

## VIER JAAR OVUM PICK-UP (OPU) EN *IN VITRO* FERTILISATIE (IVF) BIJ DONOREN VAN HET BELGISCH WITBLAUW RAS

*Four years of ovum pick-up (OPU) and in vitro fertilization (IVF)  
in Belgian blue donor cows*

R. De Roover<sup>\*1</sup>, G. Genicot<sup>1</sup>, S. Leonard<sup>1</sup>, E. Denis<sup>1</sup>, J.M. Feugang<sup>1</sup>, P.E.J. Bols<sup>2</sup>, A. Massip<sup>1</sup>, F. Dessy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Catholique de Louvain, Unité VETE, Place Croix du Sud 2,  
B-1348 Louvain-la-Neuve

<sup>2</sup>Universiteit Antwerpen, Departement Diergeneeskunde, Laboratorium voor de Fysiologie van de Huisdieren, Universiteitsplein 1 - Gebouw U, B-2610, Wilrijk

\* Correspondentieadres: R. De Roover, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Service d'Obstétrique et Pathologie des Ruminants, Equidés et Porcs,  
Boulevard de Colonster 20 B42, B-4000 Liège  
rderoover@msn.com

### SAMENVATTING

Tussen 1996 en 2000 werden 79 donoren van het Belgisch Witblauw ras onderworpen aan Ovum Pick-Up (OPU) en *In Vitro* Fertilisatie (IVF), nadat ze eerder ingeschakeld werden in klassieke embryo-transferprogramma's met op termijn tegenvallende resultaten. Gedurende de bestudeerde periode werden twee verschillende *in vitro* embryoproductieprotocollen gebruikt. Tussen 1996 en 1998 (periode A) werden de eicellen gerijpt in M199 waaraan Epidermal Growth Factor (EGF) en Foetaal Kalf Serum (FCS) werden toegevoegd. De zygoten werden daarna in een granulosacel co-cultuur gebracht in een SOF-medium. Vanaf 1998 tot 2000 (periode B) werden TCM199, FCS, equine chorionic gonatrophin (eCG) en een granulosacelcultuur gebruikt bij de *in vitro* maturatie, waarna de zygoten op cultuur werden geplaatst in SOF, waaraan een co-cultuur van bovine epitheliale oviductcellen (BOEC) werd toegevoegd. Tijdens periode A werden 531 OPU-IVF-sessies verricht, waarbij 2111 cumulus oocyt complexen (COC's) werden verzameld, waarvan 928 (44 %) van goede morfologische kwaliteit. *In vitro* maturatie (IVM), fertilisatie (IVF) en cultuur (IVC) van deze eicellen resulteerden in 241 overplantbare embryo's. Na een transfer van verse embryo's (n=88) werd een drachtigheidspercentage van 27 % bekomen; na het overzetten van diepgevroren embryo's (n=18) bedraagt het drachtigheidspercentage 29%. Gedurende periode B werden 1519 OPU-sessies verricht waarbij 7027 COC's werden verzameld, met 2157 (31%) eicellen van goede kwaliteit. Na IVM-IVF-IVC werden 1120 overplantbare embryo's gekweekt, waarvan er 438 vers werden overgezet met een drachtigheidspercentage van 39 % als gevolg. Transfer van diepgevroren embryo's (n=139) leidde slechts in 5 % van de gevallen tot dracht. Over het algemeen verbeterden de resultaten in de loop van de bestudeerde periode (A+B), waarbij de individuele donor een zeer grote invloed had op het eindresultaat. Op het einde van periode twee werden gemiddeld 0,8 embryo's gekweekt per OPU-sessie. Omwille van de problematische invriesbaarheid van *in vitro* embryo's blijft het overplanten van verse embryo's de beste optie. Nochtans blijkt dat de beschikbaarheid van goede receptoren hier de limiterende factor te zijn.

### ABSTRACT

Between 1996 and 2000 79 Belgian blue donor cows were submitted to OPU-IVF. They all had a history in classical embryo transfer programs with disappointing results. Two different *in vitro* embryo production protocols were used. Between 1996 and 1998 (period A), oocytes were matured in M199 and Epidermal Growth Factor (EGF) and Foetal Calf Serum (FCS) were added. Subsequently, the oocytes were cultured in a granulosa co-culture system in a Synthetic Oviduct Fluid (SOF) medium. From 1998 until 2000 (Period B), M199, FCS, equine chorionic gonatrophin (eCG) and a granulosa cell co-culture were used for *in vitro* maturation. Zygotes were subsequently cultured in SOF with a co-culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). During period A, 531 OPU-IVF

sessions were performed, collecting 2111 cumulus oocyte complexes (COCs), of which 928 (44 %) were of good morphological quality. The *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC) resulted in 241 transferable embryos. When fresh embryos (n=88) were transferred, a pregnancy rate of 27 % was obtained, whereas the transfer of frozen embryos (n=18) resulted in 29 % pregnant recipients. During period B, 1519 OPU sessions were performed, collecting 7027 COCs, with 2157 (31%) of them being of good quality. Following IVM-IVF-IVC, we cultured 1120 transferable embryos of which 438 were transferred fresh, resulting in a pregnancy rate of 39%. The transfer of frozen embryos (n=139) yielded a pregnancy rate of only 5 %. The overall results improved over the years, while individual donor variability was one of the main factors that had influence on the OPU-IVF success rate. At the end of the second period, an average of 0.8 embryos were obtained per OPU session. Since freezing of *in vitro* derived bovine embryos is still problematic, the transfer of fresh embryos remains the best option. However, in our circumstances the availability of good quality recipients appeared to be the limiting factor.

## INLEIDING

In 1981 werd het eerste kalf met behulp van *in vitro* fertilisatie geboren (Brackett *et al.*, 1982). Vandaag is het na 20 jaar intens onderzoek mogelijk om routinematig *in vitro* embryo's te produceren die na het overplanten in ontvangsters uitgroeien tot normale kalveren (Van Soom *et al.*, 1994; Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1996a, Bousquet *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2001). De eicellen die hiervoor worden gebruikt, zijn afkomstig van slachthuisovaria of worden bij levende donoren geaspireerd op de ovaria (Ovum Pick-Up, OPU). Initieel gebeurde dit middels een chirurgische ingreep of via laparoscopie (Holland *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 1983; Schellander *et al.*, 1989), later via de echogeleide ovariële punctie die voor het eerst bij het rund werd beschreven door Callesen *et al.* (1987) en Pieterse *et al.* (1988). Zij pasten de transvaginale echogeleide punctie vanuit de humane reproductie aan voor gebruik bij de koe. Zo stond een techniek ter beschikking die gekenmerkt wordt door een weinig invasief karakter en een hoge herhaalbaarheid. De techniek is momenteel de standaard techniek voor eicelwinning bij levende donoren (voor een overzicht zie Bols *et al.*, 1994). Aanvankelijk werd weinig gebruik gemaakt van ovariële stimulatie, nu worden meer frequent gonadotrofinen gebruikt om de folliculaire activiteit voor het punteren te stimuleren. Bij niet-gestimuleerde dieren, die twee maal per week een OPU-sessie ondergaan, aspireert men gemiddeld tussen 4,9 (Hasler *et al.*, 1995) en 6 (Looney *et al.*, 1994) eicellen per punctie, waarmee dan gemiddeld 0,8 tot 2 embryo's per OPU-sessie geproduceerd kunnen worden (Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995; Galli *et al.*, 2001).

Tijdens de voorbije 10 à 15 jaar werden in verschillende onderzoekscentra IVF-programma's opgestart met verschillende doelen voor ogen. Zo werd bij-

voorbeeld getracht het aantal tweelingdrachten te verhogen door het overplanten van *in vitro* embryo's (Gordon 1994; Sinclair *et al.*, 1994) of werden *in vitro* embryo's gekweekt met behulp van eicellen van geselecteerde donoren met waardevolle productie-eigenschappen naar melkproductie of karkaskwaliteit toe (Hasler *et al.*, 1994). Ook werden prepuberale dieren gebruikt als eiceldonor om het generatie-interval te verkorten (Fry *et al.*, 1998, Majerus *et al.*, 1999; Bols *et al.*, 1999; Taneja *et al.*, 2000; Galli *et al.*, 2001). De combinatie OPU-IVF biedt ook mogelijkheden voor de behandeling van genetisch waardevolle donoren met vruchtbaarheidsproblemen (Hasler *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1996a; Van Soom *et al.*, 1997; Hashimoto *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2001), of ze is de laatste hoop op bijkomende nakomelingen van terminaal zieke of gewonde dieren (Stringfellow *et al.*, 1993; Hashimoto *et al.*, 1999). Tenslotte wordt OPU-IVF ook gebruikt in doelbewust opgezette fokprogramma's waarin streng geselecteerde donoren reeds gepuncteerd worden op vrij jonge leeftijd. Na de punctie worden de eicellen bevrucht met sperma van veelbelovende stieren (Merton, Holland Genetics, persoonlijke mededeling), waardoor een snelle genetische vooruitgang kan geboekt worden. Sommige auteurs beschouwen de combinatie OPU-IVF als een mogelijk alternatief voor de klassieke superovulatie- en embryotransfer(ET)-programma's, vooral omwille van de hoge herhaalbaarheid. Bovendien biedt deze combinatie een uitweg voor gevallen waarbij superovulatie faalt door een gebrekkige reactie op de gonadotrofinestimulatie of voor gevallen waarbij de klassieke ET onmogelijk is geworden door letsels van het geslachtsstelsel (Hasler *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1996; Galli *et al.*, 2001). De eerste OPU-IVF-kalveren werden in België geboren in 1996 (Bols *et al.*). Ons team startte aan de UCL in 1994. De eerste twee jaren werden besteed aan het op

punt stellen van de *in vitro* productietechnieken (Donnay *et al.*, 1996). Vanaf 1996 werd dan gestart met het gebruik van OPU-IVF bij elitedonoren van het Belgisch Witblauw ras. Dit artikel geeft een overzicht van de resultaten die gedurende 4 jaar werden bekomen met OPU-IVF bij deze donoren.

## MATERIAAL EN METHODEN

### Belgisch Witblauw donoren en het OPU-aspiratiesysteem

De donoren werden gedurende de behandelingsperiode gehuisvest in het onderzoekscentrum. Het voederantsoen bestond uit maïs, hooi, suikerbietpulp, grassilage en krachtvoer en varieerde naargelang het seizoen waarbij gelet werd op het behoud van een constante lichaamsconditie. Ze werden op maandag en donderdag onderworpen aan Ovum Pick-Up. De gebruikte apparatuur is elders uitvoerig beschreven (Donnay *et al.*, 1996). Voor het punteren kregen de dieren een epidurale anesthesie. Dan werden de follicels op het ovarium gevisualiseerd, aangeprikt en de inhoud ervan werd opgezogen.

### Verzamelen van de eicellen en de beoordeling van de kwaliteit

In het laboratorium werden, na recuperatie, de eicellen in 4 klassen verdeeld volgens hun morfologie (Figuur 1): Kwaliteit 1: > 5 lagen cumuluscellen, Kwaliteit 2: 3-5 lagen cumuluscellen, Kwaliteit 3: < 3 lagen cumuluscellen of gedeeltelijk naakte eicellen en Kwaliteit 4: naakte eicellen.

### *In vitro* productie van embryo's (maturatie – fertilisatie – cultuur)

De eicellen werden gedurende 24 uur overgebracht in een maturatiemedium. Van 1996 tot 1998 (Periode A) werd gebruik gemaakt van TCM199 als basismedium waaraan EGF en FCS werden toegevoegd. Van 1998 tot 2000 (periode B) werd TCM 199 gebruikt, verrijkt met eCG, human Chorionic Gonadotrophin (hCG), FCS en een co-cultuur van granulosa cellen.

Na 24 uur werden ze overgebracht in een fertilisatiemedium (Vansteenbrugge *et al.*, 1994). Er werd sperma van een vooraf geteste Witblauw stier toegevoegd aan een concentratie van 2 tot 4 miljoen spermatozoïden per ml, naargelang de gebruikte stier (duur 18 tot 24 uur).

Vervolgens worden de bevruchte eicellen overgebracht naar het eigenlijke cultuurmedium. Tijdens pe-

riode A was dit het Synthetic Oviduct Fluid of het SOF-medium (Takahashi en First, 1992) waaraan onder andere FCS en een mengsel van aminozuren en granulosa cellen werden toegevoegd. Tijdens periode B was dit een ander SOF-medium (Holm *et al.*, 1997) waaraan FCS werd toegevoegd naast een co-cultuur van bovine epitheliale oviductcellen (BOEC) (duur 7 dagen).

Het kweken van de embryo's gebeurde van begin tot eind bij 38,5 °C, 100 % relatieve luchtvochtigheid en in een atmosfeer met 5 % CO<sub>2</sub>.

### Invriezen van embryo's

De embryo's werden ingevroren in een 10% glycerol-sucrose oplossing (Massip *et al.*, 1987). Deze invriesteknik is geschikt voor 'direct transfer', waarbij het ontdooide rietje onmiddellijk in de ontvangster wordt getransfereerd.

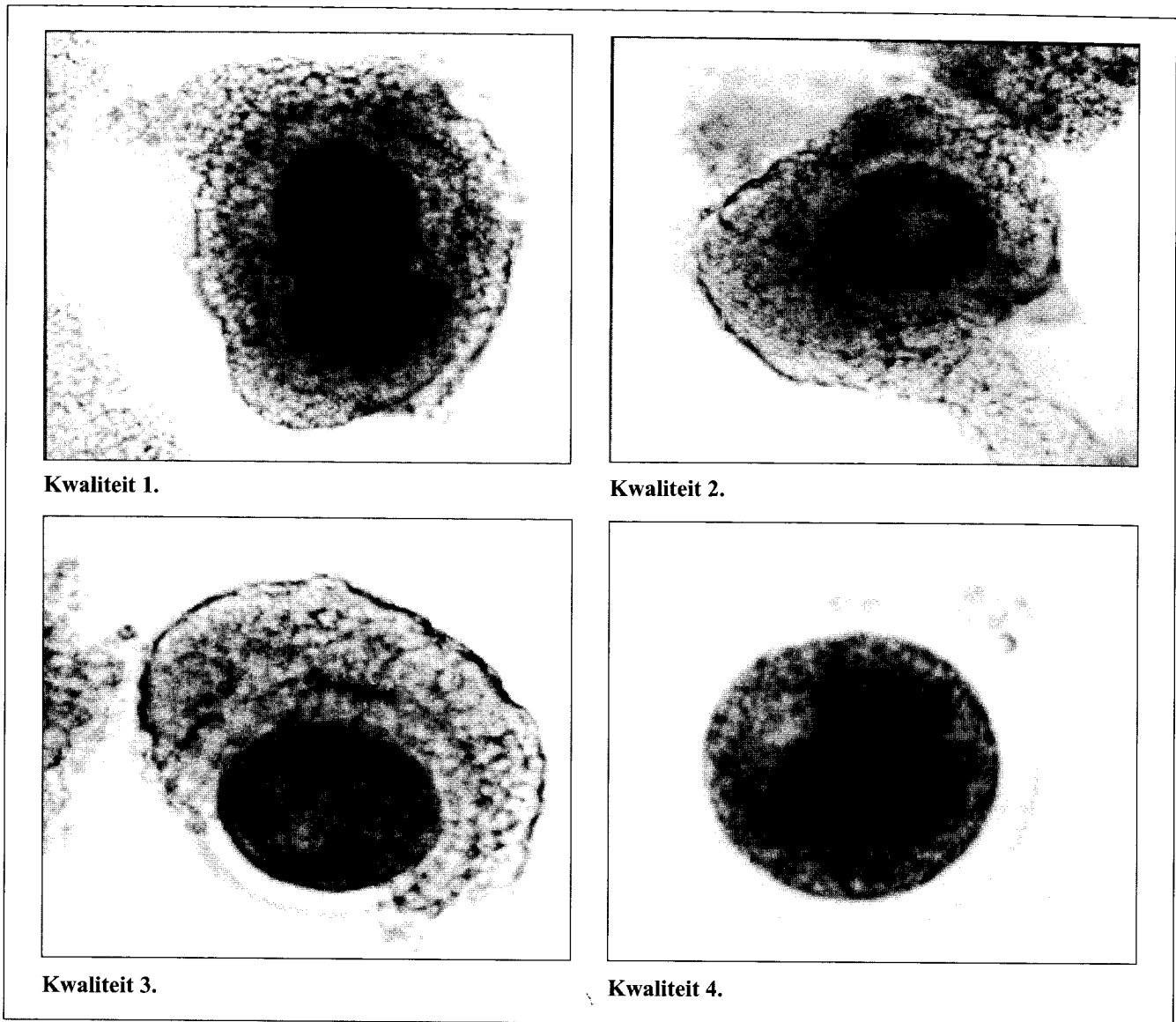
### Statistische analyse

Voor de vergelijking van gemiddelde resultaten die werden bekomen tijdens de analyse van de data werd gebruik gemaakt van ANOVA (SYSTAT 5.2.1). Een Chi-kwadraat test werd gebruikt om proporties te vergelijken.

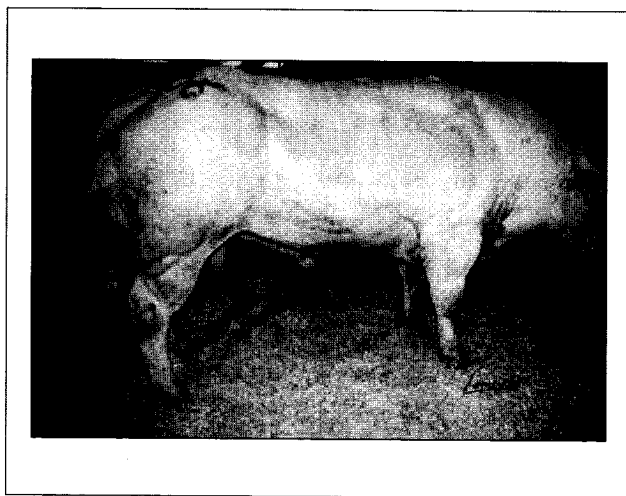
## RESULTATEN

### Donoren en gebruikte KI-stieren

Gedurende de totale periode (A+B) werden 79 donoren met een leeftijd tussen 1,5 en 13 jaar oud onderworpen aan OPU-IVF. Alle dieren hadden problemen met (*in vivo*) embryoproductie, hetzij door een ondermaatse embryoproductie na de superovulatie (mededeling van de eigenaar, geen cijfers beschikbaar), hetzij door problemen bij het uitspoelen van de embryo's tengevolge van vergroeiingen of mechanische belemmeringen (onmogelijkheid tot het inbrengen of het correct plaatsen van de spoelende). De genetische waarde van de dieren was hoog, met een gemiddelde eindbeoordeling bij lineaire quotering van 88,6 ± 2,5, waarbij 31 % van de donoren boven de 90 % scoorde, en verschillende nationale raskampioenen werden gepunteeerd. Het sperma dat gebruikt werd, was afkomstig van stieren die reeds ingeschakeld werden in kunstmatige inseminatie (KI) programma's. De grote meerderheid werd vooraf getest met betrekking tot hun *in vitro* bevruchttingscapaciteit. Er werden 61 stieren gebruikt. Zoals blijkt uit Tabel 1, waarin de resultaten van de 5 best en de 5 slechtst bevruchtende



**Figuur 1.** Eicellen van verschillende morfologische kwaliteit ( 1 – 2 – 3 en 4).



**Figuur 2.**  
**Naam:** In vitro de Sart  
**Geboren op** 21/3/1998  
**Eerste prijs op het « 11° concours foire BBB » in Waver**  
**op** 5/2/2000  
**Eigenaar :** Yves Nerinckx (Bolinne)

stieren worden weergegeven, speelt ook de *in vitro* fertiliteit van de gebruikte stier een zeer belangrijke rol.

**Aantal OPU-sessies**

In Tabel 2 worden het aantal OPU-sessies, de eicellen en embryo's per donor weergegeven, opgesplitst in periode A en periode B. Tijdens periode B werden de dieren over een langere periode onderworpen aan OPU-IVF, waardoor er ook meer eicellen en embryo's geproduceerd werden. Zo werden de donoren gedurende periode A slechts half zo vaak gepuncteerd als in periode B. Het aantal eicellen en embryo's steeg echter meer dan proportioneel. Zo werden ongeveer 2,4 maal meer eicellen verzameld tijdens periode B en werden ongeveer 3,3 maal meer embryo's gekweekt. Het minimum aantal OPU-sessies per donor was 1, terwijl het maximale aantal 98 was.

Tabel 1. De resultaten van de *in vitro* bevruchting door de vijf best en de vijf slechtst bevruchtende stieren.

	Stieren	Aantal eicellen op cultuur geplaatst	% embryo's op dag 7
Best bevruchtende	VG	328	37 %
	JM	385	25 %
	BL	522	21 %
	OV	695	21 %
	SE	509	20 %
Slechtst bevruchtende	VS	325	9 %
	OB	465	12 %
	BO	892	14 %
	BE	994	14 %
	BR	238	4 %

Tabel 2. Het aantal OPU-sessies, de eicelopbrengst en het aantal embryo's per donor.

Periode	Aantal donoren	Aantal OPU-sessies/donor	Aantal eicellen/donor	Aantal embryo's/donor
A	33	16,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	63,9 ± 11,3 <sup>a</sup>	7,3 ± 1,8 <sup>a</sup>
B	46	33,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	152,7 ± 18,7 <sup>b</sup>	24,3 ± 3,1 <sup>b</sup>
<b>Totaal</b>	<b>79</b>	<b>25,9 ± 2,6</b>	<b>115,3 ± 12,9</b>	<b>17,2 ± 2,2</b>

<sup>ab</sup> Waarden met verschillende index binnen dezelfde kolom verschillen significant (P = 0,05).

### Aantal eicellen en eicelkwaliteit

In Tabel 3 wordt het aantal eicellen opgegeven dat per OPU-sessie werd geoogst, opgesplitst per periode, alsmede het aantal eicellen in de twee beste kwaliteitsklassen. Daarbij moet opgemerkt worden dat het aspiratievacuüm verhoogd werd van 35 mm Hg tijdens periode A naar 70 mm Hg tijdens periode B. Dit veroorzaakte een stijging van het gemiddeld aantal eicellen per sessie, maar anderzijds ook een daling van het aantal eicellen in de beste kwaliteitsklassen.

### Aantal geproduceerde *in vitro* embryo's

In Tabel 4 wordt het aantal embryo's weergegeven dat gedurende beide perioden *in vitro* werd geproduceerd. Ondanks een daling van het percentage morfologisch goede eicellen (Tabel 3), stegen het percentage embryo's en het aantal geproduceerde embryo's per OPU-sessie tijdens periode B. Verder dient opgemerkt dat niet alle geoogste eicellen in cultuur werden gebracht. Het aantal geproduceerde embryo's ten opzichte van het totaal aantal geoogste eicellen bedroeg

**Tabel 3. Het aantal geogste eicellen, het gemiddelde aantal eicellen per sessie en de eicelkwaliteit, opgesplitst per periode.**

Periode/ aspiratievacuüm	Aantal OPU- sessies	Totaal aantal eicellen	Aantal eicellen/ OPU-sessie	Totaal aantal eicellen kwal. 1 en 2*	Aantal eicellen kwal. 1 en 2/ OPU-sessie
A/ 35 mm Hg	531	2111	3,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	928 (44 %)	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup>
B/ 70 mm Hg	1519	7027	4,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	2157 (31 %)	1,4 ± 0,04 <sup>b</sup>
<b>Totaal</b>	<b>2050</b>	<b>9138</b>	<b>4,5 ± 0,1</b>	<b>3085 (34%)</b>	<b>1,5 ± 0,04</b>

<sup>ab</sup> Waarden met verschillende index binnen dezelfde kolom verschillen significant (P = 0,05).

\* 'Kwaliteiten 1 en 2'- eicellen.

**Tabel 4. Het aantal OPU-sessies, de eicelopbrengst en het aantal embryo's per donor, opgesplitst naargelang de maturatie- en cultuurcondities (gemiddelde ± SEM).**

Periode	Aantal OPU- sessies	Aantal eicellen in cultuur	Aantal embryo's	% embryo's	Aantal embryo's/ OPU-sessie
A	531	1592 (75 %)	241	15 %	0,45 ± 0,05 <sup>a</sup>
B	1519	5814 (83 %)	1120	19 %	0,75 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>Totaal</b>	<b>2050</b>	<b>7406 (81 %)</b>	<b>1361</b>	<b>17 %</b>	<b>0,66 ± 0,03</b>

<sup>ab</sup> Waarden met verschillende index binnen dezelfde kolom verschillen significant (P = 0,05).

tijdens periode A 11,1 % (241/2111) en tijdens periode B 16 % (1120/7027).

Als illustratie van de grote individuele variatie in de opbrengst van het uiteindelijke aantal embryo's werden de resultaten van de 5 beste en 5 slechtste donoren samengeteld en weergegeven in Tabel 5. De betere donoren gaven hogere aantallen eicellen, maar vooral ook hogere aantallen *in vitro* geproduceerde embryo's. Tijdens periode A gaven de betere donoren gemiddeld 2 maal zoveel eicellen en 5 maal zoveel embryo's als de slechtste donoren. Dit geldt evenzeer voor periode B waar de betere dieren maar liefst 6 maal meer embryo's produceerden dan de slechtste donoren. Tijdens periode A gaf 71 % van alle OPU-sessies geen *in vitro* embryo, 16 % gaf 1 embryo en 13 %

gaf 2 of meer embryo's. Tijdens periode B bedroegen deze waarden respectievelijk 56 %, 25 % en 19 %.

#### Kwaliteit van de embryo's

Tijdens periode A werd 37 % van de geproduceerde *in vitro* embryo's ingevroren. Alle andere embryo's werden vers overgeplant. Tijdens periode B daalde het percentage ingevroren embryo's tot 25 %. Tabel 6 geeft de drachtigheidsresultaten weer na het overplanten van verse en ingevroren *in vitro* embryo's.

Tijdens periode B stelden we een stijging vast van het drachtigheidspercentage na een transfer van verse embryo's, terwijl het drachtigheidspercentage met ingevroren embryo's drastisch daalde. Bij vaarzen en

**Tabel 5. Het gemiddelde aantal geogste eicellen en geproduceerde *in vitro* embryo's per OPU-sessie voor de vijf beste en vijf slechtste donoren, opgesplitst per periode.**

Periode	Donoren	Aantal OPU-sessies	Totaal aantal eicellen	Aantal embryo's	Aantal eicellen/ OPU-sessie*	Aantal embryo's/ OPU-sessie*	% ontwikkeling
A	5 slechtste	74	213	8	2,88 ± 0,1	0,11 ± 0,03	4 %
	5 beste	142	676	79	4,76 ± 0,1	0,56 ± 0,05	12 %
B	5 slechtste	99	325	21	3,28 ± 0,03	0,21 ± 0,02	6 %
	5 beste	128	871	185	6,8 ± 0,1	1,45 ± 0,04	21 %

\* gemiddelde ± SEM.

**Tabel 6. Drachtigheidsresultaten na transfer van verse en ingevroren *in vitro* geproduceerde embryo's.**

Periode	Drachtigheidspercentage verse <i>in vitro</i> embryo's	Aantal transfers	Drachtigheidspercentage ingevroren <i>in vitro</i> embryo's	Aantal transfers
A	27 % <sup>a</sup>	88	29 % <sup>a</sup>	18
B	39 % <sup>b</sup>	438	5 % <sup>b</sup>	139

ab Waarden met verschillende index binnen dezelfde kolom verschillen significant (P = 0,05).

primipare koeien bleek het drachtigheidspercentage na een transfer van verse embryo's 42 %, terwijl bij multipare dieren het drachtigheidspercentage 25 % bedroeg. Bij geëxpandeerde embryo's bleek 43 % van de dieren drachtig te zijn; niet-geëxpandeerde blastocysten daarentegen resulteerden in 22 % van de gevallen in een drachtige ontvangster.

### Kalveren

Tijdens periode A werden in 58 % van de gevallen mannelijke kalveren geboren, tijdens periode B was dit 53 %. Nog tijdens periode A werden 15 sterfgevallen gesignaleerd kort na de geboorte. Binnen deze groep van 15 hadden 8 kalveren dezelfde stier als vader. In twee gevallen werd de normale drachtduur overschreden met 28 dagen, waardoor de kalveren extreem groot waren en niet levensvatbaar bleken te zijn.

### DISCUSSIE

Het merendeel van de 79 hierbeschreven dieren had al een paar keer gekalfd, niet-gekalfde vaarzen werden incidenteel gepunteeerd. De vruchtbaarheidsproblemen die zich bij de meeste onder hen op termijn manifesteerden bij het uitvoeren van ET, bleken geen bezwaar voor de *in vitro* productie van embryo's. De hoge punctiefrequentie werd door het overgrote deel van de dieren goed verdragen. Slechts één geval van peritonitis deed zich voor na punctie en één keer werd een epidurale ontsteking vastgesteld. Het hoge punctieritme en het achterwege laten van hormonale stimulatie impliceren echter ook een lagere opbrengst van eicellen en embryo's. Het aantal eicellen zou enigzins kunnen verhoogd worden door het verhogen van de aanzuigdruk, zoals bevestigd door onze gegevens, en wellicht ook door het gebruik van een wat dikkere naald (Bols *et al.*, 1996b). Dit houdt echter risico's in met betrekking tot de eicelkwaliteit, omdat

er meer beschadiging optreedt van de cumuluscellen wanneer een hoger aspiratievacuüm wordt gebruikt (Bols *et al.*, 1997). In vergelijking met de literatuurgegevens is de eicelopbrengst laag (Looney *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1996a, Galli *et al.*, 2001). Gezien in deze studie het aantal follikels niet werd opgetekend, kan niet worden uitgemaakt of het om een probleem van eicelrecuperatie, dan wel een ras- of diergebonden probleem gaat.

Zoals verwacht, werden ook door ons grote individuele verschillen tussen de donoren gevonden (Bols *et al.*, 1996a; Kruip *et al.*, 1997; Hasler *et al.*, 1995; Galli *et al.*, 2001).

Het aantal puncties dat een dier kan ondergaan, blijkt onbepaald. Gemiddeld werden donoren vier maanden gepuncteerd (periode B). Kruip *et al.* (1994) vonden een hoge herhaalbaarheid in het aantal follikels en eicellen over een periode van verscheidene maanden waarin OPU werd uitgevoerd.

Het maturatiemedium dat werd gebruikt tijdens periode B en waar granulosacellen werden aan toegevoegd, was gebaseerd op de methodiek beschreven door Lazzari *et al.* (1996). Die methode heeft als voordelen een verhoogd ontwikkelingspercentage en een hoger aantal cellen in de geproduceerde embryo's (Donnay *et al.*, 2002).

Tijdens de volledige periode (A+B) werden alle embryo's gecultiveerd in aanwezigheid van cellen. Dit bleek in onze cultuuromstandigheden nodig om het negatief effect van het kweken van embryo's in kleine groepjes te omzeilen (Ferry *et al.*, 1992, Donnay *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 2002).

Het is bekend dat de spermakwaliteit van zeer groot belang is voor het succes van *in vitro* fertilisatie, zoals aangetoond wordt door de individuele variatie tussen de verschillende stieren (Tabel 2). Onze resultaten bevestigen de resultaten van menige andere studie (Eyestone *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1990; Hillyer-Weinhold *et al.*, 1991). Kleine aanpassingen van het standaardprotocol bleken nodig te zijn voor het verbeteren van de individuele resultaten van de stieren (Galli, Twagiramungu, persoonlijke mededeling). Zo bleek dat bij een vergelijking van verschillende spermac concentraties van eenzelfde stier, vaak verschillen optraden; de resultaten verbeterden vaak bij hogere spermac concentraties.

Op vraag van de donoreigenaars werden in sommige gevallen ook stieren gebruikt die *in vitro* minder goede bevruchttingscapaciteiten hadden, maar anderzijds specifiek gewenste genetische kwaliteiten konden aanbrenge. Hierop werd steeds ingegaan, zelden of

nooit werd een stier opgedrongen. Het resultaat was dan ook: (waarschijnlijk) minder embryo's maar een tevreden eigenaar.

Het percentage embryo's is lager dan het percentage dat men kan verwachten met eicellen uit slachthuisovaria (25% tot 35 %, Gordon, 1994). Dit is voor een deel te verklaren door het feit dat bij het gebruik van slachthuismateriaal het aanbod van eicellen zeer groot is, waardoor er vooraf geselecteerd kan worden en de *in vitro* kweek dan eigenlijk gebeurt op een subpopulatie eicellen van de beste morfologische kwaliteit. Bovendien worden in deze experimenten meestal enkel stieren gebruikt met een goede *in vitro* bevruchttingscapaciteit. In onze OPU-IVF-opzet was geen eicelselectie mogelijk, omdat dikwijls slechts kleine hoeveelheden eicellen beschikbaar waren van bepaalde donoren. Daarbij werden zoveel mogelijk eicellen gebruikt, omdat iedere eicel intrinsiek steeds een kans heeft om uit te groeien tot een overplantbaar embryo. De ogenschijnlijke contradictie in onze gegevens waarbij in periode B meer embryo's/OPU bekomen werden dan in periode A (niettemin staande een slechtere kwaliteit van de eicellen) is naar onze mening door een verbeterd maturatiemedium te verklaren.

Het drachtigheidspercentage na het overplanten van verse *in vitro* embryo's nam toe van 29% naar 42%. Dit kan deels te danken zijn aan een verbeterde embryo-kwaliteit, maar deels ook aan de toegenomen ervaring met de selectie van 7 dagen oude *in vitro* embryo's van goede kwaliteit én aan de verbeterde transportcondities, vooral wat de temperatuur betreft. Dit percentage kan nog verder verhoogd worden door meer aandacht te besteden aan de selectie van de ontvangsters. Omdat het merendeel van de embryo's het invriesproces niet overleeft, worden zoveel mogelijk embryo's vers overgeplant, zelfs in niet-optimaal voorbereide ontvangsters (wanneer er gebrek is aan beter gesynchroniseerde dieren). Ter vergelijking: met *in vivo* gekweekte, vers overgeplante embryo's kunnen drachtigheidspercentages van 50 tot 55 % worden bekomen (resultaten van twee embryo transfer equipes in Wallonië werkend met hoofdzakelijk Witblauw donoren; het betreft in totaal meer dan 1800 transfers).

De slechte invriesbaarheid van *in vitro* embryo's zou gedeeltelijk terug te voeren zijn op de cultuurmethode (Rizos *et al.*, 2002). Zo werden betere invriesresultaten bekomen wanneer aan het cultuurmedium Bovien Serum Albumine (BSA) als eiwit supplement werd toegevoegd in plaats van serum (Galli, persoonlijke mededeling). In ons geval moeten de drachtigheidsre-



sultaten van verse en ingevroren embryo's (Tabel 6) nochtans als een geheel worden bekeken: tijdens periode A werden vooral goede embryo's ingevroren en de rest werd vers overgeplant; in periode B gebeurde eerder het tegenovergestelde. Betere resultaten werden dus verkregen wanneer embryo's vers overgeplant werden en minder goede resultaten werden bekomen wanneer de embryo's ingevroren werden.

Tenslotte blijkt het onder praktische omstandigheden moeilijk om accurate informatie te verkrijgen omtrent het verloop van de kalvingen en de fysiologische conditie van de kalveren bij en kort na de geboorte. Incidenteel werden problemen gesignaleerd met het geboortegewicht, de geboorte van dode kalveren en een verlengde draagtijd. Alhoewel dit in vele gevallen geen exclusieve problemen zijn voor de drachten met *in vitro* gekweekte kalveren, blijken in de literatuur toch gegevens voorhanden die een zekere problematiek in deze richting doen vermoeden (Holland *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1994; Behboodi *et al.*, 1995; Gany *et al.*, 1996; Kruij *et al.*, 1997; Van Wagendonk *et al.*, 1998 en 2000; Numabe *et al.*, 2000). Een betere opvolging moet in dit verband uitsluitel van specifieke problemen mogelijk maken. De verklaring voor dit probleem kan onder andere worden gezocht in een onevenwicht in de nutriënten (een relatief rijk cultuurmedium, serum, groeifactoren geproduceerd door de cellen in co-cultuur en het mogelijk ontbreken van andere nutriënten). Dit alles resulteert in een nogal snelle ontwikkeling van toch ietwat afwijkende embryo's waaruit afwijkende kalveren kunnen voortkomen (Van Wagendonk *et al.*, 2000).

De kalveren zelf weerspiegelen de kwaliteit van de moederdieren. Inderdaad, heden (2003), 9 jaar na het begin van OPU-IVF, worden eerste prijzen op prijskampen meestal behaald door *in vitro* geproduceerde dieren. Op de nationale prijskamp te Doornik in februari 2003 bijvoorbeeld was het kampioenschapsdier bij de vaarzen OPU-IVF-geproduceerd. Op de verschillende prijskampen elders in Wallonië worden er eveneens regelmatig eerste prijzen behaald met *in vitro*-geproduceerde dieren. Gezien er echter bijna nooit een aanduiding "*in vitro*" in de naam van de dieren staat, wordt het vaak niet opgemerkt. Foto: In Vitro de Sart, eigenaar Nerickx van Sart-Risbart (Waals Brabant).

De rentabiliteit van OPU-IVF is, zoals de klassieke embryotransplantatie en alle andere methoden, complex en wordt beïnvloed door micro- en macrofactoren, interne en externe factoren (Hulsen *et al.*, 2002, 2003, 2003).

Zowel de voordelen en de rentabiliteit voor de veehouder als voor de uitvoerders van de techniek moeten afgewogen worden. De tevredenheid van de veehouder wordt bepaald door de goede drachtigheidsresultaten na transplantatie bij een dier waarvoor hij de hoop al had opgegeven, de kwaliteit van de kalveren en de kostprijs van de OPU-IVF. Desalniettemin moet gezegd worden dat het hier uiterst gemotiveerde veehouders en uitvoerders betref. Het klaarzetten van ontvangsters twee maal per week zonder de zekerheid een embryo te bekomen, de (soms toch wel) verre verplaatsingen twee maal per week van de boer om het embryo op te halen en van de dierenarts die de embryotransplantatie uitvoert, vereisen heel wat inzet en passen niet altijd in drukke werkschema's.

Gezien de laagconjunctuur in de vleesveehouderij tijdens de beschreven periode oversteeg de prijs van een OPU-IVF nauwelijks de prijs van een normale embryotransplantatie. Bovendien is OPU-IVF, met een punctieritme van twee keer per week, een opslorpande bezigheid. Niet alleen OPU en de manipulaties voor fertilisatie en het in cultuur brengen nemen veel tijd in beslag, maar voor het aanmaken van de vele verschillende oplossingen voor die productie is geduld nodig. Daarom lijkt ons dan ook een gemiddelde productie van 0,8 embryo/OPU, twee maal per week, slechts nipt haalbaar voor een OPU-IVF-uitvoerder om financieel te overleven. Een selectie van de donoren, de stimulering van de ovaria en een verbetering van de productiemethoden zullen hier soelaas moeten brengen.

We kunnen besluiten dat in deze studie OPU-IVF enkel werd gebruikt om bijkomende nakomelingen te produceren van donoren afkomstig uit ET-programma's. De andere mogelijkheden (selectieprogramma's, jonge donoren, ...) werden tot op heden nog niet geëxploiteerd. Het aantal geaspireerde eicellen, de *in vitro* gekweekte embryo's per donor en de drachtigheidspercentages verbeterden met de jaren. Een constante was de grote individuele variatie, zowel van de donoren als wat de bevruchtingscapaciteit van de stieren betreft. Gemiddeld werden op het einde van de bestudeerde periode 4,6 eicellen per punctiesessie geaspireerd en werd gemiddeld net niet 1 embryo (0,8) per sessie geproduceerd. Waarschijnlijk kunnen deze resultaten nog worden verbeterd door veranderingen aan te brengen in de cultuurmethoden, door een betere selectie van de ontvangsters door te voeren en door gebruik te maken van alternatieve hormonale stimulatetherapieën voor de punctie (Sirard *et al.*, 1999; Bousquet *et al.*, 1999). De invriesbaarheid van *in vitro* geproduceerde embryo's is nog steeds problema-

tisch, waardoor het overplanten van verse embryo's de beste optie blijft, maar waarbij tegelijkertijd de beschikbaarheid van goede ontvangsters de limiterende factor is. Tenslotte stelden we vast dat een precieze studie van de fysiologische karakteristieken van de geboren kalveren zich opdringt.

## DANKBETUIGING

De auteurs danken het 'Ministère de la Région Wallonne' voor de financiering van dit project. Verder danken zij P. Bombaerts, B. Verhaeghe en D. Destain voor hun excellente, technische ondersteuning en de volgende dierenartsen die hun assistentie verleenden bij de embryotransfer-werkzaamheden: Dr. Constandt, Dr. De Ridder, Dr. Deswaef, Dr. Devillers, Dr. Geraldon, Dr. Goossens, Dr. Hostens, Dr. Horlait, Dr. Moeyaert, Dr. Rahier en Dr. Weijtjens. De heer A. Geldhof wordt bedankt voor de technische hulp. Verder danken de auteurs alle veehouders die dieren ter beschikking hebben gesteld en Dr. Boccart en Dr. Chapaux van Linalux.

## LITERATUUR

- Behboodi E., Anderson G.B., Bondurant R.H., Cargill S.Z.L., Krescher B.R., Medrand J.F., Murray J.D. (1995). Birth of calves that developed from in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 44, 227-232.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1994). Ovum Pick-Up (OPU) bij het rund. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 63, 101-108.
- Bols P.E.J., Van Soom A., de Kruif A. (1996a). Gebruik van de transvaginale Ovum Pick-Up techniek: geboorte van de eerste OPU kalveren in België. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 86-91.
- Bols P.E.J., Van Soom A., Ysebaert M.T., Vandenheede J.M.M., de Kruif A. (1996b). Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45, 1001-1014.
- Bols P.E.J., Ysebaert M.T., Van Soom A., de Kruif A. (1997). Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47, 1221-1236.
- Bols P.E.J., Taneja M., Van de Velde A., Riesen J., Schreiber D., Echelard Y., Ziomek C., Yang X. (1999). Pregnancies from prepubertal heifers following repeated oocyte collection and IVF between 6 to 12 months of age. *Theriogenology* 51, 298.
- Bousquet D., Twagiramungu H., Morin N., Brisson C., Carboneau C., Durocher J. (1999). In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51, 59-70.
- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. (1982). Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction* 27, 147-158.
- Callesen H., Greve T., Christensen F. (1987). Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 27, 217.
- Donnay I., De Roover R., Van Langendonck A., Auquier P., Bombaerts P., Kinnar T., Schuurbiers N., Dive M., Massip A., Dessy F. (1996). Production d'embryos bovines in vitro à partir d'ovocytes prélevés sur vaches vivantes par ponction échoguidée. Premiers résultats. *Annales Médecine Vétérinaires* 140, 283-291.
- Donnay I., Van Langendonck A., Auquier P., Grisart B., Vansteenbrugge A., Massip A., Dessy F. (1997). Effects of coculture and embryo number on the in vitro development of bovine embryos. *Theriogenology* 47, 1549-1561.
- Donnay I., Donatelli S., Majerus V., De Roover R., Dessy F. (2002). Maturing calf oocytes with granulosa cells from adult follicles increases blastocyst cell numbers after in vitro fertilization. *Theriogenology* 57, 717.
- Eyestone W.H., First N. (1989). Variation in bovine embryo development in vitro due to bulls. *Theriogenology* 31, 191.
- Ferry L., Mermillod P., Massip A., Dessy F. (1992). Bovine embryos cultured in serum poor oviduct conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* 42, 445-453.
- Fry R., Simpson T.L., Squires T.J. (1998). Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49, 1077-1082.
- Galli C., Crotti G., Notari C., Turini P., Duchi R., Lazzeri G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55, 1341-1357.
- Gany F.B., Adams R., McCann J.P., Odde K.G. (1996). Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology* 45, 141-152.
- Gordon I. (1994). *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International. University Press, Cambridge.
- Hashimoto S., Takakura R., Kishi I.M., Sudo T., Minami N., Yamada M. (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology* 51, 757-765.
- Hasler J.F. (1994). Commercial applications of in vitro fertilization in cattle. *Continuing Education in Veterinary Medicine Article* 6, volume 16, nr 8.
- Hasler J.F., Henderson W.B., Hurtgen P.J., Jin Z.O., McCauley A.D., Mower S.A., Neely B., Shuey L.S., Stokes J.E., Trimmer S.A. (1995). Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43, 141-152.
- Hillery-Weinhold F. (1991). The influence of individual bull on bovine in vitro fertilization and embryo development. *MS Thesis*, University of Wisconsin, Madison WI, USA.
- Holm P., Booth P.J., Vajta G., Callesen H. (1997). A protein free SOF system supplemented with amino acids, sodium citrate and myoinositol. *Proceedings of the 13<sup>th</sup> AETE Meeting*, 158.
- Holland E.J., Bindon B.M., Piper L.R., Thimonier J., Cornish K.A., Radford H.M. (1981). Endoscopy in cattle: techniques for ovarian examination by the paralumbar

- and midventral routes. *Animal Reproduction Science* 4, 127-135.
- Holland M.D., Odde G. (1992). Factors affecting calf birth weight: a review. *Theriogenology* 38, 769-798.
- Hulsen J. (2002). Serie veterinair ondernemen. Deel 1. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 127, 719-722.
- Hulsen J. (2003a). Serie veterinair ondernemen. Deel 2. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 128, 180-183.
- Hulsen J. (2003b). Serie veterinair ondernemen. Deel 3. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 128, 413-417.
- Kruip Th.A.M., Boni R., Wurth Y.A., Roelofsen M.W.M., Pieterse M.C. (1994). Potential use of ovum pick up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42, 675-684.
- Kruip Th.A.M., Den Daas J.H.G. (1997). In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 47, 43-52.
- Lambert R.D., Bernard C., Rioux J.E., Béland R., D'Amours D., Montreuil A. (1983). Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 20, 149-161.
- Lazzari G., Galli C. (1996). In vitro embryo production and its application to cattle breeding. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> AETE Meeting*, 73-82.
- Looney C.R., Lindsey B.R., Gonseth C.L., Johnson D.L. (1994). Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology* 41, 67-72.
- Majerus V., De Roover R., Etienne D., Kaidi S., Massip A., Dessy F., Donnay I. (1999). Embryo production by ovum pick-up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 52, 1169-1179.
- Massip A., Van Der Zwalmen P., Ectors F. (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27, 69-79.
- Numabe T., Oikawa T., Kikuchi T., Horiuchi T. (2000). Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 63, 1-8.
- Pieterse M.C., Kappen K.A., Kruip Th.A.M., Taverne M.A.M. (1988). Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30, 751-762.
- Rath D. (1993). Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. *Embryo Transfer Newsletter* 11, 10-15.
- Rizos D., Fair T., Papadopoulos S., Lonergan P. (2002). Developmental, qualitative and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 62, 375-386.
- Schellander K., Fayrer-Hosken R., Keefer C., Brown L., Malter H., McBride C., Brackett B. (1989). In vitro fertilization of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 31, 927-933.
- Shi D.S., Lu K.H., Gordon I. (1990). Effects of bulls on fertilization of bovine COC and their subsequent development in vitro. *Theriogenology* 33, 324.
- Sinclair K.D., Broadbent P.J., Dolman D.F., McNally J.R. (1994). In vitro produced embryos as a means of achieving pregnancies and improving productivity in beef cows. *Theriogenology* 41, 294.
- Sirard M.A., Picard L., Dery M., Coenen K., Blondin P. (1999). The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology* 51, 699-708.
- Stringfellow D., Riddell M., Riddell K., Carson R., Gray B. (1993). Use of in vitro fertilization for production of calves from involuntary cull cows. *Theriogenology* 39, 320.
- Takahashi Y., First N.L. (1992). In vitro development of bovine one cell embryos - influence of glucose, lactate, pyruvate, amino-acids and vitamins. *Theriogenology* 37, 963-978.
- Taneja M., Bols P.E.J., Van de Velde A., Ju J.-C., Schreiber D., Tripp M.W., Levine H., Echelard Y., Riesen J., Yang X. (2000). Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of Reproduction* 62, 206-213.
- Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H., Telvit H.R. (1994). Lamb birth weight following transfer is affected by the culture system used for pre-elongation development of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 13, 25.
- Van Soom A., Mijten P., Van Vlaanderen I., Van Den Branden J., Mahmoudzadeh A.R., de Kruif A. (1994). Birth of double muscled Belgian Blue calves after transfer of in vitro produced embryos into dairy cattle. *Theriogenology* 41, 855-867.
- Van Soom A., Bols P.E.J., Vanroose G., de Kruif A. (1997). Steriliteit bij hoogwaardige runderen: kans op nakomelingen blijft gewaarborgd dankzij in vitro fertilisatie. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 66, 286-293.
- Vansteenbrugge A., Vanlangendonck A., Scutenaire C., Dessy F. (1994). In vitro development of bovine embryos in buffalo rat liver conditioned or bovine oviduct conditioned medium. *Theriogenology* 42, 931-940.
- Van Wagtendonk-de Leeuw A.M., Mullaart E., de Roos A.P.W., Merton J.S., Den Daas J.H.G., Kemp B., de Ruigh L. (2000). Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53, 575-597.
- Van Wagtendonk-de Leeuw A.M., Aerts B.J.G., Den Daas J.H.G. (1998). Abnormal offspring following in vitro production of bovine pre-implantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49, 883-894.
- Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P., Boland M.P. (2002). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick up technology. *Theriogenology* 54, 433-446.