

돼지 수정란의 간편이식 방법

정 기 화

축산기술연구소

서 론

현재, 양돈산업에서 돼지 유전자원의 이동은 생축을 이동하는 방법을 이용한다. 생축을 이동하면 많은 수송경비와 질병전파의 위험이 아주 높다. 돼지 동결정액의 실용성에 관한 문제점은 제쳐두고라도, 인공수정은 자축의 유전능력을 절반정도만 개량시킬 수 있다. 수정란을 이용한 유전자원의 보급은 경제적인 측면에서 효과적인 방법이지만, 수정란을 외과적으로 채란하는데 비용이 많이 들며, 돼지 수정란의 동결은 생존율이 아주 낮아, 돼지 수정란 이식을 상업적으로 적용하는데는 많은 제약이 따른다. 돼지 수정란이식에 있어서 비용을 절감하는 방법의 하나는 비외과적 방법으로 수정란을 이식하는 것이다.

돼지의 수정란이식은 대부분 외과적 방법에 의존해 왔다. 외과적 이식방법의 이용은 매우 제한된 상황에서만 실행되어졌는데, 이러한 이유는 수술에 따른 장소, 기구가 필요하며, 마취 및 수술을 위한 기술이 요구되어지기 때문이다. 돼지는 세대간격이 짧고 산자수가 많기 때문에 개량적 측면에서의 수정란 이식 적용은 거의 무시되어도 될 것 같았으나, 국가간 개량을 위하여는 질병문제와 비용문제 때문에 수정란이식에 관심을 갖게 되었다. 소에서 최근 단기간의 비외과적 채란 및 이식기술과 관련기술(수정란 동결, 생체내 난자채취법, 체외수정란 생산 등)의 발달에 따라 비외과적 수정란이식사업이 실용화 되므로서, 돼지에 있어서도 손쉽고 간편한 수정란 채란 및 이식기술이 발달된다면 실용화 및 산업화가 가능할 것으로 기대된다. 또한, 동물 복지차원에서 외과적 수정란이식은 규제가 있을 것으로 판단되므로, 간편하고 스트레스를 최소화 하는 이식방법이 발전되어야 할 것이다. 따라서, 돼지에 있어서 수정란 이식기술을 적용하기 위한 중요 포인트는 이식방법이 간편하고 쉬우며, 이식효율도 높아야 될 뿐만 아니라 외과적 이식의 단점을 보완할 수 있어야 한다.

돼지 수정란 이식방법

1. 외과적 이식방법

최근까지 돼지 수정란이식은 대부분 외과적 이식방법에 의존해 왔다. 외과적 이식방법은 상업적 측면에서의 이용은 거의 이루어지지 않았고, 실험실의 연구용이 대부분이었다. 이 방법은 마취를 한 후 생식기가 있는 부위의 복부 정중선을 절개하여 생식기를 노출시킨 다음 채란 및 이식을 실시한다. 일반적으로 미경산돈을 이용하는데 미경산돈은 다루기가 쉽고 수술이 경산돈에 비하여 용이하기 때문이다. 수정란은 수정란의 발달 단계에 따라 난관이나 자궁각 선단부에 이식하는데, 주로 2~4세포기의 수정란을 난관에 이식하는 방법을 이용한다. 주입기는 작은 피펫이나 주사기에 튜브를 연결하여 사용하며, 최소한의 보존액이 들어가도록 주입한다. 평균 수태율과 산자수는 60%(17~100%)와 6.5두(2.4~10.8두) 정도이다(Brussow와 Konig, 1988).

2. 내시경법

최초의 내시경을 이용한 수정란 이식방법은 1987년 Stein-Stefani 등에 의하여 보고되었다. 이들은 14두의 수란돈에 이식한 후 30일령에 태아수를 확인한 결과 2두가 수태되었으며(14%), 산자수는 8두와 9두라고 보고하여 성공률이 매우 낮았다. 최근에는 Besenfelder 등(1997)이 내시경을 이용하여 수정란의 회수와 이식을 실시하였다. 공란돈 9두에서 279개의 수정란을 회수하였으며, 27두의 수란돈에 두당 20개씩의 수정란을 이식하여(외과적 채란 포함) 9두가 임신 확인되었고 8두에서 49두의 산자를 생산하였다(평균 산자수 6두). 또다시 그들은(Besenfelder 등, 1998) 내시경을 이용한 수정란이식에서 90% 이상의 수태율을 보고하였으나 자세한 내용은 밝히지 않았다. 내시경을 이용하기 위하여는 수술을 해야하기 때문에 외과적 방법으로 분류되지만 수술부위가 내시경이 들어갈 정도의 작은 부분만으로도 가능하므로 외과적 방법에 비하여 간편하다는 장점이 있다. 그러나 이 방법도 마취를 하여야 하며 적은부위 일지라도 수술을 해야 하는 어려움이 있으므로 개인농장에서 적용하기는 어려운 점이 있다.

3. 비외과적 방법

비외과적 이식방법은 자궁경관을 통과하여 수정란을 자궁에 이식하는 방법으로 정의할 수 있겠다. 1968년 Polge와 Day가 시도한 이래 최근까지 연구 발달 되어져 왔다. Polge와 Day(1968)는 공란축을 수정 후 3-5일에 도살하여 회수한 수정란을 마취된 수란돈 17두에 이식하였다. 이식 후 17일째 도살하여 임신상태를 확인한 결과 1두만이 임신되었으며 임신된 돼지에서 3개는 태아로 발달하고 4개는 수정란상태로 남아 있었다고 하였다. 그들은 수정란 이식시점이 발정기간이 아니기 때문에 자궁경관으로 이식기가 쉽게 들어가지 않고 자궁경관이나 자궁벽으로 관통 되기도하여 성공률이 낮았다고 하였다. Sims와 First(1987)는 7일령 수정란을 마취한 수란돈에게 인공수정기구를 이용하여 자궁에 이식한 후, 일정시기에 수란돈을 도살하여 임신여부를 확인한 결과, 21두 중 13두의 임신을 확인하였다고 보고하였다.

비외과적 수정란이식에 대한 내용을 보고자에 따라 분류하여 Table 1에 요약하였다. 주요한 차이점들은 1) 수란돈의 마취여부, 2) 사용한 수정란 이식기구 및 3) 이식시 보존액 용량 등으로 대별할 수 있었다.

A와 D그룹은 수란돈을 완전한 마취상태에서 이식하였다. A그룹은 수란돈의 후반신을 직각으로 세워 자궁경관이 아래로 곧게 펴지게 한 다음 수정란이 중력에 의하여 자궁속으로 흘러 들어가도록 하였다. 이들은 돼지 인공수정기구에 자체 고안한 기구(소 수정란이식 기구에 이용하는 것과 같은 stainless steel 수정란이식 canula)를 부착하여 자궁속으로 넣어 수정란을 이식하였다. 수정란 주입 후 10-20 ml의 보존액을 추가로 자궁속으로 주입하였다.

B와 E그룹은 인공수정 방법을 응용하여 이식하였다. 수란돈을 약간 진정시키거나(B 그룹) 전혀 마취를 하지않고(E 그룹) 실시하였는데, 2개 그룹 모두 정상적인 인공수정 주입기에 3 way stop-coke을 장치하였다. B그룹은 tomcat 카테타를 이용하여 보존액 10-12 ml과 함께 수정란을 주입하고 추가로 15 ml 정도의 공기를 자궁속으로 넣었다. E그룹은 50 ml 정도의 보존액을 수정란과 함께 자궁에 주입하고 추가로 10 ml 정도의 공기를 주입하였다.

C와 F 그룹은 수란돈을 마취하지 않고 이식하였다. 이식기는 자궁경관을 통과하여 자궁각으로 들어갈 수 있도록 특별히 잘 구부러지게 고안된 기구를 이용하였다. 작은 카테타에 수정란을 장착한 후 이렇게 고안된 기구를 이용하

Table 1. 최근 보고된 비외과적 수정란이식 방법 및 결과

보고자	A그룹 Reichenbach 등	B그룹 Galvin 등	C그룹 Hazeleger와 Kemp	D그룹 Li 등	E그룹 Yonemura 등	F그룹 Hazeleger 등
마취여부	Yes	Yes	No	Yes	No	No
이식기구*	AI+SI	AI	SI	AI+SI	AI	SI
보존액(ml)	10-20	10-12	≤0.1	<0.3	30-50	≤0.1
수정란 수	25-40	12±0.5	17±2	23±10	18±8	28-30
수정란 단계	8세포기- 확장배반포	4세포기- 확장배반포	상실기- 배반포	4세포기- 배반포	8세포기- 확장배반포	8세포기- 확장배반포
분만율(%)	5/58(9%)	10/46(22%)	7/21(33%)	5/16(31%)	16/25(64%)	16/27(59%)
산자수	2, 6, 7	4.3±0.7 (3-6)	6.7±1.6 (4-9)	6.2±3.1 (3-10)	3.1±1.6 (1-7)	10.9±3.4 (3-15)
생존율/ 임신	7.4, 20.0, 21.9	35±13 (21-63)	38±8 (22-47)	31±17 (13-56)	17±8 (7-33)	37±11 (10-50)

* AI; 변형인공수정기구, SI; 자체 고안된 기구(Hazeleger와 Kemp, 1999)

여 자궁속에 이식하는데, 0.1 ml 이하의 보존액만 사용하였으며, 수태율은 33% 이었다. 최근 이 방법을 더 발전시키고 더 많은 수정란을 이식한 결과 수태율은 59%로 향상시킬 수 있었다고 하였다.

미국 Missouri대학의 Dr. Prather 연구실에서 Li 등(1996, D그룹)은 자궁경관을 통과하여 자궁체에 도달할 수 있는 기구를 이용하여 돼지의 비외과적 수정란 이식에 성공하였다고 보고하였다. 긴 막대기 형태를 이용하여 자궁내벽에 어떠한 손상없이 수정란을 자궁각에 이식하는 방법이었다.

외과적인 수술을 통하여 수정란을 회수하며 수란돈을 마취 후 이식하였다. 채란된 수정란은 수정란 이식튜브에 장착하는데 이식튜브는 부드러운 끝 부분과 약간 딱딱한 수정란 장착 튜브로 이루어져 있다. 끝부분의 부드러운 부분은 이식기구를 자궁각에 넣을 때 끝이 구부러지게 하기 위한 것이다.

비외과적 수정란 이식기구는 세 부분으로 구성되어 있다. 첫 부분은 자궁경관고정장치(cervical retractor) 라고 하며 돼지 인공수정기구를 개조하여 만

들었으며, 자궁경관을 곧게 펴고 고정하는 역할을 한다. 두 번째 부분은 경관통과 캐놀러(trans-cervical cannula)라고 하며 자궁경관을 원활히 통과할 수 있도록 앞쪽 끝을 약간 비스듬히 구부러지게 만든 철제관이다. 세 번째 부분은 stainless steel로 만들어진 막대기 probe인데, 경관통과 캐놀러 속에 넣어 캐놀러가 정확하게 자궁속으로 들어 갔는지를 확인할 수 있다. 수정란이 들어 있는 straw에 또 다른 부드러운 튜브가 연결되어 있는데 이 튜브는 자궁각속으로 들어가 구부러지면서 수정란이 정확하게 자궁각에 이식될 수 있도록 보조역할을 수행한다.

비외과적 수정란 이식과정은 다음과 같다. 세부분으로 구성된 수정란 이식기구를 결합하고, 결합된 기구 끝 부분에 윤활제를 바른다. 자궁경관 고정장치를 자궁경관에 넣어 시계 반대방향으로 돌리면서 자궁경관에 고정될 때까지 밀어 넣는다. 다음은 경관통과 캐놀러를 역시 시계반대방향으로 돌리면서 전진시키는데 자궁경관을 통과하게 되면, 캐놀러가 쉽게 움직이면서 완전히 통과가 되었다는 것을 느낄 수 있다. 이때 probe를 전진시켜보면 자궁벽까지 닿는 것을 감지할 수 있다. 이때 probe를 빼내고 수정란이 들어 있는 straw를 경관통과 캐놀러 속에 넣고 probe를 이용하여 자궁속으로 밀어 넣는다. 수정란이식이 완료되면 캐놀러와 probe를 자궁경관 고정장치 속으로 넣고 자궁경관-고정장치와 함께 시계방향으로 돌리면서 이식기구를 제거하면 수정란이식이 완료된다.

Prather와 Day(1998)는 이러한 장치를 이용하여 4세포기에서 배반포기까지의 수정란 360개를 16마리의 돼지에 이식하였다(평균 수란우당 22.5개 수정란 이식). 수란돈은 성선자극호르몬으로 발정을 유기하거나 자연발정돈을 이용하였다. 6마리의 수란돈은 발정이 재귀되지 않았으며, 이들 중 5마리는 자돈을 분만하였다($5/16 = 31\%$). 분만한 산자수는 5, 9, 3, 10 및 4두였으며, 평균 6.2 ± 3.1 마리였다. 이들 5두의 수정란 생존율은 평균 $28.7\%(31/108)$ 였으며 그 범위는 $12.9(4/31) \sim 55.6\%(10/18)$ 로 나타났다. 5두 중 산자수가 가장 많은 9두와 10두를 분만한 수란돈은 자연발정돈 이었다. 이식시 캐놀러가 잘 들어가지 않은 개체는 임신되지 않았는데 이러한 결과는 성기의 이상이거나 기술 미숙에 의한 것이라고 추측하였다.

이들이 개발한 기구의 장점은 1) 시술자가 수정란 이식기의 끝이 자궁각

속에 있다는 것을 확실히 알 수 있으며, 2) 소량의 배양액(<0.3 ml)이 소요되므로 자궁내의 환경변화가 미미하며, 3) 짧은 실습기간에도 한사람이 수분 이내에 이식이 가능하다는 것이다.

비외과적이식의 평균 수태율은 9-64% 범위 이었으며 평균 산자수도 3.1-10.9 두 범위 이었다. 보고자 각각 다른 이식기구를 이용하였지만, 수태율이 가장 좋은 방법은 수란돈을 마취시키지 않는 방법이었다(평균 60%, E와 F 그룹). 특별히 고안된 기구를 이용하여 적은 보존액으로 수정란을 이식한 그룹이 다른 방법에 비하여 산자수가 많았다(6-11두, C, D, F그룹). 많은 보존액을 함께 주입한 그룹은 산자수가 적었는데, 이는 수정란과 함께 보존액이 자궁경관을 역류하여 바깥으로 흘러 나왔기 때문으로 추정하였다. 주입하는 보존액의 양을 최소화하는 것이 무엇보다 중요하다고 사료된다.

돼지 수정란이식의 실효성 여부는 이식이 간편하고 간단한 장비와 소요시간이 짧아야하며 인공수정과 같이 현장에서 쉽게 이루어 져야 한다. 그러나 수란돈의 마취 없이 자궁경관을 통한 내시경법 이식은 아직까지 약간의 수술이 필요하다는 단점이 있고, 비외과적 수정란 이식방법 역시 많은 경험에 의한 숙련이 필요하다. 마취하지 않은 수란돈의 자궁경관을 비외과적 이식기구가 통과할때는 상당한 어려움이 있는데, 수란돈으로 미경산돈을 이용하면 자궁경관이 좁고 딱 닫혀 있으므로 경산돈을 이용하거나 고도의 숙련을 통하여 문제를 해결해야 한다.

수정란이식 성공률에 영향을 미치는 요인

1. 수정란 발달단계

대부분의 연구자들은 수정란 발달단계를 4세포기부터 배반포기까지의 다양한 수정란을 이용하였으며, 수란돈과의 발정동기화는 같거나 1일정도의 차이를 두고 이식하였으나 이러한 차이에 따른 결과는 다르지 않았다고 하였다. 그러나 최근 Hazeleger 등(1995)은 공란돈과 수란돈이 동기화 되었을 때 높은 수태율을 나타내었다고 하여, Polge(1982)의 보고와 다른 결과를 발표하였다. Polge(1982)는 외과적 이식방법에서 3-9일령 수정란은 수란돈의 발정이 1-2일 늦은 경우가 수태율이 높다고 보고한 바 있다.

수정란 발달단계는 수정란이식의 성공률에 아주 중요할 것으로 생각된다. 배반포기와 상실기가 혼합된 4일령 수정란그룹이 상실기만 존재하는 4일령 수정란그룹 보다 수태율이 높다고 하였다(55:10%, Table 2참조). 이러한 결과는 배반포기 단계의 수정란이 가장 수태율이 높거나, 빨리 발달된 수정란만이 생존한다고 해석할 수 있겠다. 상실기나 배반포기 각각의 상태로 동기화된 수란돈에 5일령의 상실기 수정란을 이식하였으나 전혀 수태되지 않았다는 보고가 있는데, 이러한 결과는 비외과적 수정란이식에서 발달상태가 빠른 수정란의 생존가능성이 더 높다는 것을 나타내는 결과로 해석이 가능하다(Hazeleger와 Kemp, 1999).

표 2. 배반포기 수정란 존재여부가 비외과적이식 후의 수태율

수란돈	배반포기 존재	배반포기 미존재	계	P-value
공시두수	11	10	21	
임신두수	6(55%)	1(10%)	7(33%)	0.06

(Hazeleger와 Kemp, 1994)

수정란의 크기가 이식 후 수태율에 미치는 영향에서 5일령 확장배반포의 크기가 $162.12 \pm 12 \mu\text{m}$ 로 큰 수정란과 $158 \pm 11 \mu\text{m}$ 의 작은 수정란을 비교한 결과, 수태율이 각각 77%와 43%로, 크기가 큰 배반포기 수정란을 이식하였을때 수태율이 높은 경향(P=0.07)을 나타내므로써 발달율이 빠른 수정란이 수태율도 높다는 결과를 보여주었다.

일반적으로 비외과적 수정란이식에서 잘 발달된 5일령 배반포기 수정란을 발정 동기화시킨 수란돈에 이식하는 것이 좋은 결과를 기대할 수 있을 것이다.

2. 위생상태

가장 높은 성공률을 보인 그룹(E와 F)은 수정란이식 용액에 항생제를 첨가하고 이식기구를 비닐 등으로 씌워 질 분비물에 의한 자궁의 오염을 방지하였다. Hazeleger 등(1999)도 수란돈의 배란일부터 이식 후 5일까지 항생제를 처

리한다고 하였는데, 항생제에 대한 효과는 명확하지 않으나 최소한 수정란의 생존에 악영향은 미치지 않을 것으로 사료된다.

3. 발정동기화

비외과적 수정란이식에서의 발정동기화 조건은 외과적이식에서의 조건과는 다르다. 외과적과 비외과적 이식에서 수정란 채란은 두 방법 공히 주로 공란돈을 도살하여 이용하지만, 차이점은 외과적 이식시 수란돈은 마취가 필수적이지만 비외과적 이식시에서는 마취를 하거나 혹은 마취를 하지 않고 수정란을 자궁체 가까이에 이식한다. 공란돈의 도살에 따른 수정란의 품질에도 차이가 있는데, 도살직후에 회수한 수정란은 2시간 이후에 회수한 수정란보다 체외발달 속도가 빠르다(Wollenberg 등, 1990). 도살직후에 회수한 수정란을 외과적으로 이식시에는, 외과적으로 채란한 수정란을 이식한 결과와 비슷하다(Schliepper와 Holtz, 1986). 그러므로, 도살직후에 빨리 회수한 수정란을 이식할때는 외과적 방법과 비외과적 방법에 따라 결과가 달라질 수 있다.

4. 마취여부

외과적 이식에서는 마취여부를 조사할 수 없지만 비외과적 이식에서도 비교 조사한 보고는 없다. 소의 경우에는 마취를 하지 않는데, 마취가 이식에 좋은 영향을 미치지 않는 것이기 때문이다. 마취를 하지 않으면 수란돈이 마취에서 회복시에 받는 스트레스가 없으며, 생리적인 변화에서도 마취에 따른 부작용이 일어나지 않을 것이다. 비외과적 수정란이식은 마취를 하지 않는 조건하에서 수란돈에 최소한의 스트레스를 가하면서 이루어져야 성공률이 높을 것이다.

5. 이식부위

외과적 이식에서 수정란 이식부위가 자궁 중앙부와 끝 부분의 차이는 수정란 생존율에 차이가 없었다고 하였다(Stein Stefani 등, 1987). Wallenhorst 등(1995)도 배반포기의 수정란을 자궁체에 외과적 방법으로 이식한 결과 17두중 2두(12%)만 수태 되었으며, 자궁각 후반부나 전반부에 이식한 결과 각각 81%(13/16)와 88%(14/16)가 수태되었다고 보고하였다. 자궁각 전반부와 후반

부 이식시 수태율의 차이는 없었으나 자궁체에 이식한 결과는 비외과적 이식 방법보다 낮은 결과를 보였는데, 이는 이식부위에 의한 차이라기보다는 외과적 이식시 마취와 수술에 따른 부종 등이 더 큰 이유 일 것으로 추측된다.

비외과적 이식에서 Yonemura 등(1996)은 이식기구를 자궁경관에 넣고 PBS 용액을 자궁내로 흘러 보내는 방법을 이용하였는데, 인공수정 카테타를 자궁경관속으로 최대한 깊숙히 넣어 자궁경관 제일안쪽이나 자궁각까지 수정란을 주입하였다. 최대한 깊숙히 카테타를 넣으므로써 수정란이 자궁점액에 묻어 소실되는 것을 방지할 수 있었다고 하였다. 비외과적 수정란이식에서는 자궁체나 자궁입구 이식부위에 따른 차이가 없다고 결론짓기는 어려울 것 같다.

결 론

돼지에서 비외과적 수정란이식기술이 더욱 발전된다면, 동물 자체를 이동시키는 것보다 수정란을 수송하는 방법이 실용화 될 것이다. 수정란을 수송하는 동안에 배양액에서 발육할 수 있도록 배양환경을 최적화하면 발육하는 약 5일 동안의 장거리 수송도 가능하다. 비외과적으로 수정란을 이식하는데는 수의사나 수술기구도 필요하지 않으며, 생축을 이동할 경우에 발생하는 질병전파의 위험을 수정란으로 이동시에는, 병원균의 제거를 위한 트립신 처리나 수정란 세척 등으로 최소화할 수 있다. 가성광견병과 같은 질병은 수정란이식을 통하여 전파가 방지된다(James 등, 1983). 대부분의 바이러스와 박테리아와 같은 병원균은 투명대(수정란)를 통과하지 못하므로 병원균이 전파 될려면 투명대에 붙어서 전파가 가능하다(Stringfellow와 Seidel, 1990; Phillipott, 1993; Guerin 등, 1997). 몇가지 예외가 있는데 명백히 밝혀진 것은 돼지의 파보바이러스로 난자의 세포질에서 발견된 예가 있다(Bane 등, 1990).

수정란이식은 질병전파 기회를 줄이는 잇점 외에 생산된 자축은 모체로부터 면역항체를 받으므로 지역적인 병원체에 대한 저항성을 갖게된다. 비외과적 수정란이식기술은 외과적 이식비용과 생체를 수송함에 따른 수송비가 절감되므로 국제적인 교역을 활성화하면 새로운 유전자를 세계 어느 곳에서나 손쉽게 축군에 도입할 수 있어 양돈산업에 매우 유익할 것으로 생각된다. 돼지에

있어서 체외수정란 생산효율과 장기보존방법이 더욱더 개선되면, 비외과적 수정란이식방법은 미래의 번식학에 있어서 새로운 장으로 자리잡을 것이다

참 고 문 헌

- Bane DP, James JE, Gradil CM and Molitor TW. 1990. In vitro exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus. *Theriogenology* 33:553.
- Bisenfelder U, Modl J, Muller M, and Brem G. 1997. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. *Theriogenology* 47:1051-1060.
- Bisenfelder U, Muller M, and Brem G. 1998. Transgenics and modern reproduction technologies. In: Rodschild MF and Ruvinski A. (eds) CAB international, pp345-374.
- Brussow K-P and Konig I. 1988. Embryotransfer beim Schwein - Stand und Nutzungs-perspectiven in der DDR. *Tag-Ber, Akad Landwirtsch-Wiss DDR Berlin* 273:153-170
- Dobrinisky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 1998. Birth of normal piglets after cytoskeletal stabilization of embryos and cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 49:166 abstr.
- Funahashi H and Day BN. 1996. Current status of in vitro production of porcine embryos. In: Tumbleson & L. Schook) *Advances in Swine in Biomedical Research*, Plenum Press, New York. p 491.
- Galvin JM, Killan DB and Stewart AVN. 1994. A procedure for successful non-surgical embryo transfer in swine. *Theriogenology* 41:1279-1289.
- Guerin B, Nibart M, Marquant-LeGuienne B and Humbolt P. 1997. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology* 47:33-42.
- Hazeleger W, Bouwman EG, Noordhuizen JPTM, and Kemp B. Effect of superovulation induction in embryonic development on Day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer. *Theriogenology* (submitted for publication).
- Hazeleger W, Jenneskens P, and Kemp B. 1995. Non-surgical transfer of porcine blastocysts. *Theriogenology* 43:232 abstr.
- Hazeleger W, and Kemp B. 1994. Farrowing rate and litter size after transcervical embryo transfer in sows. *Reprod Dom Anim* 29:481-487.

- Hazeleger W, Kemp B. 1999. State of the art in pig embryo transfer. *Theriogenology* 51:81-90.
- James JE, James DM, Martin PA, Reed DE and Davis DL. 1983. Embryo transfer for conserving valuable genetic material from swine herds with pseudorabies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193:525.
- Li J, Rieke A, Day BN and Prather RS. 1996. Technical note: Porcine non-surgical embryo transfer. *J. Anim. Sci.* 74:2263-2268.
- Philpott M. 1993. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. *Br. Vet. J.* 149:339.
- Polge C and Day BN. 1968. Pregnancy following non-surgical egg transfer in pigs. *The Veterinary Record* 82:712 abstr.
- Prather RS and Day BN. 1998. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology* 49:23-32.
- Prather RS, Rieke A and Day BN. 1998. Non-surgical embryo transfer in pigs: Introduction of new genetics with little risk of disease transmission. *Embryo Transfer Newsletter, IETS* pp14-16..
- Reichenbach HD, Modl J and Brem G. 1993. Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *The Veterinary Record* 133:36-39.
- Schliepper B and Holtz W. 1986. Transfer of pig embryos collected by laporatomy or slaughter. *Anim Reprod Sci* 12:109-114.
- Sims MM and First NL. Nonsurgical embryo transfer in swine. 1987. *J Anim Sci* 65(suppl. 1):386 abstr.
- Stein Stefani J and Holtz W. 1987. Surgical and endoscopic transfer of porcine embryos to different uterine sites. *Theriogenology* 27:278 abstr.
- Stringfellow DA and Seidel GE. 1990. *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary precautions.* 2nd Edition, p 67.
- Wallenhorst S and Holtz W. 1995. Transfer of pig embryos to different uterine sites. *Proc 11th Meeting AETE*:256 abstr
- Wollenberg C, Wentz I, Blum B and Holtz W. 1990. Survival of pig embryos flushed from the reproductive track immediately or two hours after slaughter of donors. *J Anim Sci* 68:2023-2026
- Yonemura I, Fujino Y, Irie S and Miura Y. 1996. Transcervical transfer of porcine embryo under practical conditions. *J Reprod Dev* 42:89-94.