

NAUDAN ALKIONSIIIRTO

Laura Heikkilä

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Helsingin yliopisto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto
Kotieläinten lisääntymistiede
2015



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Laura Heikkilä			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Naudan alkionsiirto			
Oppiaine - Läroämne - Subject Kotieläinten lisääntymistiede			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum - Month and year 05/2015	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 55
Tiivistelmä - Referat – Abstract			
<p>Tämä lisensiaatin tutkielma sisältää kirjallisuuskatsauksen ja tutkimusosan. Kirjallisuuskatsauksessa selvitetään alkionsiirtoprosessin eri vaiheita, alkioiden luokittelua, tiinehtymiseen vaikuttavia tekijöitä ja alkionsiirtoon liittyvää tautiriskiä. Alkionsiirron avulla geneettisesti arvokkaista naarasyskilöistä saadaan tuotettua normaalia lisääntymispotentiaalia enemmän jälkeläisiä. Tautien leviämisen riski alkionsiirron yhteydessä on erittäin pieni. Alkionsiirto on nopea ja turvallinen tapa edistää karjan jalostusta. Alkionsiirtotoiminta yleistyi Suomessa 2000-luvulla. Se on vakiinnuttanut paikkansa karjan jalostuksessa niin Suomessa kuin ympäri maailmaa.</p> <p>Alkionsiirrossa käytetään joko tuoreita tai pakastettuja alkioita. Suomessa suurin osa alkioista siirretään pakastettuina. Alkiot voidaan siirtää joko luonnollisen tai synkronoidun kiiman jälkeen. Käytettäessä pakastealkioita siirto suoritetaan yleensä luonnollisen kiiman jälkeen kun taas tuorealkionsiirroissa vastaanottajat on useimmiten synkronoitava. Kiimojen synkronoinnin tavoitteena on ajoittaa alkion luovuttajien ja vastaanottajien kiimat haluttuun ajankohtaan siten, että ne ovat kiimakierroltaan oikeassa vaiheessa alkionsiirron hetkellä. Kiiman synkronoimiseksi on olemassa erilaisia menetelmiä, jotka perustuvat eksogeenisten hormonivalmisteiden käyttöön.</p> <p>Tutkimusosassa selvitettiin epiduraalipuudutuksen, alkion laatuluokan, vastaanottajan rodun, kiiman laadun, kiimakierron vaiheen ja vastaanottajan poikimakerran vaikutusta tiinehtyvyyteen. Aineisto koostui 39 235 alkionsiirtotahtuman tiedoista. Tilastollinen analyysi suoritettiin Khiin neliötestillä. Alkionsiirron yhteydessä voidaan käyttää epiduraalipuudutusta vähentämään suolen supistelua. Epiduraalipuudutuksen käyttäminen alkionsiirron yhteydessä on kuitenkin vähentynyt merkittävästi 1990-luvulta nykypäivään. Nykyisin epiduraalipuudutusta käytetään vain harvoin, kun sitä vielä 1990-luvun puolivälissä käytettiin lähes kaikissa siirroissa. Tässä tutkimuksessa epiduraalipuudutuksella havaittiin tiinehtyvyyttä parantava vaikutus. Se ei kuitenkaan parantanut siirtäjän arviota alkionsiirron onnistumisesta.</p> <p>Hieman yli puolet kaikista alkionsiirroista johti tiinehtymiseen. Alkion laadulla ja kehitysvaiheella havaittiin merkitsevä vaikutus tiinehtyvyyteen sekä tuore- että pakastealkioilla. Mitä parempilaatuinen alkio oli, sitä parempi oli tiinehtyvyys. Myös se, oliko alkio tuore vai pakaste, vaikutti merkitsevästi tiinehtyvyyteen. Tuorealkioilla saavutettiin parempi tiinehtyvyys. Alkionsiirron onnistumisen kannalta on tärkeää, että vastaanottajan kiimakierron vaihe vastaa alkion ikää. Tutkimuksessa havaittiin, että mitä paremmin vastaanottajan kiimakierron vaihe vastasi alkion ikää, sitä parempi oli tiinehtyvyys. Hiehot tiinehtyivät lemmiä paremmin. Tämä tulos puoltaa hiehojen suosimista alkion vastaanottajiksi.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Nauta, alkionsiirto, alkio, tiinehtyminen, epiduraalipuudutus			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden talon (EE-talo) Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s) ELT, dos. Juhani Taponen, ELL Marja Mikkola			

Sisällys

1 JOHDANTO	1
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	2
2.1 Alkionsiirron merkitys	2
2.2 Kiimojen synkronointi	3
2.2.1 Prostaglandiini ja sen agonistiset analogit.....	3
2.2.2 Ovsynch-ohjelma.....	4
2.2.3 Ovsynch-ohjelma yhdistettynä progestageenikuuriin	5
2.2.4 Presynch-ohjelma.....	6
2.2.5 Resynch-ohjelma.....	6
2.3 Alkioiden käsittely ja luokittelu.....	7
2.3.1 Tuorealkiot	7
2.3.2 Pakastealkiot	8
2.3.2.1 Pakastealkioiden sulatus.....	8
2.3.3 Laatuluokitus.....	9
2.3.4 Kehitysvaihe	10
2.4.2 Ei-kirurginen siirto.....	11
2.5 Tiinehtyminen	13
2.5.2 Tiinehtymiseen vaikuttavat sisäiset tekijät.....	13
2.5.2.1 Alkion laatu ja kehitysvaihe	13
2.5.2.2 Plasman progesteroni	14
2.5.2.3 Eksogeeninen progesteroni	15
2.5.2.4 hCG.....	16
2.5.2.5 GnRH	16
2.5.2.6 Fluniksiini-meglumiini	17
2.5.3 Tiinehtymiseen vaikuttavat ulkoiset tekijät	18
2.5.3.1 Lämpöstressi	18
2.5.3.2 Ravitsemus ja kuntoluokka	18
2.5.3.3 Maitotuotos	19
2.5.3.3 Poikimakerran vaikutus.....	19
2.5.4 Vastaanottajan valinta	20
2.6 Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä.....	21
2.7 Tautiriski ja sen hallinta alkionsiirron yhteydessä.....	22
2.7.1 Sperman luovuttaja.....	23

2.7.2 Munasolun tai alkion luovuttaja	23
2.7.3 Eläinperäiset väliaineet ja välineet	25
2.7.4 Vastaanottaja	25
3 AINEISTO JA MENETELMÄT	26
3.1 Aineiston kuvaus	26
3.1.1 Aineistossa esiintyneet rodut.....	26
3.1.2 Poikimakerta	26
3.1.3 Kiiman laatu	28
3.1.4 Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna.....	29
3.1.5 Alkio tuore vai pakaste.....	30
3.1.6 Alkion laatuluokka.....	30
3.1.7 Alkion kehitysaste	30
3.1.8 Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä.....	31
3.1.9 Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta.....	33
3.2 Tilastolliset menetelmät	35
4 TULOKSET	36
4.1 Tiinehtyvyys alkionsiirron jälkeen	36
4.2 Epiduraalipuudutuksen vaikutus tiinehtyvyyteen	36
4.3 Alkion laatuluokan vaikutus tiinehtyvyyteen.....	36
4.4 Alkion kehitysasteen vaikutus tiinehtyvyyteen.....	37
4.5 Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen.....	39
4.6 Vastaanottajan rodun vaikutus tiinehtyvyyteen.....	40
4.7 Tiinehtyvyys kiiman ollessa luonnollinen tai synkronoitu.....	41
4.8 Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen	42
4.9 Poikimakerran vaikutus tiinehtyvyyteen.....	43
5 POHDINTA	44
6 LÄHTEET	46

1 JOHDANTO

Superovulaation, alkiohuuhtelun, alkionsiirron avulla geneettisesti arvokkaista naarasyksilöistä saadaan tuotettua normaalia lisääntymispotentiaalia enemmän jälkeläisiä. Vastaanottajina voidaan käyttää jalostuksellisesti huonompia yksilöitä. Alkionsiirto on nopea tapa edistää karjan jalostusta. Se on vakiinnuttanut paikkansa karjan jalostuksessa niin Suomessa kuin maailmalla. Alkionsiirto on myös erittäin turvallinen tapa jalostaa karjaa ja siirtää eläinainesta maasta toiseen, sillä eläintautien leviämisen riski on alkionsiirron yhteydessä pieni (Givens & Marley 2008).

Alkionsiirrossa käytetään joko tuoreita tai pakastettuja alkioita. Tuorealkioita siirrettäessä alkion luovuttajan ja vastaanottajan kiimat synkronoidaan samaan vaiheeseen. Suomessa kuitenkin suurin osa alkionsiirroista tehdään nykyisin pakastealkioilla. Pakastealkioita käytettäessä siirto tehdään yleensä luonnolliseen kiimaan.

Tiinehtyminen alkionsiirron jälkeen on monen tekijän summa. Tiinehtymiseen voivat vaikuttaa monet alkioista, siirtoprosessista ja vastaanottajasta riippuvat tekijät. Alkion laatu, elinkelpoisuus ja oikea kehitysaste ovat tärkeitä alkionsiirron onnistumisen kannalta. Laadun ja kehitysvaiheen arviointi onkin yksi alkionsiirron keskeisimpiä vaiheita (Bó ja Mapletoft 2006).

Tämä liseniaatintutkielma sisältää kirjallisuuskatsauksen ja tutkimusosan. Kirjallisuuskatsaus on rajattu käsittelemään alkionsiirtoprosessin eri vaiheita, alkioiden luokittelua, tiinehtymiseen vaikuttavia tekijöitä ja alkionsiirtoon liittyvää tautiriskiä. Tutkimusosassa selvitetään epiduraalipuudutuksen ja muiden tekijöiden vaikutusta tiinehtymiseen.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Alkionsiirron merkitys

Ensimmäisen onnistuneen alkionsiirron naudalla teki E.L. Willet vuonna 1950 käyttäen kirurgista menetelmää. Alkionsiirtotoiminnan kaupallistuminen tapahtui Pohjois-Amerikassa 1970-luvun alussa. Alkionsiirrot suoritettiin aluksi yksinomaan kirurgisella menetelmällä. Se soveltui kuitenkin huonosti praktiikkaolosuhteisiin hygienia-vaatimustensa takia. Ei-kirurginen siirtotapa yleistyi nopeasti, ja jo 1970-luvun lopulla suurin osa alkionsiirroista suoritettiin ei-kirurgisesti (Hasler 2003, Betteridge 2003). Kylmäsäilytyksen yleistyminen 1980-luvun alussa oli merkittävä kehitysaskel alkionsiirto-toiminnan historiassa. Alkioiden pakastamisen myötä alkionsiirtojen tehokkuus parani, kun alkioita voitiin säilöä ja kuljettaa eri puolille maailmaa. Myös erilaiset teknologiset ratkaisut, kuten *in-vitro*-alkioiden tuottaminen, alkioden halkaisu ja sukupuolilajittelu kehittyivät nopeasti 1980-luvulla ja muodostuivat nopeasti osaksi kaupallista alkionsiirtotoimintaa (Hasler 2006). Alkionsiirto-toiminta onkin tänä päivänä merkittävää kansainvälistä liiketoimintaa.

Vuonna 2012 rekisteröitiin maailmanlaajuisesti (IETS) 890 875 tuore- ja pakastealkioilla tehtyä alkionsiirtoa, joista 505 876 oli IVD- (*in-vivo derived*) ja 384 999 oli IVF-alkioita (*in-vitro fertilized*). Euroopassa tehtiin alkionsiirtoja samana vuonna 114 099. IVF-alkiosta suurin osa siirrettiin tuoreina, kun taas IVD-alkioista yli puolet siirrettiin pakastettuna (IETS 2013). Alkionsiirtotoiminnan tulevaisuus riippuu kuitenkin merkittävästi talouden suhdanteista, jotka voivat vaikuttaa negatiivisesti maidontuotannon ja karjatalouden kannattavuuteen ja sitä kautta myös alkionsiirtotoimintaan. Myös odottamattomilla taudinpurkauksilla voi olla negatiivinen vaikutus kansainväliseen kaupankäyntiin (Hasler 2014).

Alkionsiirron avulla voidaan edistää karjan jalostusta. Alkionsiirto mahdollistaa geneettisesti hyvien hiehojen ja lehmien tehokkaan jalostuskäytön, kun yhdeltä luovuttajalta on mahdollista saada useita jälkeläisiä (Smith 2004). Alkionsiirto on turvallisin tapa ostaa uutta eläinainesta karjaan, sillä riski tautien leviämälle alkioden

mukana on pieni. Se on myös kustannustehokkain tapa karjan jalostamiseksi (Duran 2000, Bó ja Mapletoft 2013)

2.2 Kiimojen synkronointi

Alkionsiirtojen yhteydessä kiimojen synkronoinnin tavoitteena on ajoittaa alkion luovuttajien ja vastaanottajien kiimat haluttuun ajankohtaan, siten että ne ovat kiimakierroltaan juuri oikeassa vaiheessa alkionsiirron hetkellä. Tuorealkioita käytettäessä vastaanottajien kiimat synkronoidaan, kun taas pakastealkiot siirretään useimmiten luonnolliseen kiimaan. Tuorealkiot säilyvät elinkelpoisina noin 12 tuntia huuhtelusta, joten vastaanottajan tulee olla oikeassa kiimakierron vaiheessa huuhtelupäivänä, jotta siirrettävillä alkioilla olisi mahdollisuus kehittyä (Mapletoft 2006). Alkio on siirrettäessä seitsemän päivän ikäinen, joten se on siirrettävä eläimeen, joka on ollut viikko sitten kiimassa. Käytännössä siis tuorealkioita käytettäessä vastaanottajan tulee olla kiimassa sinä päivänä, jolloin luovuttaja siemennetään. Riippumatta siitä, käytetäänkö synkronointiohjelmia vai ei, oikea ajoitus on alkionsiirron onnistumisen kannalta ehdottoman tärkeää (Smith 2004, Mapletoft 2006).

Kiimojen synkronoiminen edesauttaa alkionsiirtojen onnistumista ja siten parantaa tiinehtyvyyttä (Baruselli ym. 2010, 2011). Kiiman indusointiin ja ajoittamiseen on olemassa erilaisia menetelmiä, jotka on alkujaan kehitetty lähinnä keinosiemennyspuolelle, mutta jotka yhtälailla soveltuvat käytettäväksi alkionsiirtojen yhteydessä. Synkronointimenetelmät perustuvat lähinnä eksogeenisten hormonivalmisteiden käyttöön (Mapletoft 2006).

2.2.1 Prostaglandiini ja sen agonistiset analogit

Prostaglandiini $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ja sen agonistiset analogit on käytettyin hoitokeino kiiman synkronoimiseksi (Odde 1990, Bó ym. 2002). $PGF_{2\alpha}$ aikaansaa keltarauhasen surkastumisen eli luteolysin. $PGF_{2\alpha}$:n avulla kiimaa voidaan kontrolloida usealla eri

tavalla. Sitä voidaan käyttää yksittäisenä injektiona tai monen injektion sarjana eripituisin hoitovälein (Allcock ja Peters 2004).

PGF_{2α}:n luteolyttinen teho riippuu keltarauhasen iästä (Bó ym. 2002, Allcock ja Peters 2004). Se tehoaa huonosti päivinä 5 ja 6 (Sequin 1997, Wiltbank 1997) eikä tehoa lainkaan alle viiden päivän ikäisiin keltarauhasiin (Coleman ym. 1987). PGF_{2α} tulisi siis antaa kiimakierron päivinä 7–17 (Sequin 1997, Wiltbank 1997). PGF_{2α} aiheuttaa luteolyysin jolloin veren progesteroni vähenee nopeasti (Allcock ja Peters 2004). Eläin tulee kiimaan useimmiten 3–4 päivää hoidon jälkeen. Tosin kiimaantulon ajankohta PGF_{2α}-injektion jälkeen vaihtelee melko paljon (Bó ym. 2002, Mapletoft 2006). Vaihtelu johtuu siitä, missä kehitysvaiheessa munasarjojen follikkelialto hoitohetkellä on (Odde 1990, Bó ym. 2002). Kiiman synkronoimiseksi voidaan käyttää kahta PGF_{2α}-injektiota. Aiemmin on suositeltu, että ne annetaan 10 tai 11 päivän välein (Bó ym. 2002), mutta Mapletoftin (2006) mukaan tiinehtyvyys on parempi 14 vuorokauden hoitovälillä. Kahden injektion hoitosarjan teho perustuu siihen, että jälkimmäisen injektion aikana kaikilla lehmillä tulisi teoriassa olla PGF_{2α}:lle herkkä keltarauhanen (Odde 1990, Bó ym. 2002). 11 päivän hoitovälillä osalla lehmistä saattaa olla vielä prostaglandiinille reagoimaton keltarauhanen.

2.2.2 Ovsynch-ohjelma

Ovsynch-ohjelmalla kiima voidaan ajoittaa tarkasti ja näin ollen voidaan suorittaa ajoitettu siemennys ilman kiiman visuaalista havainnointia (Pursley ym. 1997). Ovsynch-ohjelmaa voidaan käyttää myös alkionsiirron yhteydessä (Bó ym. 2002). Ovsynch-ohjelma perustuu GnRH- ja PGF_{2α}-hormonivalmisteiden käyttöön (Allcock ja Peters 2004). Ohjelma on nelivaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa vastaanottaja hoidetaan GnRH-injektiolla, joka annetaan satunnaisessa vaiheessa naudan kiimakiertoa. Naudan vaste GnRH-hoitoon riippuu siitä, onko munasarjoissa dominoiva follikkeli vai ei. Jos munasarjoissa on dominoiva follikkeli, lehmä ovuloi GnRH:n vaikutuksesta, muodostuu keltarauhanen, ja uusi follikkelialto lähtee kehittymään. Jos munasarjoissa on vain epäkypsiä follikkeleita, vaikuttaa GnRH follikkelien kasvua edistävästi, mutta tällöin ei siis seuraa ovulaatiota. Seitsemän päivää GnRH hoidon

jälkeen annetaan PGF_{2α}-injektio, joka aiheuttaa luteolyysin, jonka jälkeen munasarjoissa alkaa follikkelivaihe. Kahden vuorokauden kuluttua PGF_{2α}-injektiosta lehmä hoidetaan GnRH:lla, jonka vaikutuksesta eläin ovuloi 24–32 tunnin kuluttua. Jos lehmä keinosiemennetään, siemennys ajoitetaan 16 tunnin päähän GnRH-injektiosta (Pursley ym. 1997). Alkionsiirto suoritetaan viikon kuluttua GnRH-hoidosta, jolloin vastaanottaja on kiimakierron päivässä 7. Ei-sykloivilla lehmillä GnRH hoidolla ei saada lainkaan vastetta (Senger 2003).

Ovsynch-ohjelma toimii huomattavasti paremmin laktoivilla lehmillä kuin hiehoilla (Pursley ym. 1995, Bó ym. 2002, Allcock ja Peters 2004, Mapletoft 2006). Syytä tähän ei tiedetä, mutta laktaatiolla, ruokinnallisilla tekijöillä ja iällä on arveltu olevan vaikutusta (Pursley ym. 1995). Ensimmäisen GnRH-injektion jälkeen lehmistä ovuloi 85 %, mutta hiehoista vain 54 % (Mapletoft 2006). Bón ym. (2002) mukaan GnRH ei hiehoilla aina aiheuta ovulaatiota tai luteinisaatiota. Jos ensimmäinen GnRH-hoito ei synkronoi uutta follikkeliaaltoja kasvuun, toinen GnRH-injektio saattaa olla teholtaan huono eikä johda ovulaatioon. On myös raportoitu, että jotkin hiehot saattavat näyttää kiimaoireita ennen toista GnRH-hoitoa (Bó ym. 2002).

Bón ym. (2002) mukaan laktoivilla lehmillä tiinehtyvyys on parempi käytettäessä Ovsynch-ohjelmaa kuin synkronoitaessa pelkästään PGF_{2α}:lla. Ovsynch-ohjelman etuna on, että siirto voidaan suorittaa ajoitetusti, eikä tulos siten ole riippuvainen kiimantarkkailusta toisin kuin PGF_{2α}-hoidon yhteydessä (Pursley ym. 1995, Bó ym. 2002).

2.2.3 Ovsynch-ohjelma yhdistettynä progestageenikuuriin

Ovsynch-ohjelmasta on käytössä muunneltu versio, jossa hoito-ohjelmaan sisällytetään progesteronikuuri. Modifioidussa Ovsynch-ohjelmassa ensimmäisen GnRH-injektion jälkeen (päivä 0) eläimelle asetetaan progesteronia vapauttava emätinkierukka seitsemän päivän ajaksi, jonka jälkeen ohjelman jatkuu Ovsynch-ohjelman mukaisesti, eli päivänä 7 annetaan PGF_{2α}-injektio, päivänä 9 toinen GnRH-injektio. Vastaanottajan kiimaa ei tarkkailla, vaan alkio siirretään ajoitetusti päivänä 16 (Bó ym. 2002).

Markkinoilla on useita progestageeneja (progesteroni ja progesteronin kaltainen aine) sisältäviä valmisteita. Eksogeenista progesteronia voidaan antaa eläimelle rehun joukossa, nahan alle asennettavana implanttina, lihaksen sisäisenä injektiona tai emätinkierukkana. Farmakokineettisistä ja lainsäädännöllisistä syistä johtuen lypsylehmille voidaan kuitenkin käyttää vain intravaginaalisia hormonikierukoita. Progesteronia vapauttava kierukka matkii eläimen omaa keltarauhasta. Sen erittämä progesteroni inhiboi kiimaa ja ovulaatiota (Mapletoft 2006). Bó ym. (2002) havaitsivat lehmien tiinehtyvyyden alkionsiirron yhteydessä olevan hieman parempaa lisättäessä Ovsynch-ohjelmaan progesteronikuuri, kun taas Mapletoftin (2006) mukaan tiinehtymistuloksissa ei ollut eroa Ovsynch-ohjelman, modifioidun Ovsynch-ohjelman ja luonnollisen kiiman jälkeen tehtyjen siirtojen välillä. Hiehoilla tosin on keinosiemennysten yhteydessä saatu merkittävästi parempi tuloksia lisättäessä Ovsynch-ohjelmaan progestageenikuuri (Bó ym. 2002).

2.2.4 Presynch-ohjelma

Presynch-ohjelman avulla pyritään ajoittamaan Ovsynch-ohjelman aloitus sopivaan kiimasyklin vaiheeseen. Presynch-ohjelma aloitetaan 26 vuorokautta ennen Ovsynch-ohjelmaa. Se aloitetaan antamalla PGF_{2α}-injektio, joka toistetaan 14 vuorokauden kuluttua (Senger 2003).

2.2.5 Resynch-ohjelma

Resynch-ohjelman (uudelleen synkronointi) tavoitteena on saada keinosiemennyksen jälkeen tyhjäksi jääneet lehmät mahdollisimman nopeasti uudelleen kiimaan (Fricke ym. 2003). Myös alkionsiirtojen yhteydessä käytetään tyhjäksi jääneiden vastaanottajien uudelleen synkronoimista (Mapletoft ym. 2003). Vastaanottajalle laitetaan progestageeni-laite joko siirron yhteydessä tai 12–13 päivää kiiman jälkeen. Kun kierukka sitten poistetaan päivänä 21, 50–60 % tyhjistä lehmistä tulee kiimaan päivinä 22–25. Tyhjäksi todetut lehmät voidaan käyttää uudestaan vastaanottajina (Mapletoft 2006).

2.3 Alkioiden käsittely ja luokittelu

Laadukas, elinkelpoinen ja oikeassa kehitystasossa oleva alkiio on edellytys onnistuneelle alkionsiirrolle. Laadun ja kehitysvaiheen arviointi onkin alkionsiirron tärkeimpiä vaiheita (Bó ja Mapletoft 2013). Alkiot huuhdellaan luovuttajasta 6–8 päivää siemennyksen jälkeen. Yhdestä superovuloidusta lehmästä saadaan keskimäärin 6,4 siirtokelpoista alkiota (Hasler ym. 1983). Huuhtelun jälkeen alkioiden laatua ja kehitystasoa arvioidaan tutkimalla morfologiaa mikroskooppilla. Mikroskoopissa käytetään 50–100-kertaista suurennosta (Mapletoft 1986, 2006). Arvioinnin jälkeen kelvolliset alkiot joko siirretään vastaanottajaan vielä samana päivänä tai säilötään nestetyyppiseen (Hasler 2006). Alkiot voidaan myös jäähdyttää ja säilyttää elatusaineessa useita vuorokausia 4 °C lämpötilassa (Ideta ym. 2013).

Alkioita voidaan tuottaa vaihtoehtoisesti *in-vitro*-menetelmällä. Luovuttajaeläimeltä kerätään munasoluja, joita kasvatetaan laboratoriossa, kunnes ne ovat kypsiä hedelmöittymiseen. Munasolut hedelmöitetään pakastespermalla. IVF-alkioiden voidaan siirtää vastaanottajaan tai säilöä nestetyyppiseen (Galli ym. 2003). *In-vitro*-menetelmällä voidaan parantaa alkionsiirron tehokkuutta (Bousquet ym. 1999, Betteridge 2006)

2.3.1 Tuorealkioidet

Tuorealkioidet siirretään vastaanottajaan mahdollisimman pian huuhtelun jälkeen. Smithin (2004) mukaan alkioidet tulee siirtää kolmen tunnin sisällä huuhtelusta. Alkioita on tosin mahdollista säilyttää useita tunteja huoneenlämmössä sopivassa elatusaineessa (Mapletoft 2006). Jääkaapissa elatusaineessa pidettynä ne säilyvät jopa viikon (Ideta ym. 2013). Elatusaineena käytetään nykyään pääasiassa naudan seerumin albumiinia (BSA) (Hasler 2014). Tuoreena siirretyillä alkioidilla päästään parempiin tiinehtyvyytuloksiin, kuin pakastealkioidilla (Looney 2006, Chebel ym. 2008, Wallace ym. 2011).

2.3.2 Pakastealkiot

Alkiot voidaan pakastaa ja säilöä nestetyyppien. Pakastuksessa käytetään kylmäsuojaineita, joiden tarkoitus on suojata soluja vaurioitumiselta pakastuksen ja sulatuksen aikana. Tavallisimmat kylmäsuojaineet ovat glyseroli ja etyleeniglykoli. Glyserolin käyttö on perinteisempi menetelmä, mutta yhä enenevässä määrin käytetään etyleeniglykolia (Grimes 2008). Kylmäsuojaineiden ei ole todettu vaikuttavan tiinehtyvyyteen (Elsden ym. 1982, Martinez ym. 2002, Mapletoft 2006). Kanadassa etyleeniglykoli- ja glyserolialkioilla on päästy samoihin tiinehtyvyytuloksiin (Mapletoft 2006).

Alkion kehitysvaihe vaikuttaa sen kylmänkestävyyteen (Dochi 1998, Nishigai ym. 1999). On kuitenkin olemassa ristiriitaisia tutkimustuloksia siitä, mikä alkion kehitysvaihe kestää pakastusta parhaiten. Nishigai ym. (1999) toteavat parhaiten pakastusta kestäviksi blastokystivaiheen alkiot, kun taas Dochin ym. (1998) mukaan morulat ja varhaiset blastokystit selviävät paremmin kuin blastokystit ja laajentuneet blastokystit. Sulatuksen jälkeen morulavaiheen alkioissa esiintyy enemmän kuollutta solunsisäistä materiaalia kuin blastokystivaiheen alkioissa (Nishigai ym. 1999). Dochi ym. (1998) havaitsivat, että blastokystit ja laajentuneet blastokystit sisälsivät enemmän vettä blastokystin ontelossa kuin varhaiset blastokystit.

Alkiot tulee jäähdyttää riittävän hitaasti. Jäähdytysnopeuden tulee olla enintään 1 °C/min (Mapletoft 2006). Dochi ym. (1997) vertasivat 0,3 ja 0,5 °C/min jäähdytysnopeuden vaikutusta tiinehtyvyyteen, mutta eivät havainneet kyseisillä nopeuksilla eroa tiinehtyvyydessä. Hidas jäähdytysnopeus saattaa johtaa soluvaurioihin (Dochi ym. 1997).

2.3.2.1 Pakastealkioiden sulatus

Pakastealkiot sulatetaan vesihauteessa, jonka lämpötila on 20–35 °C. Sulatusaika on 7–10 sekuntia. Sulatusnopeuden tulee olla noin 200 °C/min (Smith 2004, Mapletoft

2006, Grimes 2008). Ennen vesihauteeseen upottamista olkia voidaan sulattaa ilmassa 10–15 sekuntia. Tämän on todettu vähentävän zona pellucidan rikkoutumista sulatuksen yhteydessä (Mapletoft 2006). Alkionsiirtoyrityksillä on yleensä omat ohjeistuksensa sulattamiseen. Näitä on tärkeää noudattaa, sillä sulatusprotokolla vaihtelee sen mukaan, minkälaista menetelmää pakastamisen yhteydessä on milloinkin käytetty (Smith 2004).

Glyserolialkiot vaativat erityisen sulatuskäsittelyn, jossa kylmänsuoja-aine poistetaan ennen alkion varsinaista siirtoa vastaanottajaan. Glyseroli poistetaan siirtämällä alkiot konsentraatioltaan aina hieman laimeampaan glyserolia ja sakkaroosia sisältävään liuokseen, kunnes glyseroli saadaan kokonaan poistettua. Sakkaroosi ehkäisee veden liian nopeaa siirtymistä solujen sisään (Smith 2004). Tämän jälkeen alkiot siirretään takaisin PBS-elatusaineeseen, pestään ja suoritetaan laatuarviointi (Mapletoft 2006). Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää menetelmää, jossa glyserolialkioita pidetään 0,5–1,0 M sakkaroosiliuoksessa 10 minuuttia (Mapletoft 2006).

Etyleeniglykoli-alkiot sulatetaan vesihauteessa ilman erikoistoimenpiteitä, sillä kylmänsuoja-aineena käytettävää etyleeniglykolia ei tarvitse poistaa (Voelkel 1992, Mapletoft 2006). Sulatuksen jälkeen alkio on valmis siirrettäväksi vastaanottajaan. Etyleeniglykoli-alkioita käytettäessä puhutaankin niin kutsutusta suorasta siirrosta (Smith 2004, Mapletoft 2006). Suoran siirtotekniikan merkittäviä etuja ovat nopeus ja vaivattomuus. Suora siirto muistuttaa käytännössä hyvin paljon keinosiemennys tekniikkaa (Leibo 1984, Mapletoft 2006). Sulatuksen jälkeen alkiot tulisi siirtää mahdollisimman nopeasti vastaanottajaan, sillä kylmänsuoja-aineessa oleminen on sulaneille alkioille haitallista (Dochi ym. 1997).

2.3.3 Laatu luokitus

Kansainvälinen Alkionsiirtoyhdistys (IETS, International Embryo Transfer Society) suosittelee alkioden jakamista laadun perusteella neljään luokkaan (taulukko 1) (Mapletoft 2006).

2.3.4 Kehitysvaihe

Alkion elinkelpoisuudesta parhaiten kertoo sen kehitysaste (Bó ja Mapletoft 2013). On tärkeää tuntea alkionkehityksen eri vaiheet ja miltä alkioiden missäkin kehitysvaiheessa tulee näyttää, jotta voidaan arvioida, onko alkion kehitys ollut normaalia (Mapletoft 1986). Alkiot luokitellaan IETS:n ehdottaman asteikon mukaisesti (taulukko 2) (Grimes 2008). Huuhdeltujen alkioiden kehitysaste vaihtelee normaalisti varhaisesta morulasta laajentuneeseen blastokystiin (Smith 2004, Grimes 2008).

Taulukko 1. Alkioiden laatuluokat (IETS) (Mapletoft 2006).

Luokka	Kuvaus
Luokka 1	Erinomainen tai hyvä. Symmetrinen ja pallomainen alkiomassa, jossa toisistaan selvästi erottuvat blastomeerit. Blastomeerit kooltaan, väriltään ja tiheydeltään yhtenäisiä. Solumassasta 85 % on intaktia, elinkykyistä alkiokautista massaa. Zona pellucidassa ei ole litteitä tai koveria kohtia, vaan se on pinnaltaan tasainen
Luokka 2	Kohtalainen. Kohtalaista epätasaisuutta alkion solumassan värissä, koossa tai solutiheydessä. Vähintään 50 % elinkykyistä solumateriaalia.
Luokka 3	Kehno: Merkittäviä epätasaisuuksia alkion solumassa värissä, koossa tai solutiheydessä. Vähintään 25 % elinkykyistä solumassaa
Luokka 4	Kuollut tai degeneroitunut: Degeneroituneita alkioita, munasoluja tai yksisoluisia alkioita. Elinkyvyyttömiä.

Taulukko 2. Alkioiden luokitteluasteikko (IETS) (Grimes 2008).

Luokka	Kuvaus
1	Hedelmöittymätön
2	2 - 12-soluinen
3	Varhainen morula
4	Morula
5	Varhainen blastokysti
6	Blastokysti
7	Laajentunut blastokysti
8	Kuoriutunut blastokysti
9	Laajentunut ja kuoriutunut blastokysti

2.4.2 Ei-kirurginen siirto

Lähes kaikki alkionsiirrot suoritetaan nykyisin ei-kirurgisella siirtotekniikalla. Ensimmäinen ei-kirurginen siirto, joka johti elävään jälkeläiseen, tehtiin Floridassa vesipuhvelilla vuonna 1983 (Duran 2000). Ei-kirurgisen siirtotekniikan hyviä puolia ovat sen helppous ja nopeus. Kirjallisuudessa esitellään useita ei-kirurgisia siirtotekniikoita ja välineitä, mutta yleisin ja käytetyin väline on Cassoun instrumentti (suom. pistoletti), jossa käytetään 0,25 tai 0,5 ml:n olkia. Cassoun instrumentti on alkujaan kehitetty keinosiemennykseen (Leibo 1984, Rowe 1986, Duran 2000, Looney ym. 2006).

Ennen siirtoa vastaanottajan munasarjat palpoidaan rektaalisesti, varmistetaan keltarauhasen olemassaolo ja kirjataan ylös, kummassa munasarjassa keltarauhanen sijaitsee (Rowe 1986, Smith 2004). Vastaanottajalle voidaan antaa epiduraalipuudutus, jonka tarkoitus on vähentää peräsuolen kontraktioita ja siten helpottaa rektaalityöskentelyä. Epiduraalipuudutuksen pistokohta pestään huolellisesti ennen puuduttamista. Olki asetetaan pistolettiin ja pistoletin päälle asetetaan muovinen pistoletinsuojus. Pistoletti viedään emättimeen, kohdunkaulan suulle ja työnnetään se suojasukan läpi. Suojasukan rikkouduttua pistoletti viedään kohdunkaulan läpi kohtuun ja edelleen keltarauhasen puoleiseen kohdunsarveen (Rowe 1986). Tarkempi

laskukohta on arvioitava aina lehmäkohtaisesti, mutta optimaalisena laskukohtana pidetään kohdun eksternaalisen bifurkaation tasoa. Duranin (2000) mukaan paras laskukohta on kohdun sarven keskimäinen kolmannes. Tällöin todennäköisyys aiheuttaa vaurioita kohdun limakalvoon on pienempi kuin vietäessä alkio pidemmälle kohdun sarveen.

Siirtäjän kokemus ja taito suorittaa siirto atraumaattisesti ovat ratkaisevassa asemassa alkionsiirron onnistumisen kannalta (Duran 2000, Looney ym. 2006). Alkionsiirto suoritetaan kohdun ollessa diestrus-vaiheessa, jolloin kohtu on huomattavasti herkempi tulehduksille ja vaurioille kuin estrus-vaiheessa. Alkionsiirron yhteydessä aiheutuva endometrium trauma voi johtaa tulehdusreaktioon. Tulehduspaikalle saapuvat makrofagit ja muut puolustusjärjestelmän solut aikaansaavat epäedulliset olot alkion kehitykselle (Duran 2000).

Merkittävin heikkous ei-kirurgisessa siirrosta on sen soveltumattomuus yksilöille, joiden kohdunkaulasta on vaikeaa tai mahdotonta päästä pistoletilla lävitse (Rowe 1986, Duran 2000). Siirtohetkellä vastaanottaja ei ole kiimassa, kuten on asianlaita keinosiemennyksen yhteydessä. Keinosiemennyksen yhteydessä kiimassa olevan lehmän tai hiehon kohdunkaula on avoin, jolloin pistoletti menee yleensä vaivatta sen lävitse. Alkiota siirrettäessä vastaanottaja on diestrus-vaiheessa, jolloin vastaanottajan kohdunkaula on kiinni ja siten instrumentin läpivienti on vaikeampaa (Seidel ym. 2003). Jaśkowski ym. (2010) tutkivat kohdunkaulan läpäisemiseen kuluvan ajan vaikutusta tiinehtyvyyteen. Keskimäärin alkion kohtuun saattamiseen kului 50,6 s, jolloin saavutettiin 53,4 % tiinehtyvyys. Jos alkionsiirtoon kului yli 60 sekuntia, oli tiinehtyvyys merkitsevästi huonompi (20,4 %). Kohtutulehduksen riski on suurempi kiimattomalla kuin kiimaisella naudalla (Seidel ym. 2003). Tiinehtyvyys on selvästi huonompaa vastaanottajilla, joilla on vaikeasti läpimentävä kohdunkaula (Brand 1977). Jotta toimenpide voidaan tehdä mahdollisimman atraumaattisesti, on tärkeää, että eläin pysyy paikoillaan ja rauhallisena. Eläin voidaan rauhoittaa toimenpidettä varten. Nishigain (2003) mukaan vastaanottojan rauhoittaminen ksylatsiinilla ei kuitenkaan merkitsevästi paranna tiinehtyvyyttä.

2.5 Tiinehtyminen

Alkion vastaanottajan tiinehtymiseen voivat vaikuttaa monet eri tekijät, jotka voidaan jaotella ulkoisiin ja sisäisiin tekijöihin. Sisäisiksi tekijöiksi voidaan lukea alkion laatu, kehitysvaihe ja plasman progesteronipitoisuus. Myös erilaiset eksogeeniset hormonit tai lääkeaineet, kuten progesteroni, hCG, GnRH ja fluniksiinimeglumiini ovat sisäisiä vaikuttimia. Vastaanottajan poikimakerta, lämpöstressi, maitotuotos, ravitsemus ja kuntoluokka ovat ulkoisia tekijöitä, joilla saattaa olla vaikutusta tiinehtyvyyteen.

2.5.2 Tiinehtymiseen vaikuttavat sisäiset tekijät

2.5.2.1 Alkion laatu ja kehitysvaihe

Alkion laatu ja kehitysaste vaikuttavat merkittävästi tiinehtyvyyteen alkionsiirron yhteydessä (Bényei ym. 2006). Laadultaan erinomaiset ja hyvät alkiot tiinehdyttävät paremmin kuin huonolaatuiset alkiot (Tervit ym. 1980, Mapletoft 1986, Hasler ym. 1987, Looney ym. 2006, Bényei 2006, Chebel ym. 2008). Myös Lindner ja Wright (1983) havaitsivat alkioden laadun vaikuttavan merkitsevästi tiinehtyvyyteen. Laadultaan erinomaisten, hyvien, kohtalaisten ja huonojen alkioden käyttö johti 45, 44, 27, 20 %:n tiinehtyvyyteen. Hanekamp (1999) kuitenkin puoltaa myös kohtalaisten alkioden käyttöä, sillä hän ei havainnut merkitsevää eroa tiinehtyvyydessä hyvien ja kohtalaisten alkioden välillä. Mapletoftin (2006) mukaan laadultaan kohtalaisilla alkioilla tiinehtyvyys on hyvien alkioden tiinehtyvyyttä heikompi, niitä voidaan käyttää, mutta silloin siirto tulisi silloin suorittaa tuoreena. Jos huonolaatuisia tai kohtalaisia alkioita käytetään, ne tulisi siirtää vastaanottajaan, jonka kiimakierto vastaa tarkasti alkion ikää (Hasler ym. 1987). Huonoja ja kohtalaisia alkioita ei IETS:n ohjeiden mukaan tule kuitenkaan käyttää vientiin (Mapletoft 2006).

Nishigai (2003) tutki alkion kehitysasteen vaikutusta tiinehtyvyyteen. Japaneseblack-rotuisista lehmistä huuhdeltuja alkioita siirrettiin holstein-hiehoihin. Siirtoihin käytettiin pakastettuja alkioita, joiden laatu ja kehitysaste arvioitiin mikroskoopilla sulatuksen jälkeen. Alkion kehitysvaiheella havaittiin selvä vaikutus tiinehtyvyyteen.

Blastokystivaiheen alkioilla saavutettiin paras tiinehtyvyys (81 %). Varhaisen blastokystivaiheen alkioilla päästiin 67 %:iin ja morulavaiheen alkioilla 62 %:iin. Muiden kehitysvaiheiden alkioita ei tutkimuksessa käytetty. Myös Chepel ym. (2008) saivat vastaavia tuloksia. Varhaisen blastokystivaiheen alkiot tiinehdyttivät paremmin kuin morulavaiheen alkiot. Bowen ym. (1978) ja Martinez ym. (2002) eivät taasen havainneet eroa tiinehtyvyydessä morula ja blastokystivaiheen välillä. Myöskään Béneyi ym. (2006) eivät havainneet merkitsevää eroa tiinehtyvyydessä eri kehitysvaiheiden välillä.

Vastaanottajien tiinehtyvyys on parempi käytettäessä tuorealkiota kuin käytettäessä pakastealkioita (Wallace ym. 2011). Myös Hasler (2001) sai tuorealkioilla parempia tiinehtyvyytuloksia. *In-vitro*-tuotetut alkiot tiinehdyttävät *in-vivo*-alkioita huonommin (Hasler 2006).

2.5.2.2 Plasman progesteroni

Riittävä progesteronieritys on välttämätöntä tiineyden ylläpitämiseksi (Nishigai 1998, Chagas e Silva ym. 2002, Smith 2004, Lopez-Gatius ym. 2004, Mann ym. 2006, Looney ym. 2006, Siqueira ym. 2009, Beltman ym. 2009, Carter ym. 2010). Siitä, mikä on tiinehtymisen kannalta riittävä progesteronipitoisuus, on kuitenkin ristiriitaisia tuloksia. Nishigai ym. (1998) raportoivat tiinehtyvyyden olevan merkittävästi parempi, kun vastaanottajan plasman progesteronipitoisuus alkionsiirtoajankohtana oli vähintään 2,5 ng/ml, kuin jos se oli tämän alle. Nishigain ym. (1998) mukaan tiinehtyvyys huononee merkittävästi plasman progesteronin ollessa alle 2,0 ng/ml, kun taas Chagas e Silvan ym. (2002) pitävät huonon tiinehtyvyyden rajana 1,0 ng/ml:ssa. Spellin ym. (2001) mukaan progesteronin ollessa siirtohetkellä 0,58–16,0 ng/ml tiinehtyvyydessä ei havaita eroja. Progesteronipitoisuuden mittaamista siirtopäivänä voidaan käyttää karsimaan pois vastaanottajat, joilla progesteronipitoisuus on hyvin pieni (Chagas e Silva ym. 2002), mutta tiinehtymisen todennäköisyyttä ei voida luotettavasti arvioida progesteronipitoisuuden perusteella (Nishigai ym. 1998, Chagas e Silva ym. 2002, Siqueira ym. 2009).

2.5.2.3 Eksogeeninen progesteroni

Alkionsiirtojen tiinehtymistuloksia on pyritty parantamaan erilaisin eksogeenisen hormonivalmistein (Rowe 1986). Osan vastaanottajista on todettu hyötävän eksogeenisestä progesteronilisästä, mutta vaikutusmekanismi on epäselvä, eikä varmaa näyttöä tiinehtymistä tukevasta vaikutuksesta ole (Rowe 1986, Geisert ym. 1991, Lopez-Gatius ym. 2004). Lonergan ym. (2007) vertasivat alkioiden kehitystä kahdessa vastaanottajien ryhmässä, joiden progesteronipitoisuudet olivat $36,32 \pm 1,28$ ja $10,30 \pm 0,51$ ng/ml. He havaitsivat alkioiden kehittyvän nopeammin vastaanottajissa joiden plasman progesteronipitoisuus oli suurempi. Tämä ei kuitenkaan suoranaisesti tarkoita parempaa tiinehtyvyyttä. Geisert ym. (1991) havaitsivat kiimakierron päivinä 1–4 annetun progesteronilisän parantavan tiinehtyvyyttä vastaanottajilla, jotka olivat kolme päivää jäljessä alkion ikää. Lawson ja Cahill (1983) saivat samankaltaisia tuloksia lampailla. Tulokset viittaavat siihen, että vastaanottajan ollessa asynkroninen alkion ikään verrattuna kiimakierron alussa annettu progesteroni muuttaa kohdun otollisemmaksi alkionkehitykselle ja tiinehtyminen on todennäköisempää (Lawson ja Cahill 1983, Geisert ym. 1991, Smith 2004).

Eksogeenisen progesteronin vaikutusta tiinehtyvyyteen siemennysten yhteydessä on tutkittu paljon, mutta vaihtelevin tuloksin. Osalla siemennetyistä progesteronilisän on todettu parantavan tiinehtyvyyttä (Lopez-Gatius ym. 2004, Smith 2004, Stronge ym. 2005, Carter ym. 2008, Beltman ym. 2009, Lopez-da-Costa ym. 2011). Tämänhetkisen tiedon mukaan eksogeeninen progesteroni annettuna alkiokehityksen varhaisessa vaiheessa johtaa lisääntyneeseen interferoni-taun tuotantoon, joka taas parantaa tiinehtyvyyttä (Beltman ym. 2009). Epäselvää on, miksi vain osa eläimistä hyötyy hoidosta. Beltmanin ym. (2009) mukaan niillä yksilöillä, joilla on luontaisesti pieni progesteronipitoisuus, eksogeeninen progesteronilisä tukee tiinehtyvyyttä. Lehmillä, joilla progesteronipitoisuus on pieni, alkion kehittyessä morulasta blastokystiksi, alkioiden on todettu olevan pienempiä ja tuottavan vähemmän interferoni-tausta päivinä 13–16. Vaikuttaisikin siltä, että alkionkehitys morulasta blastokystivaiheeseen on kriittinen vaihe progesteronilisän kannalta (Beltman ym. 2009).

Eksogeenisen progesteronin mahdollisista haittavaikutuksista on vaihtelevia tuloksia. Smithin (2004) mukaan progesteronia vapauttavilla intravaginaalisilla hormonikierukoilla on alkionsiirron yhteydessä todettu haittavaikutuksia käytettäessä kahta kierukkaa samanaikaisesti päivinä 7–21. Liian suuri progesteronilisä voi johtaa LH-erityksen vähenemiseen sekä keltarauhasen pienenemiseen ja toiminnan heikkenemiseen. Haittavaikutuksia ei kuitenkaan havaittu käytettäessä yhtä kierukkaa päivinä 7–19 (Beltman ym. 2009).

2.5.2.4 hCG

On olemassa näyttöä siitä, että ihmisen istukkagonadotropiini-hoidolla (human chorionic gonadotropin, hCG) on alkion vastaanottajien tiinehtymistä tukeva vaikutus (Nishigai ym. 2002, Wallace ym. 2011). hCG:n toiminta naudalla perustuu sen luteinisoivaan vaikutukseen (LH-vaikutus). LH-vaikutus aikaansaa plasman progesteronipitoisuuden nousun ja estradiolipitoisuuden laskun (Carruthers 1986, Nishigai 2002, De Rensis 2010). Ovulaation jälkeen kehittyvän keltarauhasen lisäksi munasarjoissa alkaa kasvaa uusi follikkeliaalto. Kun vastaanottajalle annetaan hCG-injektio viisi päivää kiiman jälkeen, aikaansaa se dominoivan follikkelin ovuloitumisen ja uuden keltarauhasen muodostumisen. hCG siis indusoi uuden keltarauhasen muodostumisen ja samalla se tukee jo olemassa olevan keltarauhasen toimintaa LH-vaikutuksen kautta. Tämän on todettu parantavan tiinehtyvyyttä (Nishigai 2002, De Rensis ym. 2010, Wallace ym. 2011).

2.5.2.5 GnRH

Alkionsiirtojen osalta GnRH:n vaikutuksesta tiinehtyvyyteen ei ole selvityksiä, mutta siemennetyillä lehmillä tehtyjen tutkimusten mukaan tällä saattaa olla merkitystä. GnRH aikaansaa ovulaation ja keltarauhasen muodostumisen hCG:n tavoin. Smithin (2004) mukaan GnRH:n agonistisen analogin busereliinin anto päivinä 11–13 (päivä 0=kiima) parantaa tiinehtyvyyttä vähentämällä plasman estradiolipitoisuutta ja siten

estämällä luteolyysiä. De Rensis ym. (2010) kuitenkin toteavat, että busereliinin LH-vaikutus on lyhytaikaisempi kuin hCG:n, eikä se nosta plasman progesteronipitoisuutta yhtä paljon kuin hCG. Franco ym. 2006 eivät havainneet GnRH:lla olevan tiinehtyvyyttä parantavaa vaikutusta.

2.5.2.6 Fluniksiinimeglumiini

Kohdun manipuloiminen siirrettäessä alkiota johtaa $\text{PGF}_{2\alpha}$:n erittymisen endometriumilta (Scenna ym. 2005). $\text{PGF}_{2\alpha}$ on todettu vaikuttavan haitallisesti alkion kehitykseen ja heikentävän tiinehtyvyyttä (Schrick ym. 1993, Buford ym. 1996, Lemaster ym. 1999). Scenna ym. (2004) havaitsivat elatusaineeseen lisätyn $\text{PGF}_{2\alpha}$:n estävän *in-vitro*-alkioiden kasvua ja kehitystä. Fluniksiinimeglumiinilla on prostaglandiinin synteesiä estävä vaikutus (Scenna ym. 2005, Purcell ym. 2005). Fluniksiinimeglumiinin käytöstä $\text{PGF}_{2\alpha}$:n inhibiittorina tiinehtyvyyden parantamiseksi on saatu vaihtelevia tuloksia. Scenna ym. (2005) havaitsivat tiinehtyvyyden paranevan hoidettaessa vastaanottaja fluniksiinilla siirtopäivänä. Myös Purcellin ym. (2005) mukaan fluniksiinin anto parantaa tiinehtyvyyttä. Bülbül ym. (2010) eivät kuitenkaan havainneet merkitsevää eroa tiinehtyvyydessä, kun vastaanottajat hoidettiin fluniksiinilla. Odensvik ja Gustafsson (1994) eivät myöskään havainneet fluniksiinilla olevan vaikutusta alkion eloonjäämiselle tutkimuksessa, jossa vastaanottajat, jotka olivat kolme päivää edellä alkion ikää, hoidettiin fluniksiinilla päivittäin 14 päivän ajan alkaen kiimapäivästä. Myöskään siemennysten yhteydessä tiinehtyvyyden ei ole todettu paranevan hoidettaessa eläimet fluniksiinilla (Von Krueger ja Heuwieser 2010). Uuhilla tehdyssä tutkimuksessa fluniksiinin anto parittelun jälkeen 8 päivän ajan ei parantanut tiinehtyvyys tuloksia (Aké-Lopéz ym. 2005).

2.5.3 Tiinehtymiseen vaikuttavat ulkoiset tekijät

2.5.3.1 Lämpöstressi

Kohonneen ruumiinlämmön on todettu olevan haitaksi naudan lisääntymiselle ja haittaavan erityisesti varhaista alkionkehitystä (Hansen ja Aréchiga 1999). Ferreiran ym. (2010) mukaan alle kolmen päivän ikäinen alkio on erityisen herkkä lämpöstressin aiheuttamille vaikutuksille, mutta tätä vanhemmat ovat jo kestävämpiä. Alkionsiirron yhteydessä vastaanottajan kokeman lämpöstressin on todettu vaikuttavan tiinehtyvyyteen negatiivisesti (Lopez- Gatus ym. 2004, Béneyi ym. 2006, Demetrio ym. 2007 Vasconcelos ym. 2011). Lopez-Gatus ym. (2004) havaitsivat, että kuumana vuodenaikana alkionsiirrosta tiinehtyneillä lehmillä oli 1,6-kertainen riski tiineyden keskeytymiseen. Hiehojen havaittiin kuitenkin kestävän lämpöstressiä lehmiä paremmin, vaikkakin Floridassa tehdyssä tutkimuksessa hiehojen tiinehtyvyys oli niin ikään huonompi kuumana kuin viileämpänä kautena (Lopez-Gatus ym. 2004). Laktoivat lehmät ovat hiehoja herkempiä kuumuudelle johtuen suuren rehunkulutuksen ja maidontuotannon aiheuttamasta lisääntyneestä metaboliasta (Vasconcelos ym. 2011). Chepelin ym. (2008) mukaan vähentämällä kuumuuden aiheuttamaa stressiä voidaan alkionsiirrossa päästä parempiin tiinehtymistuloksiin.

2.5.3.2 Ravitseminen ja kuntoluokka

Riittävä ja tasapainoinen energian, proteiinien, vitamiinien ja veden saanti on tärkeää hyvän hedelmällisyyden kannalta. Energiavajeella on todettu selvä negatiivinen vaikutus tiinehtyvyyteen. Ravintoaineista etenkin fosfori ja hivenaineet ovat tärkeitä hyvän hedelmällisyyden kannalta (Mapletoft 2006). Vastaanottajan hyvän ravitsemuksen onkin todettu olevan tiinehtyvyyttä parantava tekijä (Ambrose ym. 1999, Smith 2004, Looney ym. 2006, Béneyi ym. 2006, Stroud ja Hasler 2006). Smithin (2004) mukaan hiehon optimaalinen kuntoluokka siirtohetkellä on 2–2,5 ja lehmällä 2,5–3 (asteikolla 1–5). Looney ym. (2006) ovat esittäneet vastaavanlaisia tuloksia: kuntoluokassa 3 olleiden vastaanottajien tiinehtyvyys oli 55 %, kuntoluokassa 2 53 %, kuntoluokassa 1 44 % ja kuntoluokassa 4–5 47 %. Ambrose ym. (1999) havaitsivat, että

yhden kuntoluokan lisäyksellä saavutettiin 37 %:n paraneminen tiinehtyvyydessä. Lypsylehmillä tehdyssä tutkimuksessa kuntoluokassa 2 tai 3 olleet vastaanottajat tiinehtyivät paremmin kuin kuntoluokassa 1,4 tai 5 olleet vastaanottajat (Wallace ym 2011).

2.5.3.3 Maitotuotos

Lehmien hedelmällisyys on heikentynyt maitotuotoksen lisääntymisen myötä (Hasler 2006). USA:ssa lypsylehmillä (keinosiemennetyillä) tiinehtyvyys heikkeni 66 %:sta 50 %:iin vuodesta 1951 vuoteen 1973, samalla kun maitotuotos nousi 33 % (Butler 2003). Pettersonin ja Leen (2003) sekä Haslerin (2006) mukaan on hyvin todennäköistä, että runsas maitotuotos vaikuttaa negatiivisesti tiinehtymiseen myös alkiosirron yhteydessä. Syitä tähän ei tunneta. Demetrio ym. (2007) havaitsivat, että suuri maitotuotos on yhteydessä huonompaan tiinehtyvyyteen siemennetyillä, mutta ei alkion vastaanottajilla. Myöskään Vasconcelosin ym. (2006) mukaan paljon lypsävät vastaanottajat eivät tiinehtyneet merkitsevästi huonommin kuin vähemmän lypsävät. Petersonin ja Leen (2003) mukaan ne yksilöt, jotka tiinehtyvät hyvin luonnollisen astumisen tai keinosiemennyksen jälkeen, ovat hedelmällisiä myös alkiosirron yhteydessä (Peterson & Lee 2003).

2.5.3.3 Poikimakerran vaikutus

Vastaanottajan poikimakerran vaikutuksesta tiinehtyvyyteen on ristiriitaisia tuloksia. Stroudin ja Haslerin (2006) mukaan lypsyrotuisten hiehojen tiinehtyvyys on parempi kuin lehmien. Myös Dochi ym. (1997) pitävät hiehoja parempina vastaanottajia, koska hiehot ovat yleensä lemiä paremmassa ravitsemustilassa, niillä ei yleensä ole sairaushistoriaa ja niiden kohtu on otollisempi onnistuneelle alkionsiirrolle. Sen sijaan Beneyi ym. (2006) eivät havainneet eroa tiinehtyvyydessä lypsyrotuisten hiehojen ja lehmien välillä. Lihakarjalla tiinehtyvyydessä ei havaittu eroa hiehojen ja lehmien välillä (Looney ym. 2006, Stroud ja Hasler 2006).

2.5.4 Vastaanottajan valinta

Alkionsiirron onnistumisen kannalta on ehdottoman tärkeää valita vastaanottajiksi sopivia eläimiä (Rowe 1986, Smith 2004, Looney ym. 2006, Stroud ja Hasler 2006). Vastaanottajiksi voidaan valita hiehoja tai lehmiä. Riittävä ikä ja koko ovat olennaisia valintakriteereitä (Rowe 1986). Vastaanottajan ollessa hieho, sen tulisi olla vähintään 15 kk:n ikäinen (Smith 2004). Hiehoilla on suurempi riski poikimavaikeuksille (Grimes2008). Riski kasvaa etenkin silloin, kun vastaanottaja kuuluu pienikokoiseen rotuun ja siirrettävä alkio on rodultaan isokokoinen (Seidel ym. 1989). Näin ollen rotuun on hyvä kiinnittää huomiota, jos vastaanottajana halutaan käyttää hiehoja (Seidel ym. 1989). Lehmillä vastaanottajan rodulla ei ole niinkään merkitystä (Seidel ym. 1989).

Myös muut tekijät kuin tiinehtyvyys voivat olla merkittäviä vastaanottajan valinnassa. Stroud ja Hasler (2006) tuovat esille hiehojen suuremman riskin poikimavaikeuksille lehmiiin verrattuna, kun taas lehmien ternimaidon on todettu olevan laadukkaampaa kuin ensikertaa poikivilla hiehoilla, mikä niin ikään puoltaa lehmien paremmuutta vastaanottajina (Seidel ym. 1989)

Vastaanottajan tulee olla terve (Stroud ja Hasler 2006) ja säännöllisesti sykloiva (Rowe 1986). Valintahetkellä on varmistuttava siitä, että lehmä on täysin palautunut edellisestä poikimisesta (Smith 2004). On olemassa erilaisia suosituksia poikimisen jälkeisen lepoajan pituudeksi. Smithin (2004) mukaan poikimisesta tulee olla kulunut vähintään kuusi viikkoa. Suomessa alkionsiirtoja myyvä Faba ohjeistaa lepoajaksi vähintään kahta kuukautta (Faba 2012).

Grimesin (2008) mukaan vastaanottajiksi tulisi valita lehmiä, jotka lypsävät moitteettomasti ja jotka ovat hoitaneet aiemmat vasikkansa hyvin. Hyvin sujuneet, ongelmattomat poikimiset ovat tärkeää huomioida vastaanottajan valinnassa (Smith 2004). Vastaanottajan lisääntymiselimissä ei tule olla minkäänlaisia patologisia muutoksia, vaan niiden tulee olla terveet (Alarcón ym. 2010).

Riittävä progesteronieritys on välttämätöntä tiineyden ylläpitämiseksi (Nishigai 1998, Chagas e Silva ym. 2002, Smith 2004, Looney 2006). Vastaanottajalla tulee siis olla toimiva keltarauhanen jommassakummassa munasarjassa. Keltarauhasen toimintaa voidaan karkeasti arvioida koon ja morfologian perusteella. Arviointi perustuu useimmiten rektaalipalpaatioon, mutta apuna voidaan käyttää ultraäänitutkimusta. Pääsääntöisesti hyvin kehittyneen keltarauhasen progesteronituotanto on riittävä tiineyden ylläpitämiseksi. Aina näin ei kuitenkaan ole. Hyvältä tuntuvan keltarauhasen progesteronin tuotanto saattaa olla riittämätöntä. Keltarauhasen toimintaa ei siten voida täysin luotettavasti arvioida koon ja morfologian perusteella. Keltarauhasen toiminta voidaan varmistaa mittaamalla maidon tai plasman progesteronipitoisuus (Nishigai 1998).

2.6 Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä

Nautojen lisääntymiseen liittyvät toimenpiteet, alkionsiirto mukaan lukien, saattavat aiheuttaa eläimelle jonkinasteista epämukavuutta. Lisäksi alkionsiirtäjän voi olla vaikeaa manipuloida kohtua peräaukon ja peräsuolen voimakkaiden kontraktioiden vuoksi.

Alkionsiirrossa, kuten muissakin lisääntymiseen liittyvissä toimenpiteissä, voidaan käyttää epiduraalianestesiaa kivunlievitykseen ja työskentelyn helpottamiseksi. Epiduraalianestesiassa peräsuolen, peräaukon ja kohdun kontraktiot vähenevät ja häntä rentoutuu (Greene 2003, Beltman ym. 2010).

Tavallisin epiduraalianesteettina käytettävä lääkeaine on lidokaiini, useimmiten pitoisuudeltaan 20 mg/ml. Matalassa epiduraalianestesiassa lehmän epiduraalitilaan injisoidaan 100–120 mg lidokaiinia. Tämä vastaa tilavuudeltaan 5–6 ml vahvuudeltaan 20 mg/ml lidokaiinivalmistetta. Lidokaiini aikaansaa noin 30 minuuttia kestävä paikallisen anestesian (Beltman ym. 2010). Muita mahdollisia lääkeaineita ovat mepivakaiini, bupivakaiini, prokaiini, tramadoli, ketamiini ja ksylatsiini (Lee ym. 2003, Edmondson 2008, Bigham ym. 2010). Ksylatsiinin on todettu aikaansaavan

voimakkaamman ja pitkäkestoisemman analgeettisen vaikutukset kuin lidokaiini (Caron & LeBlanc 1989). Epiduraalianestesiassa käytetty ksylatsiini aiheuttaa myös systeemisiä vaikutuksia, kuten sedaatiota, salivaatiota, vokalisaatiota ja bradykardiaa. Myös ataksiaa saattaa esiintyä (Caron & LeBlanc 1989, Ko ym. 1989). Bigham ym. (2010) osoittivat myös tramadolilla olevan pitkäkestoisemman analgeettisen vaikutuksen kuin lidokaiinilla. DeRossin ym. (2010) mukaan hiehoilla epiduraalipuudutus käytettäessä lidokaiinia, ketamiinia tai näiden yhdistelmää aikaansaa tyydyttävän analgesian ja helpottaa toimenpiteitä aiheuttamatta kuitenkaan eläimelle epämukavuutta tai ataksiaa.

Hiehoilla, jotka olivat saaneet epiduraalipuudutuksen vähintään seitsemän kuukautta ennen teurastusta, ei postmortem-tutkimuksissa injektiokohdassa tai viereisissä kudoksissa havaittu merkkejä infektiosta tai tulehduksesta (McEvoy ym. 2002). Epiduraalianestesiaa voidaan siis pitää varsin turvallisena toimenpiteenä.

2.7 Tautiriski ja sen hallinta alkionsiirron yhteydessä

Alkionsiirtoa voidaan pitää tautien leviämisen kannalta turvallisena ja vähäriskisenä toimenpiteenä (Wrathall 1995, Givens & Marley 2008). Eläintautien leviämisen riski on huomattavasti pienempi hankittaessa uutta eläinainesta alkiona kuin ostamalla uusia eläinyksilöitä. Riskien arviointi ja hallinta on kuitenkin ensiarvoisen tärkeää, sillä jotkin eläintaudit voivat levitä myös alkioden mukana (Sutmoller & Wrathall 1995, Wrathall 1995, Givens & Marley 2008, Thibier 2010). Tutkimustietoa on olemassa 89 patogeenin leviämisestä naudan alkionsiirron yhteydessä (Thibier 2010). IETS on jakanut alkionsiirron yhteydessä mahdollisesti leviävät taudit neljään kategoriaan (1–4) perustuen riskinarviointiin olettaen toimenpiteissä noudatettavan vallitsevia hygieniakäytäntöjä. Suu- ja sorkkatauti, sinikielitauti, entsoottinen leukoosi, bruselloosi, IBR ja BSE kuuluvat kategoriaan 1 (mitätön riski). Alkion luovuttaja, munasolun hedelmöittämiseen käytettävä siemenneste, alkion säilömiseen käytettävät eläinperäiset aineet, ja alkion vastaanottaja ovat potentiaalisia taudinaiheuttajien lähteitä. Siirrettävä alkio voi kontaminoitua myös ympäristöstä peräisin olevalla taudinaiheuttajalla (Stringfellow ym. 2004, Givens & Marley 2008).

2.7.1 Sperman luovuttaja

Alkiohuuhteluohjelmassa hedelmöittämiseen käytettävässä spermassa saattaa olla monia taudinaiheuttajia (Thibier 2006, Bielanski 2007, Van Soom & Nauwynck 2008). Merkittävimpiä sperman kautta leviäviä taudinaiheuttajia ovat naudan leukoosi virus (BLV), sinikieli virus (BTV), naudan herpesvirus-1 (BHV-1) ja naudan virusripulivirus (BVDV). *In-vivo*-tuotettujen alkioiden riski kantaa sinikieli- tai leukoosi-virusta on mitätön, vaikka käytetty siemen olisi ollut infektoitunut. Jopa herpesviruksen infektoiman sperman käyttöä voidaan pitää turvallisena, jos alkiot käsitellään huuhtelun jälkeen trypsiinillä (Thibier 2006, Van Soom & Nauwynck 2008). Virusripuliviruksen leviäminen spermasta alkioihin on kenttätutkimuksien perusteella epätodennäköistä (Thibier 2006, Givens & Marley 2008). Sen sijaan *in-vitro*-tuotetuilla alkioilla on suurempi riski levittää kyseisiä tauteja. Infektoituneen sperman käyttö *in-vitro*-alkiotuotannossa johtaa usein kontaminoitumiseen (Van Soom & Nauwynck 2008).

2.7.2 Munasolun tai alkion luovuttaja

Luovuttajan tulisi ihannetapauksessa olla terve ja hedelmällinen (Sutmoller & Wrathall 1995). Eläimelle tulisi suorittaa kliininen yleistutkimus ennen sen hyväksymistä alkion luovuttajaksi. Myös ympäristön tautitilanteeseen tulee kiinnittää huomiota luovuttajaa tutkittaessa (Thibier 2006, 2010). Luovuttajien testaamista patogeenien varalta pidetään suositeltavana, mutta se on kallista ja aikaa vievää (Van Soom & Nauwynck 2008). Tautia kantavia yksilöitä valitaan joskus alkion tai sperman luovuttajiksi, jos on tarkoituksenmukaista saada arvokkaista yksilöstä jälkeläisiä (Van Soom & Nauwynck 2008). Suomessa alkionsiirtoa koskevassa lainsäädännössä on tarkat vaatimukset siitä, minkä tautien suhteen luovuttajaeläin on todettava terveeksi ennen kuin sen alkioita voidaan kerätä ja luovuttaa edelleen (MMM 1027/2013).

Alkion tai munasolun kantamat taudinaiheuttajat voivat olla peräisin infektoituneesta luovuttajasta. Tällaisesta eläimestä on kuitenkin mahdollista huuhdella taudinaiheuttajista vapaita alkioita. Givens ja Marley (2008) pitävät luovuttajien

testaamista tiettyjen patogeenien varalta tärkeänä, vaikka taudin kulkeutuminen luovuttajasta alkioon tai munasoluun on epätodennäköistä. Tautien patogeneesin yksityiskohtainen tunteminen on avainasemassa arvioitaessa taudinaiheuttajien siirtymistä alkioihin (Sutmoller & Wrathall 1995). Suu- ja sorkkatautiviruksen siirtyminen alkioihin on hyvin epätodennäköistä, vaikka luovuttaja olisikin viruksen kantaja (Sutmoller & Wrathall 1995).

Tautiriskin minimoimiseksi alkioita voidaan käsitellä eri tavoin. Alkioiden käsittely trypsiinillä on osoittautunut tehokkaaksi keinoksi useita tiukasti zona pelludicaan kiinnittyviä taudinaiheuttajia, kuten BHV1-virusta, vastaan (Thibier 2006). Trypsiini-käsittelyn on todettu poistavan taudinaiheuttajia tehokkaammin *in-vivo*- kuin *in-vitro*-tuotetuista alkioista. Tämä johtunee siitä, että taudinaiheuttajat kiinnittyvät tiukemmin *in-vitro*-tuotettujen alkioiden zona pelludicaan (Van Soom ja Nauwynck 2008). Jotkin antimikrobiset lääkeaineet ovat tehokkaita vain tietyn tyyppisiä mikro-organismeja vastaan. Antibiootit tehoavat hyvin bakteereihin, mutta eivät viruksiin. Trypsiinikäsittely poistaa tehokkaasti eräitä herpesviruksia (Stringfellow ym. 1990), mutta se ei tehoa muihin viruksiin eikä bakteereihin (Wrathall 1995). Alkioiden pesukäsittely voi olla tehokas sekä erilaisia bakteereita että viruksia vastaan (Bielanski 2007).

Alkiota ympäröi niin sanottu alkionkuori (zona pellucida), joka on alkion tärkein suojausmekanismi taudinaiheuttajia vastaan. Zona pellucida estää taudinaiheuttajien tunkeutumisen alkion sisään (Stringfellow ym. 2004, Bielanski 2007). Vaikka taudinaiheuttajat eivät pääsisikään alkion sisään, ne voivat aiheuttaa vastaanottajassa infektion, joka sitten myöhemmin leviää sikiöön (Wrathall 1995). Useimmissa tapauksissa zona pelludicaan sitoutuneet taudinaiheuttajat saadaan melko helposti eliminoitua pesukäsittelyillä (Wrathall 1995). On kuitenkin olemassa joukko bakteereita (esim. *Brucella ovis*, *Escheria coli*, *Mycobacterium paratuberculosis*, mykoplasmat, streptokokit) ja viruksia (esim. naudan herpesvirus, vesikulaarinen stomatiitti), jotka kykenevät sitoutumaan zona pelludicaan niin tiukasti, ettei niitä saada poistettua pesukäsittelyillä (Wrathall 1995). Huuhtelun jälkeen alkioita säilytetään nesteessä, johon on lisätty antibiootteja. Antibiootit useimmiten tuhoavat tehokkaasti alkioihin kiinnittyneet bakteerit (Wrathall 1995).

2.7.3 Eläinperäiset väliaineet ja välineet

Alkioiden pakastuksessa käytetään niin kutsuttuja kylmänsuoja-aineita, joiden tarkoitus on suojata alkioita pakastuksen yhteydessä. Monet yleisesti käytetyt kylmänsuoja-aineet ovat eläinperäisiä ja siten mahdollisia tartunnan lähteitä (Wrathall 1995, Van Soom & Nauwynck 2008, Thibier 2010). Tuoreena käytettävät *in-vivo*-alkiot voidaan säilöä siirtoa varten fosfaatti puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS), joka ei sisällä eläinperäisiä ainesosia. Kasvualustoina *in-vitro*-alkiontuotannossa käytetään useimmiten joko seerumia, naudan seerumi albumiinia (BSA) tai somaattisia soluja, jotka mahdollisesti sisältävät taudinaiheuttajia ja toimivat siten potentiaalisina tartunnan lähteinä alkioille. Somaattisten solujen käyttöä pyritään nykyään välttämään (Van Soom & Nauwynck 2008).

Välineet, joita käytetään alkioiden huuhteluun, käsittelyyn, pakastamiseen ja sulattamiseen, voivat olla kontaminoituneita ja siten toimia tartunnan lähteenä (Wrathall 1995). Useimmat tartunnalliset patogeenit selviävät hyvin kylmässä, eivätkä siten tuhoudu nestetyössä. Nestetyössä säilytettävät alkiot altistuvat mahdollisille tyypisäiliössä majoileville patogeeneille (Bielanski 2007, Van Soom & Nauwynck 2008). Alkioiden säilyttämisen suljetuissa oljissa on kuitenkin todettu estävän tehokkaasti niiden altistumisen työssä oleville patogeeneille (Van Soom & Nauwynck 2008, Thibier 2010). Yhtenä huolenaiheena on ollut kylmänsuoja-aineiden vaikutus alkion tärkeimpään suojamekanismiin, zona pellucidaan. Yleisimmin käytettyjen kylmänsuoja-aineiden ei ole kuitenkaan todettu aiheuttavan BVD-viruksen passiivista siirtymistä zona pellucidan läpi (Van Soom & Nauwynck 2008).

2.7.4 Vastaanottaja

Alkiovasikan terveyteen vaikuttaa suuresti alkion vastaanottajan terveydentila. Erityisen riskin alkioista kehittyvälle sikiölle aiheuttavat patogeenit, jotka kykenevät siirtymään istukan läpi sikiöön. Tällaisia patogeeneja ovat muun muassa BVD-virus, *Neospora caninum* ja *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. Vastaanottajat tulisikin testata ennen siirtoa tautien poissulkemiseksi (Givens & Marley 2008).

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

3.1 Aineiston kuvaus

Aineisto on peräisin Faba Osuuskunnalta. Aineisto koostui 39 235 alkionsiirtotapahtuman tiedoista. Alkionsiirrot oli tehty 23.10.1990 – 8.12.2012. Alkionsiirtoja tehtiin vielä 1990-luvulla melko vähän. Ne alkoivat kuitenkin yleistyä 1990-luvun lopulla. Vuonna 2011 alkionsiirtoja tehtiin yli kolminkertaisesti vuoteen 2000 verrattuna (kuva 1).

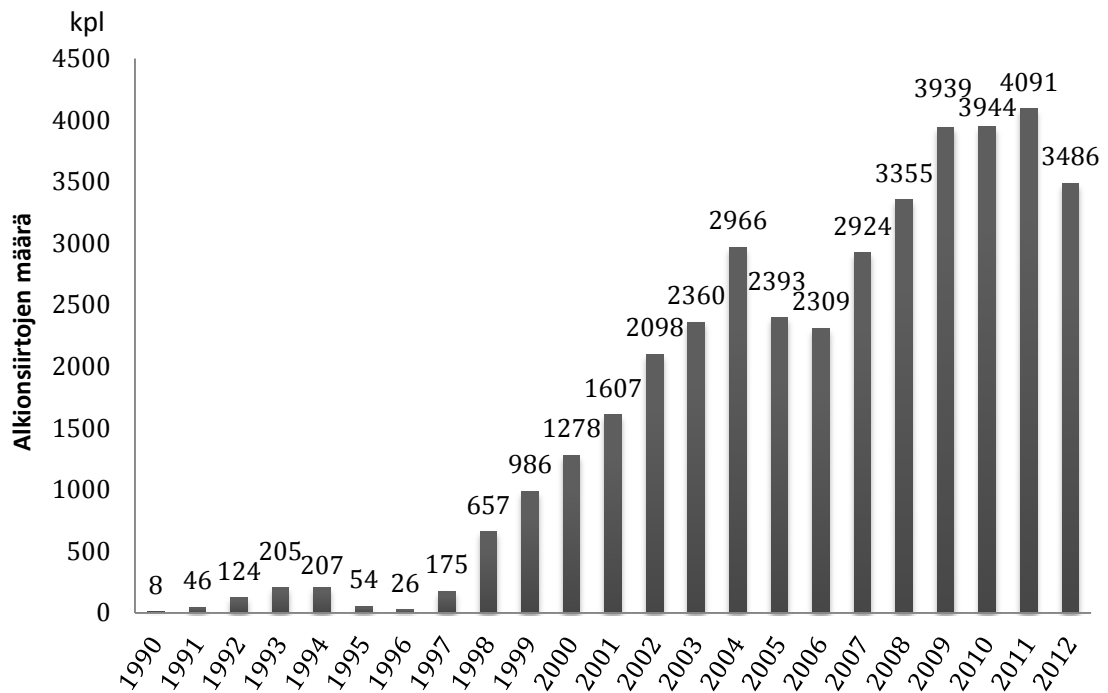
Alkionsiirron yhteydessä kerätyt tiedot olivat seuraavat: vastaanottajan rotu, poikimakerta, kiiman laatu (luonnollinen vai synkronoitu), vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna, oliko alkio tuore- vai pakastealkio, laatuluokka, alkion kehitysaste, epiduraalipuudutuksen käyttö siirron yhteydessä, siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta. Aineistoon oli kirjattu myös tieto eläimen tiinehtymisestä. Vastaanottaja on aineistossa luokiteltu tiineeksi, jos sille ei ollut kirjautunut tietoa kiiman uusimisesta. Sama eläin saattoi esiintyä aineistossa useamman kerran vastaanottajana, mikäli sille oli tehty useampia alkionsiirtoja.

3.1.1 Aineistossa esiintyneet rodut

Suurin osa alkionsiirroista tehtiin joko ayrshire- tai holstein-rotuisille eläimille (taulukko 3). Aineistossa esiintyi myös 13 muuta rotua.

3.1.2 Poikimakerta

Vastaanottajista 57,5 % oli hiehoja. Niissä alkionsiirroissa, joissa vastaanottajana oli lehmä, oli suurimmalla osalla kyseessä ensimmäinen tai toinen poikimakerta (taulukko 4).



Kuva 1. Alkionsiirtojen lukumäärä Suomessa vuosina 1990–2012.

Taulukko 3. Suomessa vuosina 1990–2012 tehtyjen alkionsiirtojen vastaanottajien rotut. N = 39235.

Rotu	Lukumäärä	Prosenttiosuus kaikista
Ayrshire	25424	64,8
Holstein	12036	30,7
Charolais	344	0,9
Aberdeen agnus	299	0,8
Länsisuomenkarja	285	0,7
Hereford	235	0,6
Limousin	216	0,6
Simmental	151	0,4
Pohjoissuomenkarja	81	0,2
Itäsuomenkarja	72	0,2
Blonde d'Aquitane	63	0,2
Jersey	13	<0,1
Piemontese	14	<0,1
Highland cattle	3	<0,1
Brown Swiss	2	<0,1
Ei tietoa	7	<0,1

3.1.3 Kiiman laatu

Tietoa kiiman laadusta ei ollut kirjattu 22,9 %:ssa tapauksista. Alkion vastaanottajat jaoteltiin kiiman laadun suhteen kahteen ryhmään: vastaanottajat, joiden kiima oli synkronoitu, ja vastaanottajat, joiden kiima oli luonnollinen. Suurimmalle osalle eläimistä alkionsiirto tehtiin luonnolliseen kiimaan (74,6 %). Kiimansynkronointia käytettiin 25,4 %:ssa alkionsiirroista. Tieto kiiman laadusta tuorealkioiden osalta oli kirjattu 65,3 %:ssa siirroista. Näistä 68,3 %:ssa alkio oli siirretty synkronoituun kiimaan ja 31,7 %:ssa luonnolliseen kiimaan. Pakastealkioiden osalta tieto kiimaan laadusta oli kirjattu 83,2 %:ssa siirroista. Näistä suurin osa (91,9 %) siirrettiin luonnolliseen kiimaan. Vain 8,1 %:lla pakastealkion saaneista käytettiin kiiman synkronointia.

Taulukko 4. Suomessa vuosina 1990–2012 tehtyjen alkionsiirtojen vastaanottajien poikimakerrat. N = 39235.

Poikimakerta	Lukumäärä	Prosenttiosuus kaikista
0	22549	57,5
1	6844	17,4
2	4987	12,7
3	2668	6,8
4	1298	3,3
5	529	1,3
6	196	0,5
7	87	0,2
8	39	0,1
9	20	0,1
10	6	<0,1
11	5	<0,1
12	4	<0,1
13	2	<0,1
14	1	<0,1

3.1.4 Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna

Alkionsiirrossa alkion kehitysvaihe vastaa seitsemän päivän ikää. Kun alkio siirretään vastaanottajaan, joka on ollut kiimassa viikko sitten, alkion ikä vastaa vastaanottajan kiimakierron vaihetta. Aineistossa vastaanottajan kiimakierron vaiheen ja alkion iän välillä oleva ero on suurimmillaan kolme vuorokautta. Suurimmassa osassa alkionsiirroista vastaanottajan kiimakierron vaihe vastasi alkion ikää (70,3 %). Tietoa vastaanottajan kiimapäivästä ei ollut kirjattu 21,7 %:ssa tapauksista (taulukko 5).

Taulukko 5. Suomessa vuosina 1990–2012 tehtyjen alkionsiirtojen vastaanottajien kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna. N = 39235.

Vastaanottajan kiimakierron vaihe	Lukumäärä	Prosenttiosuus kaikista	Prosenttiosuus tunnetuista
Vastaanottaja 3vrk edellä alkion ikää	18	<0,1	<0,1
Vastaanottaja 2 vrk edellä alkion ikää	31	0,1	0,1
Vastaanottaja 1 vrk edellä alkion ikää	902	2,3	2,9
Vastaanottaja samassa vaiheessa	27571	70,3	89,7
Vastaanottaja 1 vrk jäljessä alkion ikää	2116	5,4	6,9
Vastaanottaja 2 vrk jäljessä alkion ikää	74	0,2	0,2
Vastaanottaja 3 vrk jäljessä alkion ikää	8	<0,1	<0,1
Ei tietoa	8515	21,7	

3.1.5 Alkio tuore vai pakaste

Siirrettävät alkiot olivat joko tuoreita tai pakastettuja. Pakastettuja alkioita käytettiin 66 %:ssa alkionsiirroista. Tieto siitä, oliko alkio tuore vai pakastettu, oli kirjattu ylös jokaisen alkionsiirtotapahtuman yhteydessä.

3.1.6 Alkion laatuluokka

Alkiot oli jaettu neljään laatuluokkaan. Laatuluokat oli määritelty seuraavasti: 1 = erinomainen tai hyvä, 2 = kohtalainen, 3 = keho, 4 = kuollut tai degeneroitunut. Alkion laatuluokka oli arvioitu 83 %:ssa alkionsiirtotapahtumista. Suurin osa siirretyistä alkioista oli arvioitu luokkaan 1, erinomainen tai hyvä (82,8 %) (taulukko 6).

3.1.7 Alkion kehitysaste

Siirrettävän alkion kehitysaste oli määritetty IETS:n määritelmien mukaisesti (Mapletoft 2006). Suurin osa siirrettävistä alkioista oli kehitysasteeltaan moruloita, aikaisia blastokystia tai blastokystia (yhteensä 71,9 % siirretyistä alkioista) (taulukko 7).

Taulukko 6. Suomessa vuosina 1990–2012 siirrettyjen alkioiden laatuluokka. N = 32475.

Alkion laatuluokka	Lukumäärä	Prosenttiosuus kaikista
1	26902	82,8
2	4120	12,7
3	1440	4,4
4	13	<0,1
Yhteensä	32475	100,0

3.1.8 Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä

Epiduraalipuudutusta käytettiin 42 %:ssa alkionsiirroista. Epiduraalipuudutus toteutettiin pääasiassa lidokaiinilla, vain 23 alkionsiirroissa (0,1 %) käytettiin muuta puudutetta. Tätä ei ollut tarkemmin määritelty aineistossa. Suurimmassa osassa alkionsiirroista ei käytetty lainkaan puudutusta (54,6 %). Tietoa siitä, käytettiinkö puudutetta, ei ollut kirjattu 1301 tapauksessa (3,3 %). Epiduraalipuudutuksen käyttö vuosittain Suomessa 1998–2012 tehdyissä alkionsiirroissa on esitetty kuvassa 2. Ennen vuotta 1998 alkionsiirrot tehtiin epiduraalipuudutuksessa, mutta tietoa ei ole kerätty aineistoon, koska puudutuksen suoritti eläinlääkäri. Vuonna 1998 käytäntö muuttui siten, että alkionsiirtäjä sai suorittaa puudutuksen itse. Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirtäjän toimesta yleistyi vuoden 1998 jälkeen. Eniten epiduraalipuudutuksia tehtiin vuonna 2004, jonka jälkeen sen käyttö väheni. Epiduraalipuudutuksen käyttö hiehoilla oli yleisempää kuin lehmillä. Hiehoista epiduraalipuudutuksen sai 46,9 %, lehmistä 39,1 %.

Epiduraalipuudutuksen käytön jakautuminen käytettäessä tuore- tai pakastealkioita on esitetty kuvassa 3. Tuorealkioita käytettäessä yli puolet siirroista (58,4 %) suoritettiin epiduraalipuudutuksessa, kun pakastealkioilla suurin osa suoritettiin ilman puudutusta (64,0 %).

Taulukko 7. Suomessa vuosina 1990–2012 siirrettyjen alkioiden kehitysaste. N = 39235.

Alkion kehitysaste	Lukumäärä	Prosenttiosuus kaikista	Prosenttiosuus tunnetuista
1	3	<0,1	<0,1
2	3	<0,1	<0,1
3	70	0,2	0,2
4	9646	24,6	31,5
5	7901	20,1	25,8
6	10269	26,2	33,6
7	2394	6,1	7,8
8	253	0,6	0,8
9	40	0,1	0,1
Ei tietoa	8656	22,1	

1 = 1-soluvaihe, 1 vrk hedelmöityksestä

2 = 2–16-soluvaihe, 3–5 vrk hedelmöityksestä

3 = aikainen morula, 5–6 vrk hedelmöityksestä

4 = morula, 6 vrk hedelmöityksestä

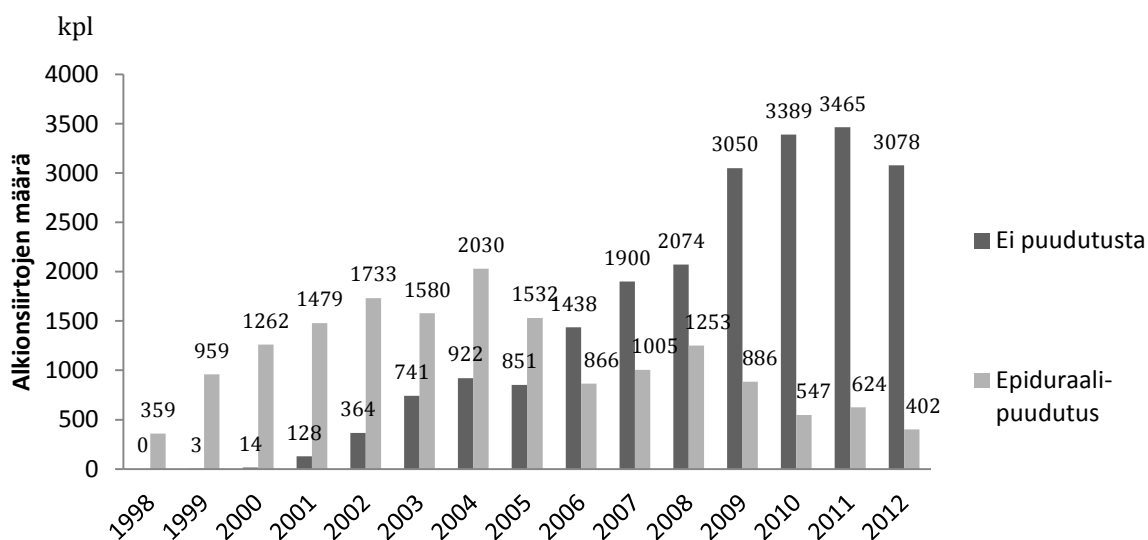
5 = aikainen blastokysti, 7 vrk hedelmöityksestä

6 = blastokysti, 7–8 vrk hedelmöityksestä

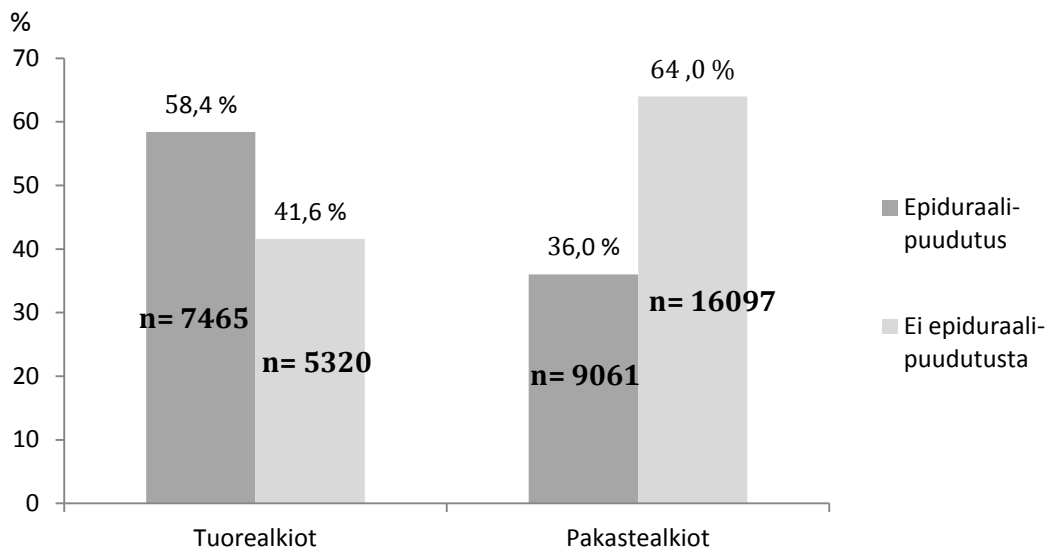
7 = laajentunut blastokysti, 8–9 vrk hedelmöityksestä

8 = kuoriutunut blastokysti, 9 vrk hedelmöityksestä

9 = laajentunut ja kuoriutunut blastokysti, 9–10 vrk hedelmöityksestä.



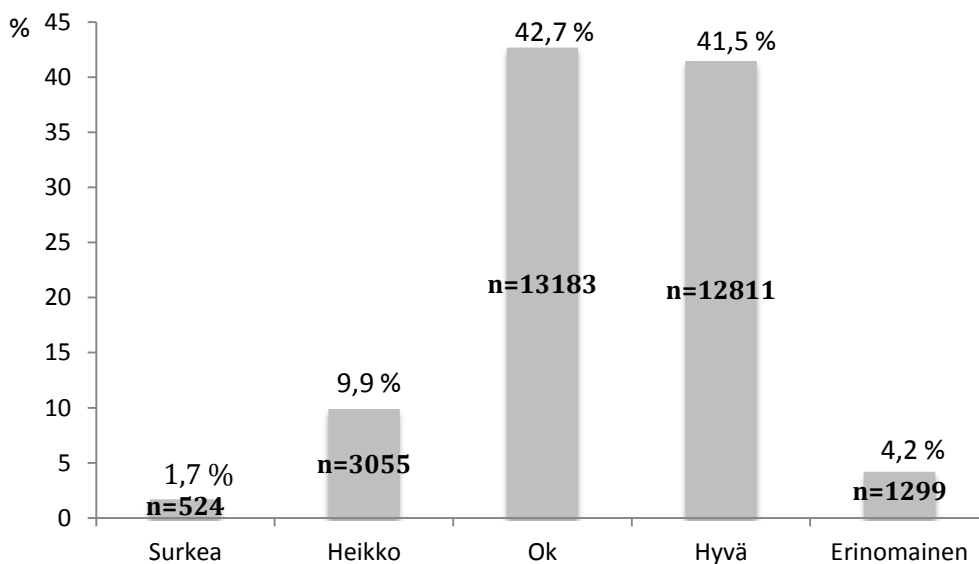
Kuva 2. Epiduraalipuudutuksen käyttö Suomessa vuosina 1998–2012 tehdyissä alkionsirroissa. N = 37736.



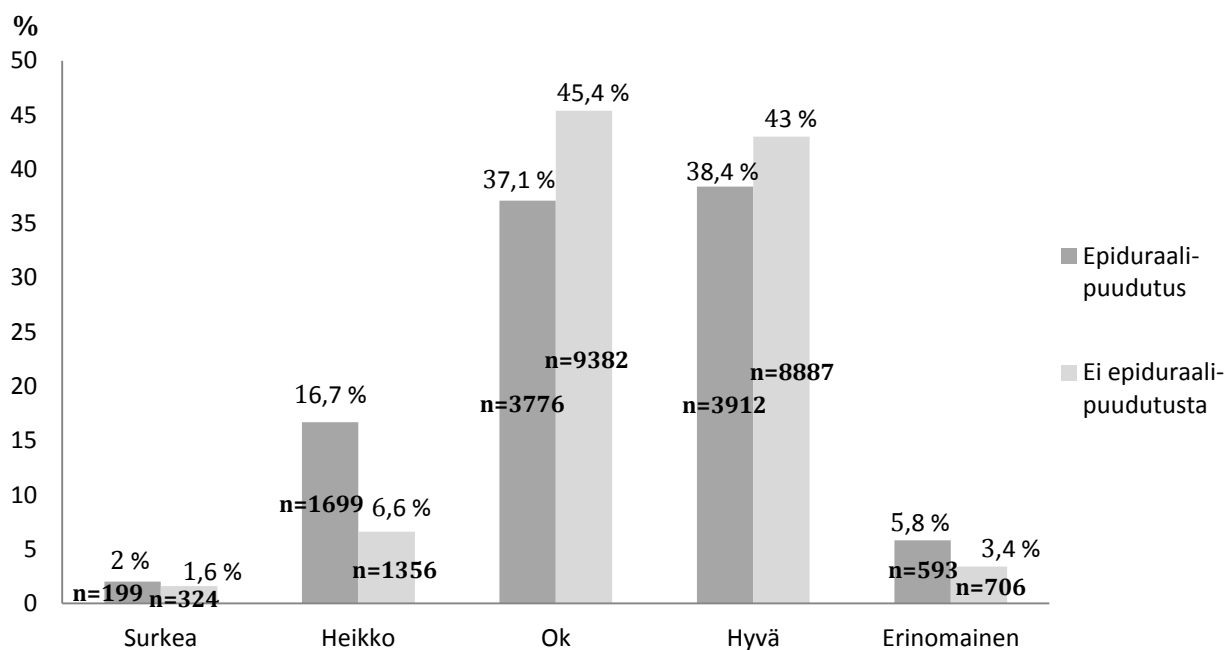
Kuva 3. Epiduraalipuudutuksen käytön jakautuminen käytettäessä tuore- tai pakastealkioita Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsiirroissa. N = 37943.

3.1.9 Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta

Alkionsiirron yhteydessä siirtäjä oli arvioinut alkionsiirron onnistumisen surkeasta erinomaiseen viisiportaisella asteikolla. Arvio alkionsiirron onnistumisesta oli kirjattu 30872 alkionsiirron yhteydessä. Suurin osa alkionsiirroista oli saanut joko arvion ok tai hyvä (kuva 4). Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta, kun siirron yhteydessä käytettiin tai ei käytetty epiduraalipuudutusta, on esitetty kuvassa 5. Suurempi osa siirroista arvioitiin onnistuneen arviolla ok tai hyvä, kun epiduraalipuudutusta ei käytetty. Kuitenkin hieman suurempi osa alkionsiirroista arvioitiin onnistuneen erinomaisesti, kun epiduraalipuudutusta käytettiin.



Kuva 4. Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsiirroissa. N = 30872.



Kuva 5. Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta epiduraalipuudutuksen kanssa tai ilman epiduraalipuudutusta Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsiirroissa. N = 30834.

3.2 Tilastolliset menetelmät

Tilastollisessa analyysissä käytettiin SPSS-statistiikkaohjelmaa, versiota 20,0. Tilastollinen analyysi suoritettiin käyttämällä Khiin neliötestiä. Vastemuuttujaksi valittiin tiinehtyminen alkionsiirron jälkeen (kyllä tai ei) ja selittäviksi muuttujiksi epiduraalipuudutuksen käyttö, alkion laatuluokka, alkion kehitysaste, tuore- vai pakastealkio, siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta, vastaanottajan rotu, kiiman laatu (luonnollinen vai synkronoitu), kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna ja vastaanottajan poikimakerta (hieho vai lehmä). Tuorealkioiden kehitysasteen luokat 2 ja 3 yhdistettiin, sillä luokassa 2 oli liian vähän tapahtumia, jotta ristiintaulukointia olisi voitu analysoida. Samoin pakastealkioiden kehitysasteen luokat 1 ja 3 sekä 8 ja 9 yhdistettiin, sillä luokissa 1 ja 9 oli liian vähän tapahtumia. Mahdolliset erot katsottiin tilastollisesti merkitseviksi, kun $p < 0,05$.

4 TULOKSET

4.1 Tiinehtyvyys alkionsiirron jälkeen

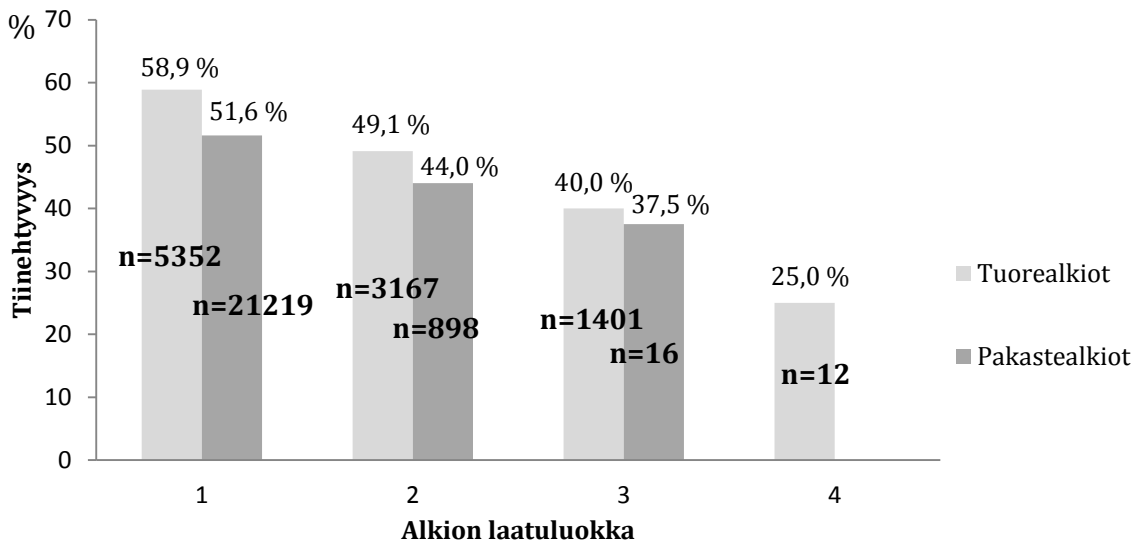
Hieman yli puolet (52,1 %) kaikista Suomessa vuosina 1990–2012 naudoille tehdyistä alkionsirroista johti tiinehtymiseen (N = 39235). Tietoa tiinehtymisestä ei ollut kirjattu 496 tapauksessa (1,2 %). Kun alkionsiirto tehtiin tuorealkioilla, tiinehtyvyys oli 55,2 %. Pakastealkioilla tiinehtyi 51,5 % vastaanottajista. Ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$).

4.2 Epiduraalipuudutuksen vaikutus tiinehtyvyyteen

Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä paransi tiinehtyvyyttä. Epiduraalipuudutuksen saaneista vastaanottajista tiinehtyi 53,1 %. Vastaanottajista, joilla epiduraalipuudutusta ei käytetty, tiinehtyi 51,5 %. Ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p = 0,003$).

4.3 Alkion laatuluokan vaikutus tiinehtyvyyteen

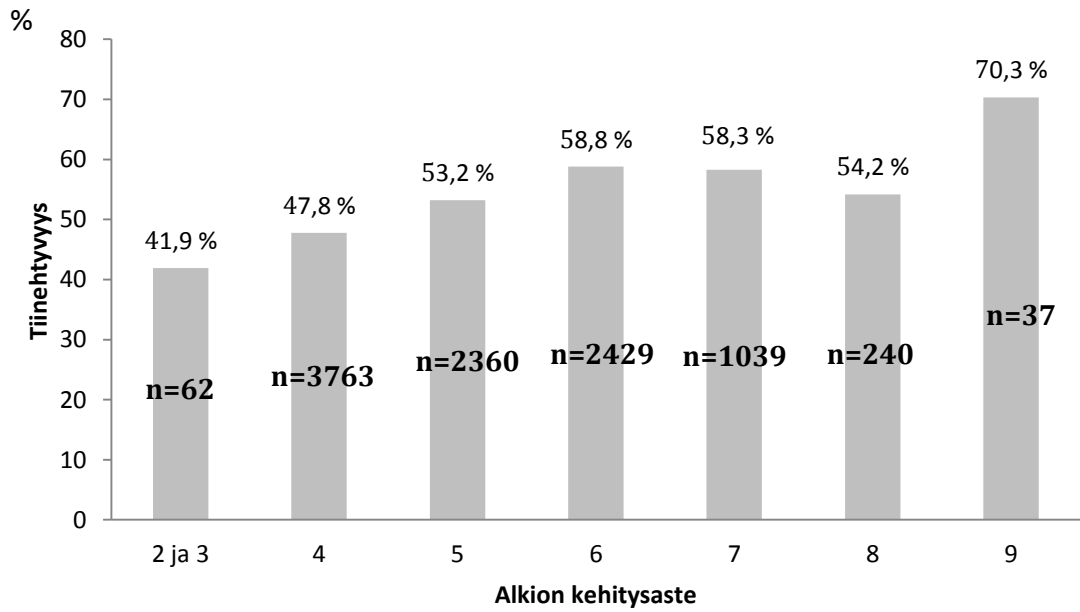
Alkion laatuluokan vaikutus tiinehtyvyyteen tuorealkioilla on esitetty kuvassa 6 ja pakastealkioilla kuvassa 7. Laatuluokka vaikutti merkitsevästi tiinehtyvyyteen sekä tuore- että pakastealkioilla ($p < 0,001$). Tiinehtymisprosentti oli sekä tuore- että pakastealkioilla sitä suurempi mitä parempilaatuinen alkio siirrettiin. Laadultaan erinomaisilla tai hyvillä alkioilla päästiin parhaimpaan, 53,1 %:n tiinehtyvyyteen, pakastealkioilla 51,6 %:n tiinehtyvyyteen. Pakastealkioilla tehdyissä siirroissa ei esiintynyt lainkaan huonoimman laatuluokan alkioita.



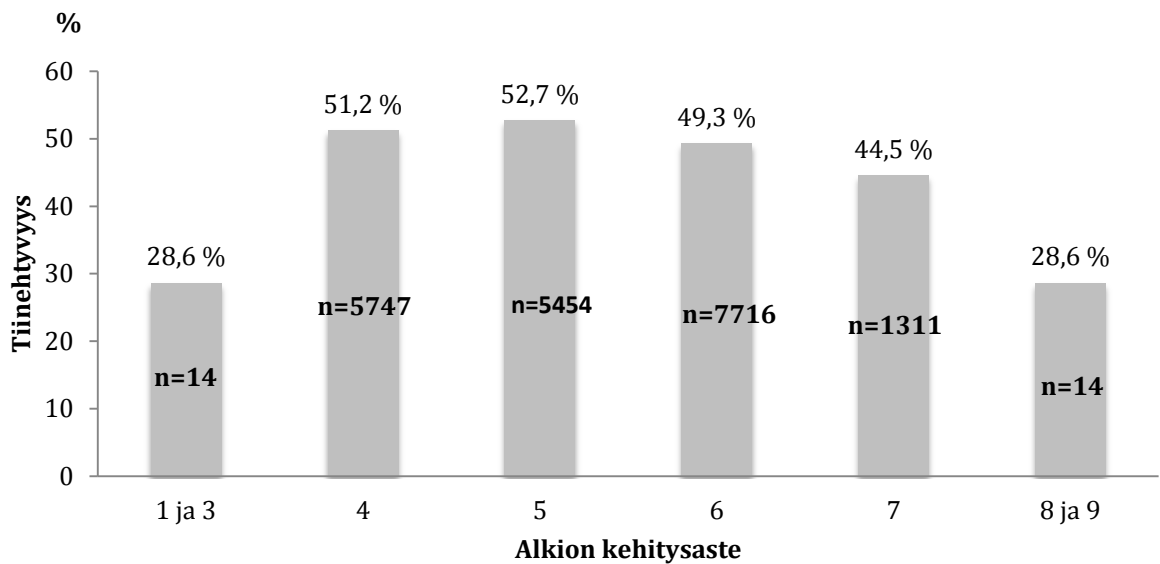
Kuva 6. Alkion laatuluokan vaikutus tiinehtymiseen tuore- ja pakastealkioilla Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsirroissa. N = 32 065.

4.4 Alkion kehitysasteen vaikutus tiinehtyvyyteen

Alkion kehitysasteen vaikutus tiinehtyvyyteen tuorealkioilla on esitetty kuvassa 8 ja pakastealkioilla kuvassa 9. Alkion kehitysaste vaikutti tiinehtyvyyteen merkitsevästi sekä tuore- että pakastealkioilla ($p < 0,001$). Tuorealkioilla kehitysasteeltaan luokan 9 alkioilla (laajentunut ja kuoriutunut blastokysti) saavutettiin korkea (70,3 %) tiinehtyvyys, mutta tulokseen tulee suhtautua varauksella tapahtumien vähäisen määrän vuoksi. Toiseksi paras tiinehtyvyys tuorealkioilla saavutettiin luokan 6 alkioilla (blastokysti). Huonointa tiinehtyvyys tuoreilla oli alkioilla, jotka olivat kehitysvaiheeltaan luokissa 2 ja 3 (2-16 soluvaihe ja aikainen morula). Pakastealkioilla paras tiinehtyvyys (52,7 %) saavutettiin luokan 5 (aikainen blastokysti) alkioilla. Huonointa tiinehtyvyys pakastealkioilla oli luokan 1 ja 3 alkioilla sekä luokan 8 ja 9 alkioilla (kuoriutunut blastokysti, laajentunut ja kuoriutunut blastokysti). Kaikki luokan 1 (1-2 soluvaihe) alkioita olivat pakastealkioita, kun taas luokan 2 (2-16 soluvaihe) alkioita olivat tuorealkioita.



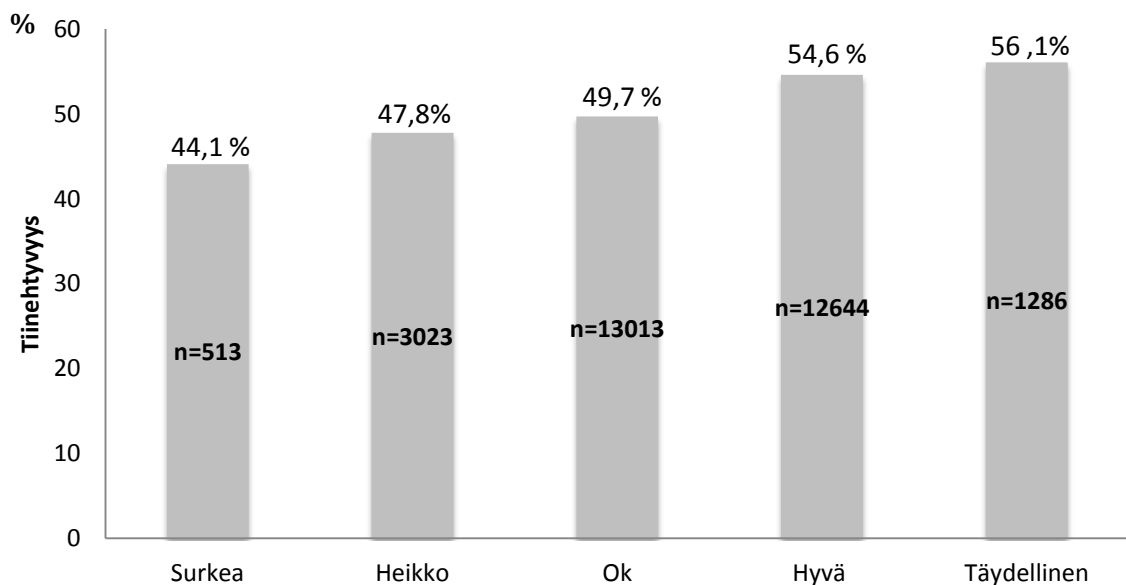
Kuva 8. Kehitysasteen vaikutus tiinehtyvyyteen tuorealkioilla Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsirroissa. N = 9930.



Kuva 9. Kehitysasteen vaikutus tiinehtyvyyteen pakastealkioilla Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsirroissa. N = 20256.

4.5 Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen

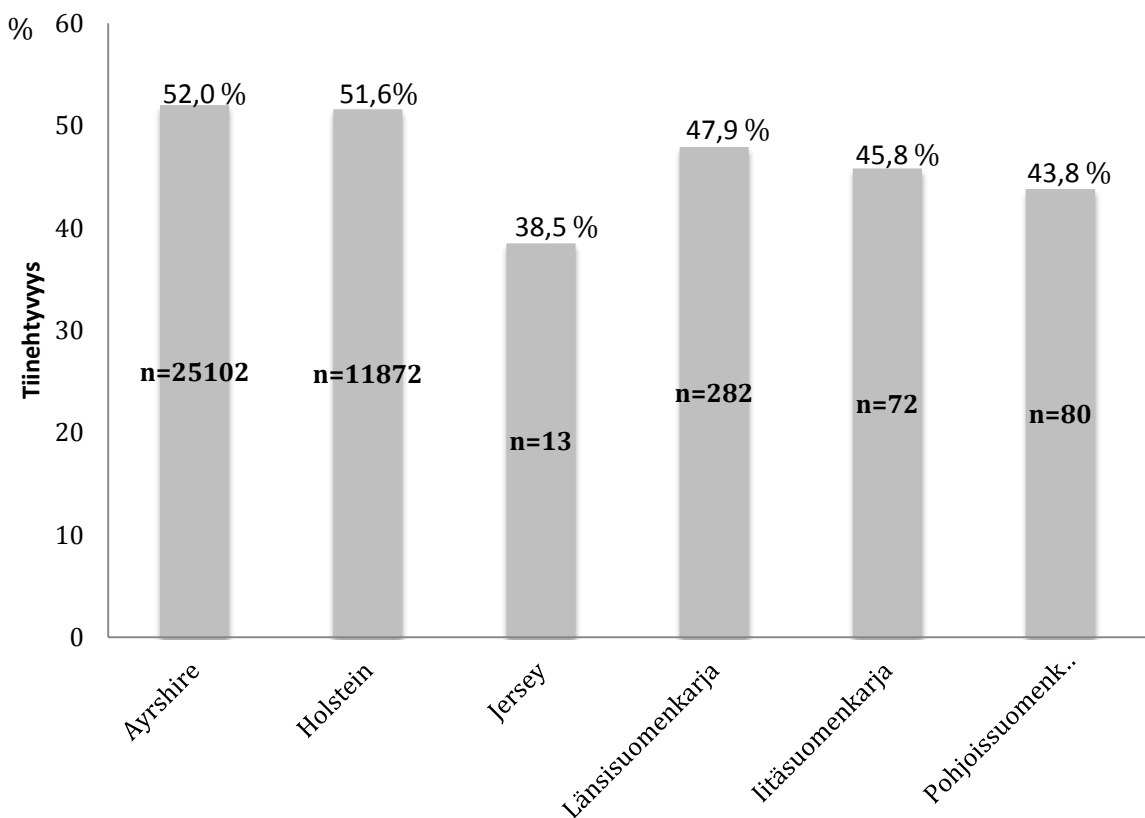
Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen on esitetty kuvassa 10. Se, millaiseksi siirtäjä oli arvioinut alkionsiirron onnistumisen, vaikutti merkitsevästi tiinehtyvyyteen ($p < 0,001$). Mitä parempana siirtäjä piti siirron onnistumista, sitä suurempi oli tiinehtymisprosentti. Siirtäjän arvioidessa siirron sujuneen täydellisesti vastaanottajista tiinehtyi 56,1 %. Kun siirto arvioitiin onnistuneen surkeasti, tiinehtyi vain 44,1 %.



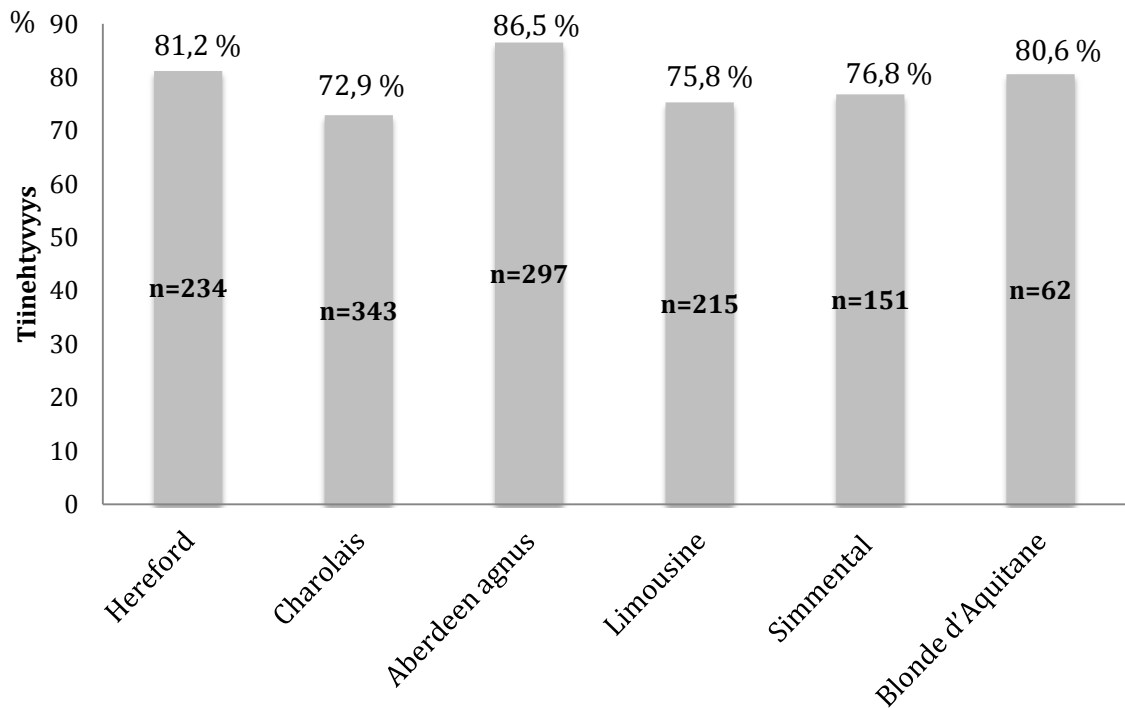
Kuva 10. Siirtäjän arvio alkionsiirron onnistumisesta ja sen vaikutus tiinehtymiseen Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsiirroissa. $N = 30479$.

4.6 Vastaanottajan rodun vaikutus tiinehtyvyyteen

Vastaanottajan rodun vaikutus tiinehtyvyyteen on esitetty kuvissa 11 ja 12. Tiinehtyminen oli merkitsevästi parempaa liharotuisilla kuin lypsyrotuisilla vastaanottajilla ($p < 0,001$). Liharotuisien tiinehtyvyys oli 78,6 %, kun lypsyrotuisien oli 51,8 % ($N = 38728$). Liharotuisien tiinehtyvyyteen on kuitenkin suhtauduttava varauksella (ks. pohdinta). Lypsyrotuisista parhaiten tiinehtyivät ayrshire- (52,0 %) ja holstein-rotuiset (51,6 %) vastaanottajat, huonoiten jersey-rotuiset vastaanottajat (38,5 %) (kuva 6). Liharotuisista aberdeen agnus -rotuiset tiinehtyivät parhaiten (86,5 %) (kuva 7). Rotujen piemontes, brown swiss ja highland cattle vaikutusta tiinehtyvyyteen ei tutkittu, koska kyseisten rotujen määrä aineistossa oli liian pieni ($n < 5$).



Kuva 11. Lypsyrotuisien vastaanottajien tiinehtyvyys alkionsiirrosta Suomessa vuosina 1990–2012. $N = 37376$.



Kuva 12. Liharotuisten vastaanottajien tiinehtyvyys alkionsiirron yhteydessä. N = 1302.

4.7 Tiinehtyvyys kiiman ollessa luonnollinen tai synkronoitu

Vastaanottajat, joiden kiima oli synkronoitu, tiinehtyivät paremmin kuin ne, joilla siirto tehtiin luonnollisen kiiman jälkeen. Synkronoiduista vastaanottajista tiinehtyi 54,0 %. Luonnollisen kiiman jälkeen tehdyistä siirroista 50,8 % johti tiinehtymiseen. Ero oli tilastollisesti merkitsevä ($p < 0,001$) (N = 29887). Tuorealkioilla tiinehtyminen oli merkitsevästi parempaa, jos kiima oli synkronoitu (54,9 %) kuin, jos siirto tapahtui luonnolliseen kiimaan (48,3 %) ($p < 0,001$) (N = 8619). Kiiman laatu ei vaikuttanut merkitsevästi tiinehtyvyyteen käytettäessä pakastealkioita ($p = 0,097$) (N = 21268)

4.8 Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen

Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen on esitetty taulukossa 8. Vastaanottajan kiimakierron vaiheella alkion ikään verrattuna oli vaikutusta tiinehtyvyyteen ($p = 0,002$). Mitä paremmin vastaanottajan kiimakierron vaihe vastasi alkion ikää, sitä parempi oli tiinehtyvyys. Kun vastaanottajan kiimakierto oli samassa vaiheessa kuin alkio, tiinehtyvyys oli 52,1 %. Vastaanottajia, jotka olivat kolme päivää jäljessä alkion ikää, oli aineistossa liian vähän ($n = 8$), jotta kiimapäivän vaikutusta tiinehtyvyyteen olisi voitu tutkia.

Taulukko 8. Vastaanottajan kiimakierron vaihe alkion ikään verrattuna ja sen vaikutus tiinehtyvyyteen Suomessa vuosina 1990–2012 tehdyissä alkionsirroissa. $N = 30329$.

Kiimakierron vaihe suhteessa alkion ikään	Lukumäärä	Tiinehtyvyys, %
Vastaanottaja 3 päivää edellä alkion ikää	17	35,3
Vastaanottaja 2 päivää edellä alkion ikää	30	40,0
Vastaanottaja 1 päivän edellä alkion ikää	884	46,9
Vastaanottaja samassa vaiheessa	27228	52,1
Vastaanottaja 1 päivän jäljessä alkion ikää	2090	48,8
Vastaanottaja 2 päivää jäljessä alkion ikää	72	47,2
Vastaanottaja 3 päivää jäljessä alkion ikää	8	62,5

4.9 Poikimakerran vaikutus tiinehtyvyyteen

Vastaanottajien poikimakerran vaikutusta tiinehtyvyyteen tarkasteltiin vain hiehojen ja lehmien välillä. Hieho-vastaanottajien tiinehtyvyys oli 53,2 %, lehmien 52,1 %. Jos kyseessä oli yhden tai useamman kerran poikanut lehmä, tiinehtyvyys oli 52,1 %. Ero tiinehtyvyydessä oli pieni, 1,1 prosenttiyksikköä, mutta kuitenkin merkitsevä ($p = 0,032$) ($N=38739$). Käytettäessä tuorealkioita hiehojen tiinehtyvyys (57,6 %) oli merkitsevästi lehmiä parempi (52,3 %) ($p < 0,001$) ($N = 13\,198$). Pakastealkioita käytettäessä tiinehtyvyydessä ei todettu merkitsevää eroa hiehojen ja lehmien välillä ($p = 0,117$)

5 POHDINTA

Tässä tutkimuksessa hieman yli puolet (52,1 %) alkionsirroista johti tiinehtymiseen. Pakastealkioilla tiinehtyvyys oli hieman huonompaa kuin tuorealkioilla. Myös aikaisemmissa tutkimuksissa on päästy vastaaviin tuloksiin (Hasler 2001, Wallace ym. 2011). Myös edellisiä merkittävästi parempia tiinehtyvyytuloksia on raportoitu. Spell ym. (2001) pääsivät tuorealkioilla 83 %:n ja pakastealkioilla 69 %:n tiinehtyvyyteen.

Epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä on vähentynyt Suomessa merkittävästi viimeisen kymmenen vuoden aikana. Tutkimukseemme epiduraalipuudutuksen käyttö alkionsiirron yhteydessä paransi tiinehtyvyyttä 1,6 prosenttiyksikköä. Ero tiinehtyvyydessä oli pieni, eikä siitä voida tehdä pitkälle meneviä johtopäätöksiä epiduraalipuudutuksen tiinehtyvyyttä tukevasta vaikutuksesta. Käsityksemme mukaan aikaisempia tutkimuksia epiduraalipuudutuksen vaikutuksesta ei ole julkaistu. Epiduraalipuudutuksen antaminen ei kuitenkaan parantanut siirtäjän arviota alkionsiirron onnistumisesta. Tätä voidaan pitää hieman yllättävänä, sillä epiduraalipuudutuksen tarkoitus on helpottaa toimenpidettä. Epiduraalipuudutuksen antamiseen voi liittyä myös riskejä, jos se suoritetaan epähygieenisesti tai osaamattomasti. Se vie myös aikaa ja siten pitkittää toimenpidettä.

Tässä tutkimuksessa alkioiden laatu vaikutti erittäin merkittävästi tiinehtyvyyteen sekä tuore- että pakastealkioilla. Mitä parempilaatuinen alkio oli, sitä parempi oli tiinehtyvyys. Tämä vastaa aikaisempien tutkimusten tuloksia (Lindner ja Wright 1983, Mapletoft 1986, Hasler 1987, Benyei 2006, Looney 2006, Chepel ym. 2008). Laatuluokaltaan kohtalaisilla alkioilla päästiin jopa 49,1 % tiinehtyvyyteen. Lindner ja Wright (1983) pääsivät kohtalaisilla alkioilla kuitenkin ainoastaan 27 %:n tiinehtyvyyteen. Tämän tutkimuksen perusteella voisi siis sanoa, että laadultaan kohtalaisia alkioita kannattaa käyttää. Myös Hanekamp (1999) tukee tätä väitettä, sillä hän ei havainnut merkittävää eroa tiinehtyvyydessä laadultaan hyvien ja kohtalaisten alkioiden käytöllä. Mapletoftin (2006) mukaan kohtalaisia alkioita tulisi kuitenkin käyttää ainoastaan tuoresiirtoihin.

Mitä paremmin vastaanottajan kiimakierron vaihe vastaa alkion ikää, sitä parempi oli tiinehtyvyys. Näin havaitsivat myös Spell ym. (2001). Paras tiinehtyvyys tässä tutkimuksessa saavutettiin, kun vastaanottaja oli samassa vaiheessa kuin alkio. Käytännössä kuitenkin siirtoja suoritetaan, vaikka synkroniassa olisin muutaman päivän heitto. Spellin ym. (2001) mukaan synkroniassa voidaan sallia 24 tunnin heitto, ilman tiinehtyvyyden merkittävää huononemista.

Vastaanottajiksi suositellaan yleensä valitsemaan hiehoja. Hiehojen parempi tiinehtyvyys lehmiin verrattuna on osoitettu useassa tutkimuksessa (Hasler 2005, Stroud ja Hasler 2006, Dochi ym 1998). Myös tässä tutkimuksessa hiehot tiinehtyivät paremmin, vaikka ero lehmiin ei ollutkaan suuri. On kuitenkin olemassa myös ristiriitaisia tuloksia hiehojen paremmuudesta. Benyei ym. (2006) eivät havainneet eroa tiinehtyvyydessä lehmien ja hiehojen välillä, kuten ei myöskään Looney ym (2006) ja Stroud ja Hasler (2006).

Liharotuisten tiinehtyvyys oli huomattavasti lypsyrotuisia parempi. Liharotuisten suureen tiinehtymisprosenttiin (78,6 %) tulee kuitenkin suhtautua varauksella Emolehmätiloilla kiiman uusimistiedon välittyminen aineistoon on selvästi epävarmempaa kuin lypsykarjatiljoilla. Emolehmätiloilla käytetään paljon luonnollista astutusta, jolloin uusimistieto ei kirjaudu aineistoon. Toisaalta, jos kiima on uusintu siemennys- ja alkionsiirtokauden jälkeen, tyhjäksi jääneitä eläimiä ei välttämättä ole enää siemennetty. Näin ollen liha- ja maitorotuisten tiinehtyvyyden vertaaminen keskenään voi olla harhaanjohtavaa.

Tiinehtymistä alkionsiirron jälkeen on pyritty parantamaan erilaisin keinoin. On olemassa näyttöä siitä, että osa vastaanottajista hyötyisi eksogeenisestä progesteronilisästä, mutta asia kaipaava lisää tutkimusta. Myös muiden hormonilisien, kuten GnRH:n ja hCG:n, vaikutuksesta olisi mielenkiintoista saada lisää tutkimustuloksia.

6 LÄHTEET

Aké-López R, Segura-Correa JC, Quintal-Franco J. Effect of flunixin meglumine on the corpus luteum and possible prevention of embryonic loss in Pelibuey ewes. *Small Ruminant Res* 2005, 59: 83–87.

Alarcón MA, Galina CS, Corro MD, Asprón MA. Embryo transfer, a useful technique to be applied in small community farms. *Trop Anim Health Prod* 2010, 42: 1135–1141

Allcock JG, Peters AR. Pharmacological manipulation of reproduction. Teoksessa: Andrews AH (toim.) *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Toinen painos p. Blackwell Science Ltd, Oxford UK 2004. S. 678–688.

Ambrose JD. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 1999, 82: 2369–2376

Baruselli PS, Ferreira RM, Filho MFS, Nasser LFT, Rodrigues CA, Bó GA. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev* 2010, 22: 67–74.

Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 2011, 76: 1583–1593.

Beltman ME, Lonergan P, Diskin MG, Roche JF, Crowe MA. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology* 2009, 71: 1173–1179.

Beltman ME, Self I, Duane, M. The use of epidurals in cattle. *Irish Vet JI* 2010, 63: 51–54

Bényei B, Komlósi I, Pécsi A, Pollott G, Marcos CH, de Oliveira Campos A, Lemes MP. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim Reprod Sci* 2006, 93: 268–279.

Betteridge KJ. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Anim Reprod Sci* 2003, 79: 203–244.

Betteridge KJ. Farm animal embryo technologies: Achievements and perspectives. *Theriogenology* 2006, 65: 905–913.

Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology* 2007, 68: 1–22.

Bigham AS, Habibian S, Ghasemian F, Layeghi S. Caudal epidural injection of lidocaine, tramadol, and lidocaine-tramadol for epidural anesthesia in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 2010, 33: 439–443.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, Tríbulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002, 57: 53–72.

Bó GA, Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reprod Sci* 2013, 10: 344–348.

Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999, 51: 59–70.

Bowen JM, Elsdén RP, Seidel GE. Non-surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology* 1978, 10: 89–95.

Buford WI, Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Lewis PE, Inskeep EK. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biol Reprod* 1996, 54: 531–537

Bülbül B, Dursun Ş, Kirbaş M, Köse M, Ümütlü S. The effect of flunixin meglumine injected before embryo transfer on pregnancy rates in heifers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010, 16: 105–109.

Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* 2003, 83: 211–218

Carruthers TD. Principles of hormone therapy in theriogenology. Teoksessa: Youngquist RS, Threlfall WR (toim.) Current therapy in theriogenology 2, Diagnosis, Treatment and prevention of reproductive disease in small and large animals. W.B. Saunders Company, Philadelphia USA 1986. S. 3–13.

Carter F, Rings F, Mamo S, Holker M, Kuzmany A, Besenfelder U, Havlicek V, Mehta JP, Tesfaye D, Schellander K, Lonergan P. Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biol Reprod* 2010, 83: 707–719.

Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology* 2002, 58: 51–59.

Chebel RC, Demétrio DGB, Metzger J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 2008, 69: 98–106.

Coleman DA, Dailey RA, Leffel RE, Baker RD. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *J Dairy Sci* 1987, 70: 858–866

De Rensis F, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Techakumpu M. Clinical use of human chorionic gonadotropin in dairy cows. *Theriogenology* 2010, 73: 1001–1008.

Demetrio DGB, Santos RM, Demetrio CGB, Vasconcelos JLM. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating holstein cows. *J Dairy Sci* 2007, 90: 5073–5082.

DeRossi R, Bertoni RA, Ruzzon RH, Verde-Selva AB, Frazílio FO. Segmental dorsolumbar epidural analgesia via the caudal approach using multiple port catheters with ketamine or lidocaine or in combination in cattle. *Vet Anaesth Analg* 2010, 37: 451–459.

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 1998, 49: 1051–1058.

Duran PG (2000) Technical aspects of the recovery, handling and transfer of embryos. Food and fertilizer technology center. Saatavilla: <http://www.ffc.agnet.org/library.php?func=view&style=type&id=20110801173034>. Haettu 15.05.2015

Edmondson MA. Local and regional anesthesia in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2008, 24: 211–226.

Elsden RP, Seidel Jr. GE, Takeda T, Farrand GD. Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology* 1982, 17: 1–10.

Faba 2012. Saatavilla: <http://www.faba.fi/fi/palvelut/alkionsiirto>. Haettu 05.06.2013

Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci* 2003, 86: 3941–3950.

Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003, 59: 599–616.

Geisert RD. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. *Reproduction* 1991, 92: 475–82

Givens MD, Marley SD. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology* 2008, 69: 129–136.

Greene SA. Protocols for anesthesia of cattle. *Vet Clin N Am: Food Animal Practice* 2003, 19: 679–693.

Grimes JF (2008). Utilization of embryo transfer in beef cattle. Saatavilla: <http://ohioline.osu.edu/lines/stock.html#Beef>. Haettu 15.05.2015

Hanekamp WJA. Transfer of Beef Embryos in Dairy Cows: Influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. *Reprod domest anim* 1999, 34: 459–463.

Hansen PJ, Aréchiga CF. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. *J anim sci* 1999, 77: 36–50

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001, 56: 1401-1415.

Hasler JF. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003, 79: 245-264.

Hasler JF. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology* 2006, 65: 4–16.

Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 2014, 81: 152–169.

Hasler JF, McCauley AD, Schermerhorn EC, Foote RH. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology* 1983, 19: 83-99.

Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 1987, 27: 139–168.

Ideta A, Aoyagi Y, Tsuchiya K, Kamijima T, Nishimiya Y, Tsuda S. A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 °C. *Scientific Reports* 2013, 3: 1173.

IETS (2013) Data Retrieval Committee. Perry G. 2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Saatavilla: http://www.iets.org/pdf/com m_da ta/ d_e_cember2013.pdf. Haettu 15.05.2015

Jaśkowski JM, Urbaniak K, Antosik P, Włodarczyk R. The influence of transfer gun

passage time through the uterine cervix on pregnancy rate in recipient heifers. *Acta Vet Hung* 2010, 58: 125-132.

Ko JCH, Althouse GC, Hopkins SM, Jackson LL, Evans LE, Smith RP. Effects of epidural administration of xylazine or lidocaine on bovine uterine motility and perineal analgesia. *Theriogenology* 1989, 32: 779–786.

Krueger X von, Heuwieser W. Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2010, 93: 5140–5146.

Lawson RAS, Cahill LP. Modification of the embryo maternal relationship in ewes by progesterone treatment early in the oestrous cycle. *J Reprod Fertil Ltd* 1983, 67: 473–475.

Leibo SP. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1984, 21: 767–790.

Lemaster JW, Sealsa RC, Hopkins FM, Schricka FN. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. *Prostag oth Lipid M* 1999, 57: 259–268

Lindner GM, Wright Jr. RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 1983, 20: 407–416.

Lonergan P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007, 64: 315–325.

Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology* 2006, 65: 201–209.

Lopes-da-Costa L, Chagas e Silva J, Deloche MC, Jeanguyot N, Humblot P, Horta AEM. Effects of embryo size at transfer (whole versus demi) and early pregnancy progesterone supplementation on embryo growth and pregnancy-specific protein bovine concentrations in recipient dairy heifers. *Theriogenology* 2011, 76: 522–531.

López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Hunter RHF. Progesterone supplementation

during the early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. *Theriogenology* 2004, 62: 1529–1535.

Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet J* 2006, 171: 500–503.

Mapletoft RJ. Bovine Embryo Transfer. Teoksessa: Youngquist RS, Threlfall WR (toim.) Current therapy in theriogenology 2, diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals. W.B.Saunders Company, Philadelphia USA 1986. S. 54–58.

Mapletoft RJ. Bovine embryo transfer. IVIS 2006. Saatavilla: http://www.uesc.br/cursos/pos_graduacao/mestrado/animal/bibliografia2008/mapletoft_2006.pdf. Haettu 15.05.2015

Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J Animal Sci* 2003, 81: 28–36

Martínez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, De las Heras MA. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: A field trial. *Theriogenology* 2002, 58: 963–972.

McEvoy TG, Thompson H, Dolman DF, Watt RG, Reis A, Staines ME. Effects of epidural injections and transvaginal aspiration of ovarian follicles in heifers used repeatedly for ultrasound-guided retrieval of ova and embryo production. *Vet Rec* 2002, 151: 653–658.

MMMa 1027/2013. Saatavilla: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2013/20131027>. Haettu 03.06.2014

Nishigai M. Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese Black. *J Reprod Develop* 1998, 44: 413–419

Nishigai M. The Development and prevalence of the transfer technique for frozen-

thawed embryos of japanese black beef cattle in tochigi prefecture. *J Reprod Develop* 2003, 49: 23-36

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. The influence of developmental stage and morphological quality of frozen-thawed bovine embryos on pregnancy rate in bovine embryo transfer. *J Reprod and Develop* 1999, 45: 301–306

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 2002, 58: 1597–1606.

Odde KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 1990, 68: 817–830.

Odensvik K, Gustafsson H. Effect of flunixin during asynchronous embryo transfer in the heifer. *Anim Reprod Sci* 1994, 36: 13-24

Peterson AJ, Lee RS. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 2003, 59: 687–697.

Purcell SH, Beal WE, Gray KR. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology* 2005, 64: 867–878.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 1995, 44: 915–923.

Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 1997, 80: 301–306.

Rowe RF. Transfer of bovine embryos. Teoksessa: Youngquist RS, Threlfall WR (toim.) *Current therapy in theriogenology 2, Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. W.B. Saunders Company, Philidelphia USA 1986. S. 59–60.

Scenna FN, Edwards JL, Rohrbach NR, Hockett ME, Saxton AM, Schrick FN. Detrimental

effects of prostaglandin F₂ on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandin Lipid Mediat* 2004, 73: 215–226

Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005, 78: 38–45.

Schrack FN, Inskeep EK, Butcher RL. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biol Reprod* 1993, 49: 617–621

Seidel GE Jr, Seidel SM. Training manual for embryo transfer in cattle. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome FAO 1991.

Seidel GE, Elsden RP, Hasler JF. Embryo transfer in dairy cattle. W.D. Hoards & Sons Company, Fort Atkinson USA 2003. S. 23

Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. Second Revised Edition p. Current Conceptions, Inc., Washington USA 2003. S. 188-213

Siqueira LGB, Torres CAA, Souza ED, Monteiro Jr. PLJ, Arashiro EKN, Camargo LSA, Fernandes CAC, Viana JHM. Pregnancy rates and corpus luteum–related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 2009, 72: 949–958.

Smith AK. Embryo Transfer. Teoksessa: Andrews, AH (toim.) *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of Cattle*. Toinen Painos. Blackwell Science Ltd, Oxford UK 2004, 634–651.

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 2001, 56: 287–297.

Stringfellow DA, Givens MD, Waldrop JG. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Dev* 2004, 16: 93–102.

Stringfellow DA, Lauerman LH, Nasti KB, Galik PK. Trypsin treatment of bovine embryos after in vitro exposure to infectious bovine rhinotracheitis virus or bovine herpesvirus-4. *Theriogenology* 1990, 34: 427–434.

Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 2005, 64: 1212–1224.

Tervit HR, Cooper MW, Goold PG, Haszard GM. Non-surgical embryo transfer in cattle. *Theriogenology* 1980, 13: 63–71.

Thibier M. Biosecurity and the various types of embryos transferred. *Reprod Domest Anim* 2006, 41: 260–267.

Thibier M. Biosecurity - its added value to embryo transfer. *Acta Sci Vet* 2010, 38: 649–659.

Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Filho OG. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*. 2006, 65: 192–200.

Vasconcelos JLM, Cooke RF, Jardina DTG, Aragon FL, Veras MB, Soriano S, Sobreira N, Scarpa AB. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2011, 127: 140–147

Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 1992, 37: 23–37.

Wallace LD, Breiner CA, Breiner RA, Spell AR, Carter JA, Lamb GC, Stevenson JS. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology* 2011, 75: 1506–1515.

Wrathall AE. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology* 1995, 43: 81–88