



**Veterinární univerzita Brno  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.**

## **Intrafolikulární transfer oocytů skotu**

**Svatopluk Čech a kolektiv**

Veterinární univerzita Brno  
Palackého třída 1946/1, 612 42 Brno

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i  
Hudcova 296/70, 621 00 Brno



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

## **Intrafolikulární transfer oocytů u skotu**

### **Autoři**

doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D.  
MVDr. Michaela Andrlíková  
MVDr. Vojtěch Kos  
MVDr. Beáta Marková  
MVDr. Lucie Štenclová

Metodika vznikla v rámci řešení projektů:  
IGA č. 119/2017/FVL  
MZE-RO0520

**ISBN**

## OBSAH

I)	Úvod	4
II)	Cíl metodiky	6
III)	Vlastní popis metodiky	6
IV)	Srovnání novosti postupů	10
V)	Popis uplatnění metodiky	10
VI)	Ekonomické aspekty	11
VII)	Seznam použité literatury	11
VIII)	Seznam publikací předcházejících metodice	12
IX)	Seznam zkratk	12

## I) Úvod

Produkce embryí *in vitro* u skotu (IVP) je důležitou součástí šlechtitelských programů využívaných ke zvýšení genetické hodnoty populace (Findlay a kol. 2019). Velmi důležitým nástrojem pro zkrácení generačního intervalu je získávání oocytů od velmi mladých (až prepubertálních) dárců s využitím intravitálního odběru oocytů (Kasinathan a kol. 2015). Přestože probíhá kontinuální vývoj nových kultivačních podmínek *in vitro*, podmínky kultivace stále nejsou totožné s fyziologickým prostředím a IVP embrya vykazují některé odlišnosti oproti embryím získaným *ex vivo* (Lonergan a Fair 2008, O'Doherty a kol. 2018). Proto téměř stejně dlouho, jako existuje produkce embryí *in vitro*, jsou zkoušeny způsoby, jak kultivaci *in vitro* obejít a nahradit ji fyziologicky přirozenějším procesem.

Jednu z alternativ představuje technika přenosu oocytů do preovulačního folikulu, kterou poprvé představil Fleming a kol. (1985), technika byla dále zdokonalována v equinní (Goudet a kol. 1997) a bovinní (Bergfelt a kol. 1998, Kassens a kol. 2015) reprodukci. Metoda intrafolikulárního transferu oocytů (intrafollicular oocyte transfer, IFOT) je založena na injekci dárcovských oocytů do preovulačního folikulu příjemkyň, které jsou následně inseminovány. V důsledku toho dochází k maturaci oocytů, ovulaci, oplození a časnému vývoji embryí v přirozeném prostředí ve folikulu, vejcovodu a děloze příjemce. Sedmidenní embrya jsou získána rutinním výplachem děložního rohu nebo jiným způsobem (endoskopický výplach vejcovodu, případně odběr na izolované děloze po porážce zvířete).

Technicky vychází IFOT z metody transvaginální sonografické punkce vaječnicků (ovum pick-up, OPU) (Pieterse a kol. 1988). Při OPU je tyčový plastový držák ultrazvukové sondy zaveden do pochvy a vaječník je manuálně přitlačen per rectum proti sondě. Mezi aktivní plochou sondy a vaječníkem se nachází pouze tenká poševní stěna a všechny struktury přítomné na vaječníku jsou vizualizovány na monitoru sonografu. V horní části držáku sondy je zabudován kovový pracovní tubus, ve kterém operátor pohybuje aspirační jehlou, napojenou na podtlakový aspirační systém. Hrot jehly pronikající do folikulu je viditelný na monitoru sonografu. Operátor podle situace na monitoru sonografu ovládá jednou rukou držák a jehlu, druhou rukou vaječník a nohou spínač podtlakové aspirační pumpy.

Aspirační pumpa generuje regulovaný podtlak, který aspiruje obsah punktovaných útvarů do sběrné nádobky. K odběru folikulární tekutiny může být použit zkrácený aspirační systém, kdy je přímo na hadičku od aspirační jehly napojena injekční stříkačka ovládaná pomocníkem.

Různé modifikace původních instrumentů pro OPU používané pro intrafolikulární injekci účinných látek do vaječníku (Gastal, Kot a Ginther 1995, Hanstedt a kol. 2011, Cech a kol. 2013) mají podobnou konstrukci. V pracovním tubusu držáku sondy je namísto aspirační jehly veden dlouhý nástroj (přibližně 50 cm), jehož kanálek nebo jehla se zcela vyplní určenou substancí (léčivem, roztokem). Na vyústění kanálku na vnějším konci nástroje je připojena injekční stříkačka nebo laboratorní pipeta, která tlakem pístu vpraví požadovaný objem roztoku (0,1 – 0,3 ml) do cílového útvaru. Podobné vybavení bylo používáno i pro IFOT.

První intrafolikulární transfer oocytů u skotu byl proveden před více než 20 lety (Bergfelt a kol. 1998). Autoři označili metodu jako „gamete recovery and follicular transfer“ (GRAFT). Přes slibné výsledky zůstala tato studie na dlouhou dobu osamocená. Metoda se opět uplatnila až o 17 let později, kdy byla nazvána „intrafollicular oocyte transfer“ (IFOT) a přenášeny byly *in vitro* maturované oocyty (Kassens a kol. 2015). Stejným týmem byl realizován IFOT nezralých oocytů (Hoelker a kol. 2017), takže bylo prokázáno, že i *in vitro* maturaci lze obejít přímým přenosem oocytů do folikulu. Dále byl proveden intrafolikulární přenos oocytů získaných od živých dárkyň pomocí transvaginální aspirace, a to jak čerstvých, tak vitrifikovaných (Sprícigo a kol. 2016).

Přestože IFOT nezlepšil vývojovou kompetenci vitrifikovaných oocytů, po přenosu čerstvých nezralých oocytů bylo dosaženo životaschopných blastocyst a následných březostí. Tato metoda je možností pro klinickou praxi a produkci embryí bez kultivace *in vitro* (Sprícigo a kol. 2016). Časový interval cca 12 hodin, který transferované oocyty stráví ve folikulu příjemkyně je dostatečný, aby byly schopny podstoupit fertilizaci a dokončit vývoj do stádia blastocysty (Dias a kol. 2018).

Kvantitativní výsledky IFOT však doposud nejsou příliš uspokojivé, protože počet a kvalita získaných objektů (embryí/oocytů) po výplachu dělohy 7 dní po provedení IFOT jsou velmi variabilní. Dostupná literatura uvádí zpětný zisk objektů (embrya všech kvalitativních tříd a neoplozené oocyty) 35,2 %, 21,3 % a 38,5 % (Kassens a kol. 2015, Sprícigo a kol. 2016, Hoelker a kol. 2017). Zisk embryí schopných přenosu byl 8,4 %, 5,5 % a 17,3 % (Kassens a kol. 2015, Sprícigo a kol. 2016, Hoelker a kol. 2017). Uvedená variabilita výsledků je důvodem pro další propracování metodiky IFOT.

## II) Cíl metodiky

Cílem metodiky intrafolikulárního transferu oocytů u skotu bylo vypracovat postup mechanického transferu oocytů do preovulačního folikulu se zaměřením na praktickou proveditelnost ve stájových podmínkách. Metodika využívá soubor nových originálních nástrojů vyvinutých speciálně pro tuto činnost.

## III) Vlastní popis metodiky

Metodika intrafolikulárního transferu oocytů (dále „metodika“) využívá trojdílný set umožňující **aspiraci** izolovaných oocytů, jejich krátkodobé **uchování** a **transport** a **injekci** média obsahujícího oocyty do preovulačního folikulu. Součástí zařízení je i speciálně tvarovaný pracovní tubus a modifikovaný držák sondy.

### Trojdílný set k intrafolikulárnímu transferu oocytů

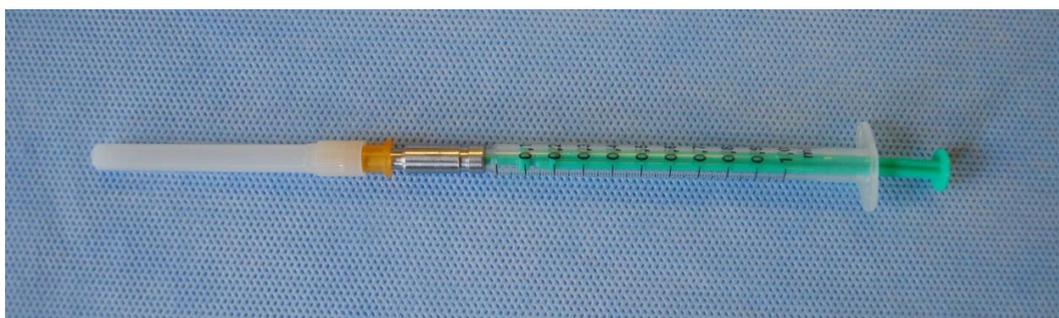
Set k intrafolikulárnímu transferu oocytů má tři podjednotky: aplikátor, aspirátor a injektor.

**Aplikátor** tvoří injekční stříkačka o objemu 1 ml spojená s injekční jehlou (25G, 0,55 x 40 mm, Braun, Německo). V prostoru mezi injekční stříkačkou a jehlou je vložen adaptér z nerezové oceli, který přesně obklopuje zkrácenou část inseminační pejety, která vytvoří prostor pro uchování oocytů (původní objem 0,25 ml) (obr. 1, 2). Aplikátor zajišťuje tři funkce: aspiraci a uchování oocytů, transport oocytů v termo-boxu do stáje ke zvířeti a také aplikaci oocytů do folikulu.



injekční jehla    zkrácená pejeta    adaptér    injekční stříkačka 1 ml

Obr. 1: Rozložený aplikátor

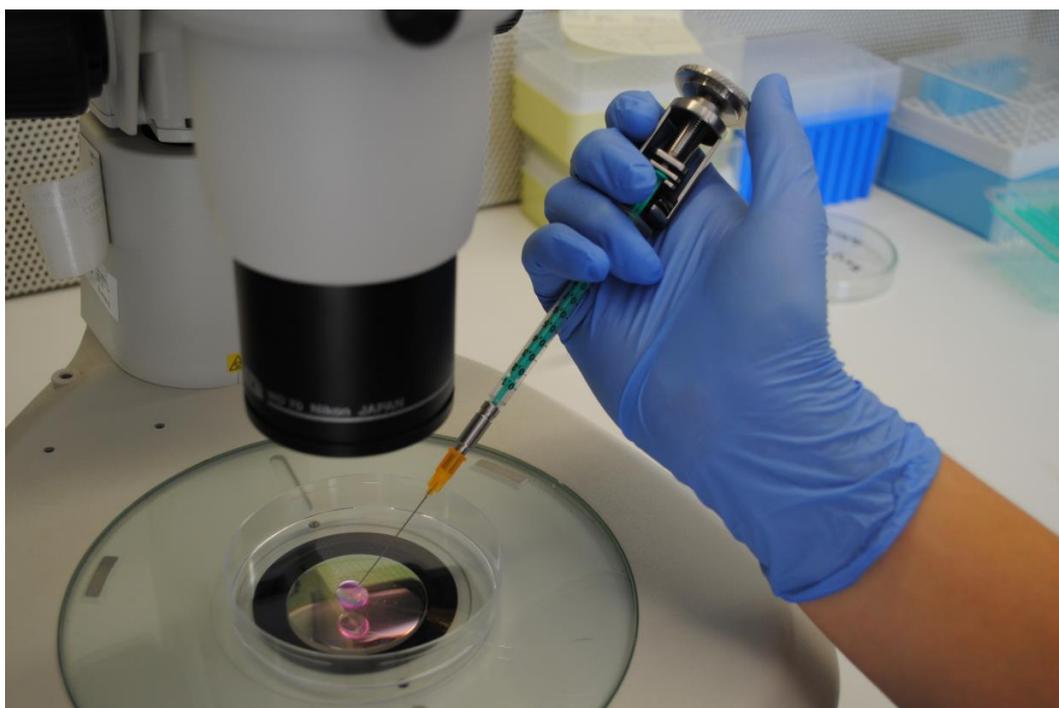


Obr. 2: Sestavený aplikátor

**Aspirátor** tvoří nerezový šroub s jemným závitem pro přesnou manipulaci s pístem injekční stříkačky (obr. 3). Umožňuje pečlivé natažení oocytů přes jehlu do zkrácené pejety umístěné v adaptéru (obr. 4).



Obr. 3: Aspirátor



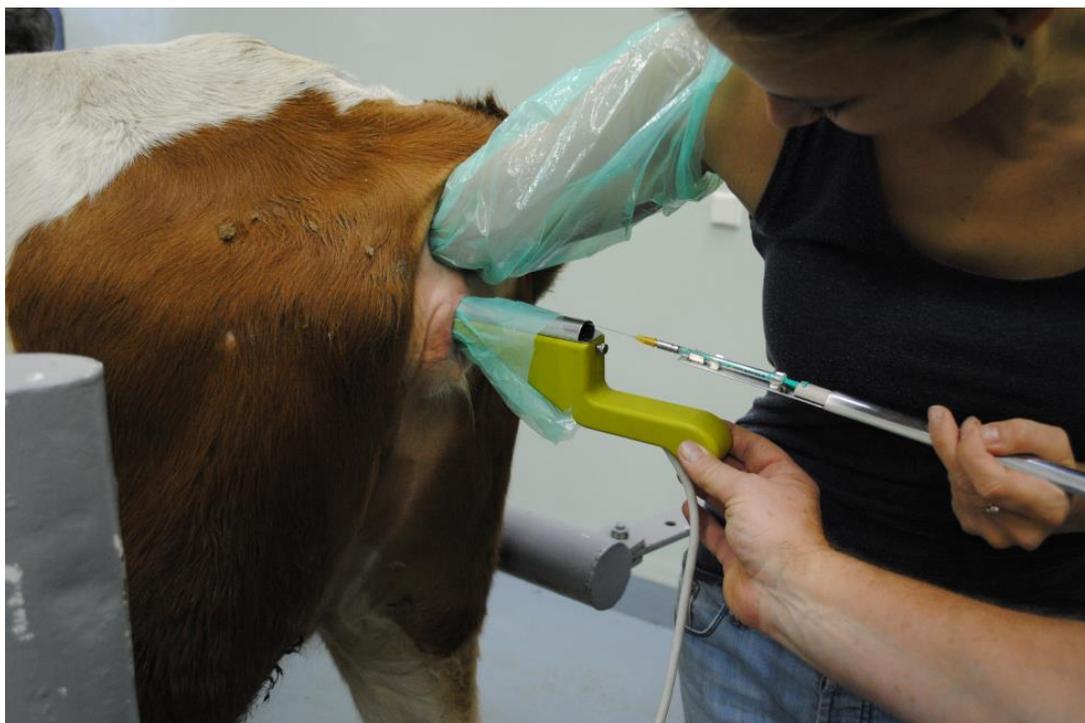
Obr. 4: Aspirace oocytů

**Injektor** je 50 cm dlouhý instrument vybavený fixačním mechanismem pro vložení a upevnění aplikátoru v jeho přední části. Táhlo prochází celým tělem injektoru, přičemž vodící kolík táhla je umístěn v koncové části injektoru (obr. 6). Injekční stříkačka je pevně fixována k injektoru, zatímco píst stříkačky je fixován k přední části táhla. Manuální posun vodícího kolíku je táhlem přenášen na píst stříkačky.



Obr. 6: Injektor

Plastový držák sondy je zaveden do pochvy příjemkyně, sonda je nasměrována dorzomediálně do blízkosti *fornix vaginae*, kompletní injektor je vložen do vodícího tubusu na držáku sondy (obr. 7). Po sonografické vizualizaci folikulu (Kaixin KX5200, Xuzhou, China s mikrokonvexní 7,5 MHz sondou) operatér posunuje injektorem v pracovním tubusu připevněném k horní části držáku sondy, až zavede injekční jehlu do folikulu, a pak pohybem vodícího kolíku vně zvířete provede injekci obsahu aplikátoru (obr. 8).



Obr. 7: Zavedení injektoru do pracovního tubusu



Obr. 8: Provedení intrafolikulárního transferu oocytů

## **Metodický postup intrafolikulárního transferu oocytů**

Samotná injekce oocytů do folikulu vychází z obecných principů transvaginální ultrasonografické punkce vaječníků. Během procedury jsou zvířata fixována s omezením pohybu. Příjemkyně jsou sedovány i.v. aplikací přípravku obsahujícího detomidine hydrochloride (1,5 mg *pro toto*; Domidin 10 mg/ml Dechra, Amsterdam, Holandsko) a je i nich provedena epidurální anestezie (4 ml *pro toto*; lidocaine 2%, Fatro, Ozzano, Itálie). Ocas je zafixován, rektum vyprázdněno a perianální oblast očištěna a vydesinfikována.

Na aktivní plochu ultrazvukové sondy je aplikováno malé množství sonografického gelu a sonda je kryta latexovou ochranou. Držák sondy je společně s upevněným pracovním tubusem kryt rektální rukavicí pro zachování vyšší hygieny procesu injekce. Držák je zasunut do pochvy a umístěn dorzo-kraniálně. Vaječník nesoucí folikul je jemnou rektální manipulací umístěn před aktivní plochu sondy. Rotací vaječníku je zajištěno, že vlastní injekce je proveden přes stroma vaječníku před dosažením dutiny folikulu pro omezení úniku folikulární tekutiny po injekci. Injektor s upevněným aplikátorem je vložen do pracovního tubusu fixovaného k držáku sondy. Přes poševní stěnu a peritoneum je proveden vpich jehlou opatrně, ale energicky do dutiny folikulu. Ve chvíli, kdy jehla dosáhne centra folikulu, operátor pomalým pohybem vodícího kolíku pohne táhlem dopředu. V momentě vypuzení obsahu aplikátoru do folikulu, je pozorován echogenní vír obsahu folikulu. Jehla je vytažena bezprostředně po provedení IFOT a stabilita folikulu je pozorována na obrazovce ultrazvuku.

## **IV) Srovnání novosti postupů**

Metodika využívá soubor originálních nástrojů vyvinutých speciálně pro tuto činnost. Podobné vybavení nebylo doposud popsáno v tuzemském ani mezinárodním měřítku.

## **V) Popis uplatnění certifikované metodiky**

Metodika intrafolikulárního transferu oocytů je určena především pracovištím zabývajícím se technikami asistované reprodukce u velkých zvířat. Metodika bude využita ve výzkumu pro sledování vlastností embryí derivovaných postupem IFOT ve srovnání s embryi produkovanými *in vivo* nebo *in vitro* jakož i při studiu maturace oocytů. Metodika je určena primárně pro skot, ale může být prováděna i u ostatních druhů velkých zvířat (koně, exotická zvířata). Využití v praxi je doposud limitováno nízkou efektivitou metody IFOT a bude možné po detailním propracování přípravy zvířat a synchronizace ovulace.

## **VI) Ekonomické aspekty**

Metodika intrafolikulární injekce oocytů není primárně určena ke komerčnímu využití a nebude generovat zásadní ekonomický přínos pro uživatele. Hlavním přínosem je samotná možnost zákroku, která v našich podmínkách před vypracováním metodiky neexistovala.

O ekonomickém přínosu lze uvažovat v případě uplatnění propracované metodiky v praxi pro komerční produkci IVP embryí, kdy embrya z IFOT vykážou lepší kryotoleranci a vyšší přežívání embryí po přenosu včetně dosažení vyšší životaschopnosti narozených telat.

## **VII) Seznam použité literatury**

Bergfelt D. R., Brogliatti G. M., Adams G. P. (1998): Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. *Theriogenology* 50, 15-25.

Cech S, Mala J, Indrova E, Lopatarova M, Dolezel R, Dluhosova H, Zilka L (2013): The introduction of a double-channel system for the intrafollicular treatment of cattle. *Veterinarni Medicina*, 58, 10-15.

Dias, L.R.O., Silva, V.A.O., Faria, O.A.C., Caixeta, F.M.C., Sprícigo, J.F.W., Dode, M.A.N. (2018): Embryo production from bovine oocyte matured in vivo using intrafollicular transfer of immature oocytes (TIFOI). *Anim. Reprod.* 15:428.

Findlay, J.K., Holland, M.K., Wong, B.B.M. (2019): Reproductive science and the future of the planet. *Reproduction* 158: 91-96.

Fleming A. D., Saldago R., Kuehl T. J. (1985): Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle in vivo. *Theriogenology* 23: 193.

Gastal E. L., Kot K., Ginther O. J. (1995): Ultrasound-guided intrafollicular treatment in mares. *Theriogenology*, 44, 1027-1037.

Hanstedt A., Stinshoff H., Piechotta M., Bollwein H., Wrenzycki C. (2011): Ultrasound-mediated intrafollicular injection and aspiration of bovine follicles. *Reproduction in Domestic Animals* 48, 18.

Hoelker, M., Kassens, A., Salilew-Wondim, D., Sieme, H., Wrenzycki, Ch., Tesfaye, D., Neuhooff, Ch., Schellander, K., Held Hoelker, E. (2017): Birth of healthy calves after intrafollicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. *Theriogenology* 97: 41–49.

Kasinathan, P., Wei, H., Xiang, T., Molina, J.A., Metzger, J., Broek, D., Kasinathan, S., Faber, D.C., Allan, M.F. (2015): Acceleration of genetic gain in cattle by reduction of generation interval. *Sci Rep* 5:5-8.

Kassens, A., Held, E., Salilew-Wondim, D., Sieme, H., Wrenzycki, Ch., Tesfaye, D., Schellander, K., Hoelker, M. (2015): Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. *Biol Reprod* 92: 1–2.

Kot K., Gibbons J. R., Ginther O. J. (1995): A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. *Theriogenology* 44, 41-50.

Lonergan, P., Fair, T. (2008): In vitro-produced bovine embryos-Dealing with the warts. *Theriogenology* 69: 17-22.

O'Doherty, A.M., McGettigan, P., Irwin, R.E., Magee, D.A., Gagne, D., Fournier, E., Al-Naib, A., Sirard, M-A., Walsh, C.P., Robert, C., Fair, T. (2018): Intragenic sequences in the trophoctoderm harbour the greatest proportion of methylation errors in day 17 bovine conceptuses generated using assisted reproductive technologies. *BMC Genomics* 19: 1-15.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TAM, Taverne MAM, 1988: Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30 751-762.

Sprícigo, J.F.W., Sena Netto, S.B., Muterlle, C.V., Rodrigues, S., Leme, L.O., Guimaraes, A.L., Caixeta, F.M., Franco, M.M., Pivato, I., Dode, M.A. (2016): Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology* 86 (8):2054–62.

## VIII) Seznam publikací předcházejících metodice

Andrlikova M, Bina V, Kos V, Lopatarova M, Markova B, Stenclova L, Cech S (2020): Intrafollicular transfer in cattle – technical report. *Acta Vet. Brno*, 89, 11 – 17.

## IX) Seznam zkratek

GRAFT	gamete recovery and follicular transfer, odběr gamet a folikulární transfer
IFT	intrafollicular treatment, intrafolikulární injekce
IFOT	intrafollicular oocyte transfer, intrafolikulární transfer oocytů
IVP	<i>in vitro</i> embryo production, produkce embryí <i>in vitro</i>
OPU	ovum pick-up, transvaginální sonografická aspirace oocytů

Vydal: Veterinární univerzita Brno  
Palackého tř. 1, 612 42 Brno

Název: **Intrafolikulární transfer oocytů u skotu**

Autoři: doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D. (40%)  
MVDr. Michaela Andrlíková (30%)  
MVDr. Vojtěch Kos (10%)  
MVDr. Beata Marková (10%)  
MVDr. Lucie Štenclová (10%)

Oponenti: Ing. Jan Vodička  
Ministerstvo zemědělství  
odbor zemědělských komodit  
Těšnov 65/17, 110 00 Praha

prof. Ing. Ladislav Máchal, DrSc.  
Mendelova univerzita v Brně  
Zemědělská 1665/1, 613 00 Brno

**ISBN**

### **Dedikace metodiky**

Metodika byla vyvinuta za podpory grantů IGA č. 119/2017/FVL a MZE-RO0520

Vydáno bez jazykové úpravy.



Veterinární univerzita Brno  
Palackého tř. 1  
612 42 Brno  
[www.vfu.cz](http://www.vfu.cz)

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i  
Hudcova 296/70  
621 00 Brno  
[www.vri.cz](http://www.vri.cz)



Ministerstvo zemědělství  
Těšnov 65/17  
110 00 Praha 1

v y d á v á

## OSVĚDČENÍ

č. MZE-67432/2021-18141

o uznání metodiky v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací a programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací, schválené usnesením vlády dne 8. února 2017, číslo 107 a její samostatné přílohy č. 4 schválené usnesením vlády dne 29. listopadu 2017 č. 837.

Název metodiky: **Intrafolikulární transfer oocytů skotu**

Autoři: **doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D., MVDr. Michaela Andrlíková,  
MVDr. Vojtěch Kos, MVDr. Beáta Marková, MVDr. Lucie Štenclová**

Název organizací: **Veterinární univerzita Brno  
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.**

Místo vydání: **Brno**

Rok vydání: **2021**

ISBN **978-80-7305-788-6**

Metodika byla vypracována v rámci podpory grantů č. **FVL/Illek/ITA2019** a **MZE-RO0520**.

V Praze dne 30. 11. 2021

.....  
Razítko a podpis zástupce odborného útvaru státní správy

Jméno zástupce odborného útvaru státní správy: Ing. Miroslava Czetmayer Ehrlichová  
Funkce zástupce odborného útvaru státní správy: ředitelka Odboru zemědělských komodit MZe

Souhlas ředitele Odboru vědy, výzkumu a vzdělávání MZe:

V Praze dne 10. 12. 2021 .....

.....  
Mgr. Jan Radoš

