; in-vitro dirFK-Biopsie $118,4 \pm 28,5$ vs. in-vivo dirFK+Biopsie $77,2 \pm 27,2$; in-vivo mFK-Biopsie $73,3 \pm 15,4$; $p \leq 0,05$).

Die Ergebnisse der Lebend-Tod-Ratio zeigten signifikant höhere Ratios in den Embryonen der Gruppen oFK und dirFK im Vergleich zu den Embryonen der Gruppe mFK (oFK+Biopsie $13,8 \pm 6,5$ %; oFK-Biopsie $17,1 \pm 7,7$ %; dirFK+Biopsie $8,5 \pm 3,8$ %; mFK-Biopsie $11,3 \pm 4,5$ % vs. mFK+ $0,2 \pm 0,3$ %; mFK-Biopsie $0,7 \pm 0,7$ %; $p \leq 0,05$).

Für die Lebend-Tod-Ratio konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den in vivo und in vitro erzeugten Embryonen direkt nach der FK nachgewiesen werden (in-vitro dirFK+Biopsie $14,8 \pm 8,7$ %; in-vitro mFK-Biopsie $14,8 \pm 14,4$ %; in-vivo mFK+Biopsie $8,5 \pm 3,8$ %; in-vivo mFK-Biopsie $11,3 \pm 4,5$ %).

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich in vitro produzierte Embryonen besser für eine Flüssigkonservierung mit 25% FBS zu eignen scheinen.

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

Kaltlagerung boviner Ovarien – eine Option zur Erzeugung boviner Embryonen *in vitro* nach Langstreckentransport

M. Diederich, K. Roschlau, A. Kuwer, H. Grothmann
Masterrind GmbH, ET-Station Nückel, Loxstedt

Der Standardtransport von bovinen Ovarien, die der In-vitro-Produktion (IVP) zugeführt werden sollen zu einem IVP-Labor erfolgt in körperwarmer Transportlösung. In der Praxis kommt es vor, dass Landwirte, die wertvolle Tiere unerwartet einer Nottötung zuführen müssen, weit entfernt von einem solchen Labor lokalisiert sind. Somit ist ein zeitnaher Transport der Ovarien in körperwarmer Transportlösung zum Labor aus logistischen Gründen nicht immer möglich.

Es ist bekannt, dass nach ungefähr sechsstündiger Lagerung der Ovarien in körperwarmem Transportmedium die Blastozystenrate signifikant (Yang et al., 1990; Blondin et al.; 1997) sinkt. Bei anderen Spezies (Iberischer Rothirsch, Garcia-Alvarez et al. 2011) ist der gekühlte Transport der Ovarien etabliert und stellt über lange Strecken die Methode der Wahl dar. Einzelne Untersuchungen hierzu beim Rind liefern variierende Ergebnisse. So konnten Yang et al. 1990 feststellen, dass nach Lagerung der Ovarien bei 4°C für 24 Stunden noch einzelne Embryonen gewonnen werden konnten. Matusushita et al. dokumentierten 2004 keine Unterschiede in Entwicklungsraten, nachdem sie am Schlachthof gewonnen Ovarien mindestens 24h bei 10°C lagerten. Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Untersuchung, eine Transporttemperatur zu ermitteln, die Landwirten in Abhängigkeit von der Transportdauer die Möglichkeit bietet, Nachkommen von ihren abgegangenen Tieren erzeugen zu lassen.

Von einem nahegelegenen Schlachthof wurden die Ovarien frisch getöteter geschlechts gesunder Kühe gesammelt und in das IVP-Labor der ET-Station Nückel transportiert. Hier schloss sich eine Lagerung der Ovarien vor der Isolierung der Kumulus-Oozyten-Komplexe (KOK) für 4-6, 8-10 oder 18-20 Stunden in 6°C respektive 37°C warmem PBS an. Anschließend erfolgte die Gewinnung der KOKs mittels der Slicing-Methode sowie In-vitro-Maturation, -Fertilisation, und -Kultur bis Tag 7 (Medien: IVF Bioscience, Falmouth, UK). Die Dokumentation der Teilungs- und Entwicklungsraten erfolgte an Tag 3 sowie an Tag 7. Die Analyse der gewonnenen Daten fand durch eine Ein-Faktorielle-Varianzanalyse gefolgt von einem Holm-Sidak-Test statt. Insgesamt konnten 2433 KOKs in den unterschiedlichen Gruppen in Kultur gesetzt werden (s. Tabelle 1).

Die Teilungsrate der Embryonen in der Gruppe 3 ($MW \pm SEM$; $16,25\% \pm 4,52$) war signifikant niedriger als in allen anderen Gruppen mit Ausnahme der Gruppe 5 ($35,87\% \pm 7,68$), wohingegen die Teilungsrate der Embryonen der Gruppe 6 ($57,97\% \pm 1,67$) signifikant höher waren als die der Gruppen 3 und 5. Die Teilungsraten der Embryonen der Gruppen 1 ($42,00\% \pm 3,00$), 2 ($45,00 \pm 2,00$) und 4 ($48,09 \pm 0,66$) unterschieden sich nicht voneinander oder von denen der Gruppe 6.

Die Entwicklungsrate der Embryonen in Gruppe 3 war signifikant niedriger als diejenige der Embryonen in den Gruppen 1, 4 und 6 (s. Tabelle 1). Die Lagerung der Ovarien bei 6°C hatte unabhängig von der Dauer der Lagerung in diesem Versuch keinen negativen Einfluss auf die Entwicklungsraten an Tag 7.

Tabelle 1: Entwicklungsraten in den einzelnen Gruppen

Gruppe (Lagerungsdauer/Temperatur)	Anzahl eingesetzter KOKs	Anzahl Durchgänge (n=)	Entwicklungsrate Tag 7 (MW ± SEM)
1 (4-6h/37°C)	309	5	23,70 ^{ac} ± 3,5
2 (8-10h/37°C)	379	4	17,41 ^{bc} ± 4,20
3 (18-20h/37°C)	481	5	4,06 ^b ± 1,69
4 (4-6h/6°C)	342	5	23,43 ^c ± 5,59
5 (8-10h/6°C)	401	4	14,25 ^{bc} ± 3,83
6 (18-20h/6°C)	521	5	24,00 ^{ac} ± 4,26

a:b:c p≤0,05

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass der gekühlte Transport von bovinen Ovarien für die kommerzielle Embryonenerzeugung dann eine Option darstellt, wenn die Transportdauer zum nächstgelegenen IVP-Labor 10 Stunden und länger ist. Da die Kühlung unter den gegebenen Umständen keine Verbesserung der Entwicklungsraten mit sich bringt, ist mit Berücksichtigung der Veränderungen, die u.a. am Spindelapparat durch abrupte Temperaturschwankungen induziert werden können, bei kürzerer Transportdauer, die Lagerung in körperwarmer Transportlösung zu bevorzugen.

Transvaginale Endoskopie zur Untersuchung boviner Eileiterflüssigkeit

S. Papp¹, K. Radefeld¹, V. Havlicek¹, M. Kösters², T. Fröhlich², G. Arnold²,
G. Brem¹, U. Besenfelder¹

¹ Reproduction Centre Wieselburg RCW, Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärmedizinische
Universität Wien

² Laboratory for Functional Genome Analysis LAFUGA, Gene Center,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Der Eileiter bietet ein optimales Mikromilieu für die frühembryonale Entwicklung. Seine außergewöhnliche Bedeutung wird offensichtlich, wenn man bedenkt, dass in vitro produzierte bovine Embryonen, gemessen und analysiert an einer Vielzahl von Parametern, deutlich von der Qualität in vivo kultivierter Embryonen abweichen. Zudem ist bekannt, dass vor allem bei Hochleistungskühen die embryonale Mortalität in der präimplantativen Phase am höchsten ist und dass der frühe Umwelteinfluss sogar noch einen Effekt auf den postnatalen Phänotyp haben kann.

Unsere Studie wurde im Rahmen des EU Projektes FECUND durchgeführt, das die Verbesserung des Reproduktionserfolges in dieser frühembryonalen Phase bei Milchkühen zum Ziel hat. Mit Hilfe moderner OMICs Technologien (genomics, transcriptomics, proteomics, ...) sollen neue molekulare Merkmale und potentielle Biomarker definiert werden, um die Beurteilung und Selektion der weiblichen Fruchtbarkeit zu verbessern und Reproduktionsbiotechnologien weiter zu optimieren.

Unsere Aufgabe war es, neue in vivo Methoden zur Gewinnung von Eileiterflüssigkeit beim Rind zu entwickeln, um diese einer gezielten Untersuchung auf Proteine zur Verfügung zu stellen, denen eine Schlüsselrolle in der frühembryonalen Entwicklung zugeschrieben wird. Bis dato wurde Eileiterflüssigkeit post mortem oder unter großem Aufwand chirurgisch durch Katheterisierung des Eileiters für mehrere Stunden bis hin zu mehreren Brunstzyklen gewonnen. Hier wurde der Zugang zum Eileiter minimalinvasiv mittels transvaginaler Endoskopie geschaffen, wie von Besenfelder und Brem 1998 beschrieben. Somit konnte das Eileitermilieu mit minimaler Belastung für das Tier beprobt werden ohne die Qualität der Proben durch postmortale Veränderungen oder Reizung des Eileiters durch einen verweilenden Katheter zu beeinträchtigen.

12 Fleckvieh Kalbinnen wurden mittels modifiziertem Ovsynch Protokoll vorbereitet. In einer Gruppe wurden die Eileiter zur Gewinnung der Eileiterflüssigkeit von 6 Tieren gespült. Dafür wurde ein Metallkatheter mit multiplen Öffnungen in das Infundibulum eingeführt und ca. 500 µl PBS wurden mehrfach appliziert und sofort wieder aspiriert. In der anderen Gruppe wurden zuvor in vitro erprobte Protein bindende Mikropartikel mit einem Durchmesser von 1,2 µm (M-Beads-Proteomics S-C4, MoBiTech GmbH, Deutschland) über das Infundibulum in die Eileiter von 6 weiteren Kalbinnen transferiert. Diese Beads wurden mittels Spülung durch die Gebärmutter wieder gewonnen und die Proteine von den Beads eluiert. Die Proben wurden bei beiden Gruppen von jeweils 3 Tieren am ersten Zyklustag und von 3 Tieren am dritten Zyklustag gewonnen, um der unterschiedlichen Kontraktilität und Motilität des Reproduktionstraktes zum Zeitpunkt der Beprobung Rechnung zu tragen. Die Protein Konzentration der gespülten Eileiterflüssigkeit und der Eluate wurde mittels Bradford Assay bestimmt. 2,5 µg Protein pro Probe wurde in Lösung verdaut und mittels Flüssigchromatographie und Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert.

Beide Methoden konnten technisch umgesetzt werden, wobei sich die Spülung als weniger aufwendig und kostengünstiger darstellte, als die Beprobung mittels Beads. An beiden Zyklustagen konnte mit beiden Methoden genügend Protein aus den Eileitern für die Analysen gewonnen werden. Insgesamt wurden über 3000 Proteine identifiziert, wobei 70,5% dieser Proteine mit beiden Methoden, 6,0% ausschließlich mittels Spülung und 23,5% ausschließlich mittels Beads detektiert wurden (Ergebnisse des ersten Zyklustages, jeweils ähnliche Ergebnisse am dritten Zyklustag).

Mit dieser Pilotstudie konnte die Einsetzbarkeit der Methoden überprüft und bestätigt werden, sodass sie nun für weitere Ansätze bereit stehen. Diese vielversprechenden Methoden erlauben neue experimentelle Zugänge zur Erforschung der embryo-maternalen Kommunikation. Durch die Spülung der Eileiterflüssigkeit können in ihr gelöste Bestandteile, als auch in ihr enthaltene Komponenten wie Gameten, Embryonen, Exosomen, Epithelzellen etc. erfasst werden. Die Beads wiederum können in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenbeschaffenheit zur gezielten Suche bestimmter Proteine/Peptide eingesetzt werden. Von besonderer Bedeutung ist die Kombination verschiedener Reproduktionstechniken mit diesen Methoden, so zum Beispiel während der Embryonalentwicklung im Eileiter (normale Ovulation, Superovulation, in vivo Kultur), um spezifische Proteinmuster dem jeweiligen Entwicklungsstadium zuordnen zu können. Zusammenfassend bieten die vorgestellten Methoden einen potentiellen Ansatz zur Erforschung entwicklungsrelevanter Faktoren und könnten auch einen wesentlichen Beitrag zur Bestimmung von Fruchtbarkeitsmerkmalen leisten.

Endoskopisch geleitete intratubale Besamung beim Rind

K.Radefeld¹, S.Papp¹, V.Havlicek¹, J.M. Morrell² G.Brem¹, U.Besenfelder¹

¹*Reproduktionscenter Wieselburg, Institut für Tierzucht und Genetik, Veterinärmedizinische Universität Wien*

²*Department of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala*

Spermien haben einen langen Weg durch den weiblichen Reproduktionstrakt zurückzulegen, um schließlich die Oozyte am Befruchtungsort in der Ampulla des Eileiters zu erreichen. Dabei sind sie zahlreichen Einflüssen der uterinen und tubalen Umwelt ausgesetzt. Der Erfolg der künstlichen Besamung von Kühen nach der Abkalbung hängt nicht nur vom Befruchtungsvermögen des Samens ab, sondern ist vielmehr auch von der postpartalen morphologischen und funktionellen Wiederherstellung des weiblichen Genitaltraktes abhängig. Retrograder Transport, Sekretionen und Phagozytose reduzieren die Spermienzahl von Milliarden beim Natursprung bzw. Millionen bei der konventionellen intrauterinen Besamung auf einen Bereich von 10^2 im Eileiter. Die endoskopisch geleitete intratubale Besamung (ITB) ist eine neuartige minimalinvasive Besamungsmethode, welche auf den langjährigen Erfahrungen und Vorteilen der In vivo-Kultur aufbaut. Analog zur In vitro-Fertilisation werden geringe Samenmengen unter Umgehung des weiblichen Reproduktionstraktes via Infundibulum an den Ort der Befruchtung, die Eileiterampulle, transferiert. Ziel dieser Studie war es die intratubale Besamung beim Rind zu etablieren und somit ein neues Instrument für sowohl zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen, als auch praktische Anwendungen in der Rinderzucht zur Verfügung zu stellen.

An 50 Fleckviehkalbinnen wurden 64 intratubale Besamungen (ITBs) durchgeführt. Zur Methodenentwicklung wurden Samentyp (Frischsamen, Kryosamen, Kryosamen gesext), Samenpräparation, Samenmenge und Besamungszeitpunkt variiert. Frisch- und Kryosamen wurden von einem Stier verwendet, während gesexter Kryosamen von einem weiteren Stier stammte. Die Kalbinnen wurden nach einem modifizierten OvSynch-Protokoll synchronisiert und 18 h (ITB¹⁸), 10 h (ITB¹⁰) oder 22 h (ITB²²) nach der 2. GnRH-Injektion besamt. Die Besamung fand unter Epiduralanästhesie statt und nahm etwa 10 min/Tier in Anspruch. Dabei wurde das Tubussystem, welches das Endoskop und das Besamungsgerät beinhaltete, durch die dorsale Scheidenwand in die Beckenhöhle eingeführt. Das Besamungsgerät bestand aus einem Dosimeter nach Steiner, einer aufgesetzten 1 mL-Spritze, die mit einem Perfusionsschlauch verbunden war, und einer gebogenen Glaskapillare. Nach sonografischer und visueller Untersuchung der Ovarien wurde die Glaskapillare direkt über das Infundibulum in die ipsilaterale Ampulla des Eileiters eingeführt und der Samen deponiert. Zur Untersuchung des Besamungserfolgs wurde zwei Tage später der ipsilaterale Eileiter gespült, um den frühen Embryo im 2- bis 8-Zellstadium oder die unbefruchtete Oozyte (UFO) zu gewinnen. Dazu wurde dieselbe endoskopische Technik verwendet, wobei der Eileiterinhalt mit einem Schlauchsystem, das mit einem Metallkatheter verbunden war, in das ipsilaterale Uterushorn gespült wurde. Anschließend wurde das Uterushorn konventionell mit einem Embryospülkatheter gespült und in einem Embryofilter aufgefangen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Ergebnisse der Eileiterspülungen 2d nach intratubaler Besamung

Samentyp	Samenpräparation	Besamungszeitpunkt [h nach GnRH]	Samendosis [$\times 10^6$]	n [ITBs]	n [Embryonen]	n [UFOs]	Befruchtungsrate [%]	Gewinnungsrate [%]
Frischsamen	/	18	13-14	8	2		100	25
	gewaschen	18	7-9	9	5		100	56
Kryosamen	gewaschen	18	1.5 ¹	10	4		100	40
	SLC ²	18	0.75 ¹	10	7	1	88	80
	SLC	18	0.1 ¹	10	6	3	67	90
	SLC	10	0.75 ¹	5	4		100	80
	SLC	22	0.75 ¹	5	1		100	25
gesext	gewaschen	18	0,4-0,6 ¹	7	4	1	80	71

¹ motile Spermien

² Single Layer Centrifugation: Zentrifugation durch eine Schicht speziesspezifisches Colloid „Androcoll B“ (Patent: J.M. Morrell, Uppsala, Schweden)

Generell ist den Daten zu entnehmen, dass die Endoskopie-geleitete intratubale Besamung unabhängig von der Spermienaufbereitung, der Samenkonzentration und des Besamungszeitpunktes erfolgreich eingesetzt werden kann. Wichtig erscheint, dass mit sehr kleinen Samenportionen -bis zu einem Hundertstel der konventionell eingesetzten Spermienanzahl- erfolgreich Besamungen durchgeführt werden können. Auffallend ist auch, dass die ersten Ergebnisse aus dieser Studie niedrige Gewinnungsraten aus der Eileiterspülung vorweisen. Mit der steigenden Anzahl der durchgeführten ITBs und dementsprechend gewonnenen Erfahrung nahm die Gewinnungsrate von Embryonen bzw. UFOs zu.

Im Verlauf der Studie konnte gezeigt werden, dass der Zugang zur Bauchhöhle, die Erzeugung eines Pneumoperitoneums, die Manipulation des Ovars inklusive des Eileiters in unmittelbarem zeitlichen Zusammenhang mit dem Ovulationsvorgang standen. So wies die Variation des Besamungszeitpunktes trotz geringer Anzahl von Wiederholungen darauf hin, dass die ITB nicht zu nah an der zu erwartenden Ovulation stattfinden sollte. Bei der ITB 22h nach GnRH, also zeitlich näher zur Ovulation, konnte nur bei einem von 5 Tieren ein Embryo gespült werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass nicht genügend Zeit bis zur Ovulation vorhanden war, um die korrekte Positionierung des Infundibulum zum Ovar hin wieder herzustellen. Hinweise darauf lagen auch vor, wenn bereits bei der Besamung ersichtlich war, dass der Graaf'sche Follikel unmittelbar vor der Ovulation stand, d.h. die Vorwölbung der Ovulationsstelle zu erkennen war. Bei diesen Kalbinnen konnte kein Embryo oder UFO gefunden werden. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit erkennen, dass die intratubale Besamung beim Rind eine Methode für die Untersuchung vielfältigster wissenschaftlicher Fragestellungen rund um Gameten, Befruchtung und frühe Embryonalentwicklung darstellt. Mit ihr kann auch die Fertilität eines Stiers in vivo unter deutlicher Reduktion des Einflusses des weiblichen Reproduktionstraktes untersucht werden. Außerdem kann die ITB in verschiedensten Bereichen der Rinderzucht praktisch eingesetzt werden, wie z.B. die Verwendung von Samen eines Stieres mit qualitativen bzw. quantitativen Einbußen inklusive der Anwendung von gesextem Samen.

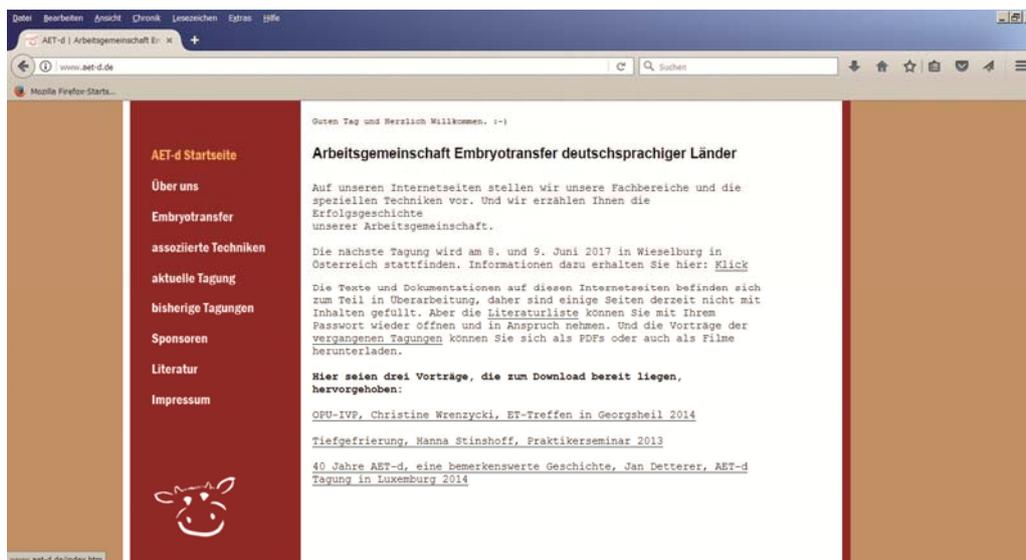
Derzeit wird die Methode auf Anwendbarkeit zur Embryonengewinnung nach Superovulation und Besamung mit gesextem Samen untersucht.

Wir danken der *BVW (Landwirtschaftliche Bundesversuchswirtschaften GmbH)* für die finanzielle Unterstützung unseres Forschungsprojektes und der *Genostar Rinderbesamung GmbH Wieselburg* für die Zurverfügungstellung jeglicher Art von Rindersamen.

Überlegungen zur Homepage der AET-d

Jan Detterer, Ute Andresen – Georgsheil, Osteel

Derzeitiger Stand der Homepage:



Vorschlag für die neue Struktur:

