

Staalname en cryopreservatie van epididymale spermatozoa bij de hond

Collection and cryopreservation of epididymal spermatozoa in dogs

N. Simons, A. Van Soom, E. Domain, E. Wydooghe

Vakgroep Verloskunde, Voortplanting en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

nick-simons@hotmail.com

SAMENVATTING

Wanneer een reu niet kan ejaculeren, kan epididymaal sperma gebruikt worden om een teef kunstmatig te insemineren. In deze studie werden twee methoden vergeleken om epididymaal sperma te verzamelen na castratie, namelijk de “float-up”-methode en de aspiratiemethode. Met de float-up-methode konden meer spermatozoa verzameld worden dan met de aspiratiemethode (1810±718,1 miljoen versus 694±244,5 miljoen respectievelijk, p-waarde = 0,018). Wanneer sperma verzameld werd met de float-up-methode, kon na het invriezen een trend tot een hogere motiliteit waargenomen worden dan met de aspiratiemethode (52±9,4% versus 44±9,4% respectievelijk, p-waarde = 0,060). Deze stalen vertoonden meer bloedcontaminatie dan de stalen verzameld met de aspiratiemethode. Dit bleek echter geen nadelig effect te hebben op de spermakwaliteit en -kwantiteit. Daarom kon geconcludeerd worden dat bij voorkeur de float-up-methode dient gebruikt te worden, wanneer epididymaal sperma verzameld moet worden bij honden.

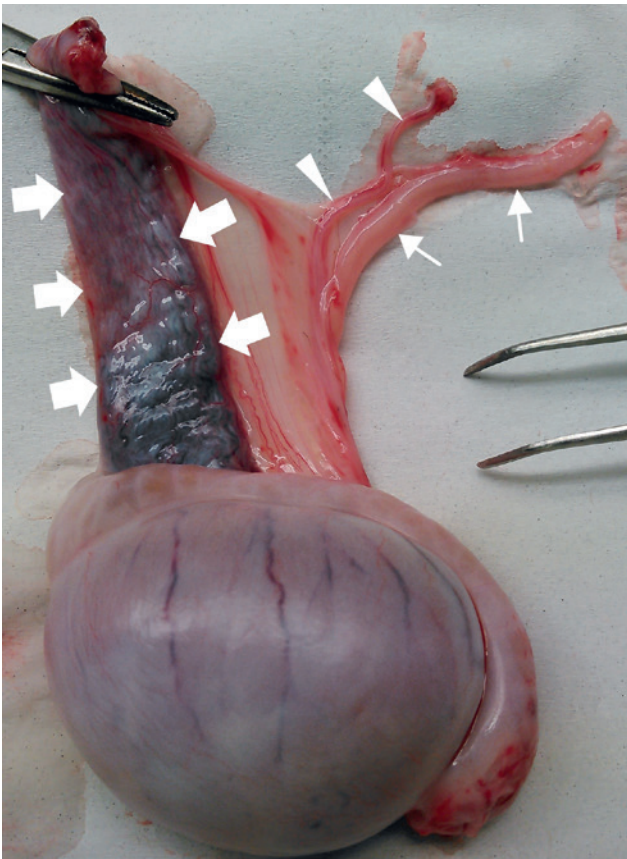
ABSTRACT

When a male dog is not able to ejaculate, epididymal spermatozoa can be used to artificially inseminate the bitch. In the present study, two methods to collect epididymal sperm after castration were compared, i.e. the float-up method and the aspiration method. With the float-up method, more spermatozoa were collected than with the aspiration method (1810±718.1 million versus 694±244.5 million respectively, p-value = 0.018). A trend towards a higher post-thaw motility was observed when using the float-up method compared to the aspiration method (52±9.4% versus 44±9.4%, p-value = 0.060). Semen samples collected with the float-up method showed more blood contamination than with the aspiration method; however, this seemed to have no effect on the quality and quantity of the semen. It can therefore be concluded that the float-up method is the method of choice when epididymal sperm has to be collected in dogs.

INTRODUCTIE

De laatste decennia is de interesse in het fokken van honden aanzienlijk toegenomen en ook de vraag naar geassisteerde reproductie bij honden stijgt (Peña et al., 2006). Het groeiende aantal kunstmatige inseminaties vraagt meer onderzoek naar verschillende technieken voor de opslag van hondensperma. Dit is vooral interessant wanneer het genetisch materiaal van waardevolle reuen bewaard moet blijven, zoals bijvoorbeeld bij assistentiehonden, zeldzame rassen

met weinig beschikbare fokdieren, genetisch belangrijke honden en reuen van bedreigde wilde hondachtigen (Hori et al., 2011). Naast inseminatie met vers, gekoeld of ingevroren-ontdooid, geëjaculeerd sperma, wordt ook het gebruik van epididymaal sperma onderzocht (Hewitt et al., 2001; Hori et al., 2003; Hori et al., 2004; Hori et al., 2011). Na de onverwachte dood van hun reu willen eigenaars soms nog nageslacht van deze hond (Wydooghe et al., 2016). Op dit moment zijn er minstens twee casussen beschreven waarbij een teef een levende puppy heeft voortgebracht na



Figuur 1. Testis na castratie alvorens de float-up-methode werd toegepast. Een klem werd geplaatst op de plexus pampiniformis (grote witte pijlen). Het proximale deel van de ductus deferens (kleine witte pijlen) en de nabijgelegen arterie (witte pijlpunten) werden reeds van elkaar verwijderd.



Figuur 2. Epididymis in een petrischaal nadat incisies werden gemaakt tijdens de float-up-methode. Merk op dat er via de incisies (zwarte pijlpunten) uitgetreden spermawolken (witte pijlen) zichtbaar zijn in het Hesp-TALP-medium.

inseminatie met postmortem gewonnen, epididymaal sperma (Wydooghe et al., 2016; Marks et al., 1994). In beide gevallen werd slechts één levende puppy geboren, wat kan wijzen op inferieure spermakwaliteit, een minder goede techniek van spermabewerking, een probleem bij de teef of suboptimale timing of techniek van inseminatie. Het is dus mogelijk om nageslacht te produceren uit sperma dat verzameld werd nadat de reu gestorven is.

Geëjaculeerd sperma wordt meestal verzameld door middel van masturbatie of sporadisch door elektro-ejaculatie of middels farmacologische methoden (Kutzler, 2005). Epididymaal sperma daarentegen dient verzameld te worden op alternatieve manieren. De methode die aan de Universiteit Gent gebruikt wordt voor het verzamelen van epididymaal sperma bij honden is de float-up-methode (Wydooghe et al., 2016). De epididymis en de proximale ductus deferens worden hierbij ingesneden en ondergedompeld in een medium om de spermatozoa toe te laten in het medium te stromen. Echter, omdat de epididymis ingesneden wordt, wordt het omliggende weefsel beschadigd en kunnen zich ook bloedcellen verspreiden in het medium. Bloedcontaminatie zou nadelig kunnen zijn voor de spermakwaliteit, omdat onder andere hemoglobine, dat vrijkomt na hemolyse bij het invriezen en ontdooien, schadelijk zou zijn voor de spermatozoa (Rijsselaere et al., 2003). Dit zou gedeeltelijk kunnen verklaren waarom het drachtigheidspercentage na kunstmatige inseminatie met ingevroren-ontdooid epididymaal sperma zo laag is.

Een andere methode om epididymaal sperma te verzamelen, is de aspiratiemethode (Angrimani et al., 2014 en 2017). Bij deze methode worden meerdere incisies gemaakt in de caput, corpus en cauda epididymidis. Daarbij worden de bloedvaten nauwkeurig vermeden. Met een geautomatiseerde pipet wordt het uitvloeiende epididymale sperma verzameld. Er kan verwacht worden dat deze techniek stalen oplevert met spermatozoa van betere kwaliteit, aangezien de schadelijke gevolgen van bloedcontaminatie afwezig zijn.

Beide technieken werden begin jaren negentig van de vorige eeuw reeds vergeleken voor het verzamelen van epididymaal sperma bij ratten (Klinefelter et al., 1991). In tegenstelling tot de eerder genoemde veronderstelling dat de float-up-methode spermastalen van relatief slechte kwaliteit zou opleveren, resulteerde net deze methode, in een studie van Klinefelter et al. (1991), in minder variabele, kwalitatief betere en minder beschadigde spermastalen. Seed et al. (1996) bevestigden deze resultaten met een vergelijkbare studie bij ratten, en ook bij konijnen en honden.

Het is duidelijk dat er tegenstrijdige gegevens te vinden zijn in de literatuur en dat verder onderzoek aangewezen is. Het doel van deze studie is om deze methoden te vergelijken en zodoende te evalueren welke van de twee, i.e. de float-up-methode of de aspiratiemethode, het meest praktisch is wanneer epididymaal sperma moet worden ingevroren om later voor kunstmatige inseminatie gebruikt te kunnen worden.

MATERIAAL EN METHODEN

Dieren

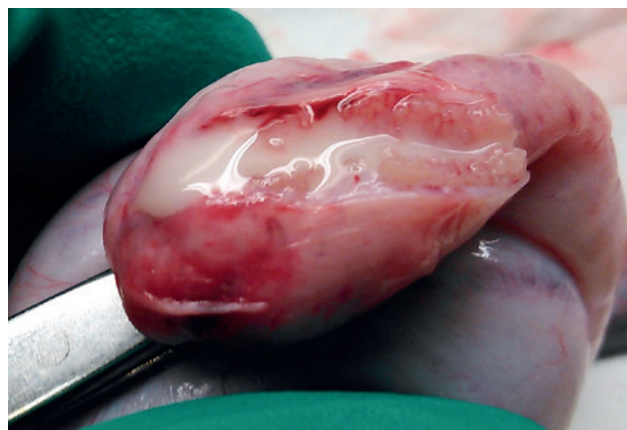
Voor deze studie werden negen gezonde, intacte, mannelijke honden gebruikt van verschillende leeftijd (tussen vijf maanden en elf jaar), verschillend ras (een labrador-retriever, pomeriaan, Amerikaanse stafford, Franse bulldog, twee Australische herders, een Deense dog, Peruviaanse naakthond en een kruising), met verschillend lichaamsgewicht (tussen 2,3 kg en 53 kg), die nooit gedekt hadden. Deze reuen werden aangeboden voor castratie aan nabijgelegen dierenartspraktijken of aan de dierenkliniek van de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent. Na castratie werd elke testis tijdelijk en apart bewaard aan 4°C in fysiologische vloeistof aangevuld met 50 µg/ml gentamycine. Binnen de 24 uur werden de testes behandeld in het labo.

Staalname van het spermastaal

Om voor eenzelfde hond beide methoden te kunnen vergelijken, werd elk van de twee technieken toegepast op één van beide testes van dezelfde hond. De testes werden gewogen en de staalnamemethoden werden at random toegepast op de zwaarste of lichtste testis. Eerst werden de testes gewassen met Dulbecco's fosfaat-gebufferde zoutoplossing en voorzichtig gedroogd. Alle handelingen werden uitgevoerd onder laminaire flow op een verwarmde plaat (37,5°C).

Float-up-methode

Het weefsel tussen de ductus deferens en de overgebleven arterie werd met een pincet verwijderd door deze uit elkaar te trekken (Figuur 1). Vervolgens werd de epididymis losgesneden van de testis met een scalpel. De overgang tussen de testis en de cauda epididymidis werd doorgesneden en een klem werd geplaatst op het einde van de cauda om te voorkomen dat sperma uit de epididymis zou lekken. Vervolgens werd de epididymis in een petrischaal geplaatst gevuld met Hapes gebufferd Tyrode's albumine-lactaat-pyruvaat (Hapes-TALP) -medium (De Pauw et al., 2003) en de klem werd verwijderd. Met een scalpel werden meerdere parallelle incisies gemaakt in alle delen van de epididymis, terwijl de grote bloedvaten zo goed mogelijk werden vermeden. Het sperma begon snel uit de epididymis te diffunderen in het medium (Figuur 2). De petrischaal werd bedekt om schade aan de spermatozoa door licht te voorkomen. Nadat de spermatozoa gedurende dertig minuten toegelaten werd om uit de epididymis in het medium te zwemmen, werd het spermatozoa-bevattende medium verzameld met een automatische pipet en in een proefbuis geplaatst. Van dit finale staal werden de kwaliteitsparameters bepaald.



Figuur 3. Incisie in de cauda epididymidis (geïndividualiseerd door een klem) waarin sperma reeds zichtbaar was voordat het verzameld werd met een pipet tijdens de aspiratiemethode.

Aspiratiemethode

Een van de grootste verschillen met de float-up-methode is het feit dat de epididymis bij de aspiratiemethode niet van de testis losgesneden wordt.

De epididymis werd daarentegen enkel geïndividualiseerd door een klem te plaatsen op het deel van de epididymis het dichtste tegen de testis aan. Daardoor moest er niet gesneden worden tussen de epididymis en de testis, wat de kans op bloedcontaminatie verminderde. Bovendien zorgde de klem voor een opwaartse druk zodat het aanwezige sperma vlot kon uitvloeien tijdens de volgende stap. Daarbij werd met een scalpel een incisie gemaakt in de verschillende delen van de epididymis, waardoor gemakkelijker bloedvaten vermeden konden worden in tegenstelling tot de float-up-methode. Eerst werd de cauda epididymidis ingesneden om het merendeel van het aanwezige sperma te verzamelen, aangezien dit deel dienst doet als de opslagplaats van de spermatozoa (Figuur 3). Het beschikbare sperma in de incisie werd geaspireerd met een automatische pipet en in een testbuisje met Hapes-TALP-medium geplaatst. Daarna werd op een gelijkaardige manier het sperma uit het corpus en de caput epididymidis verzameld en in dezelfde proefbuis overgebracht. Van dit finale staal werden de kwaliteitsparameters bepaald.

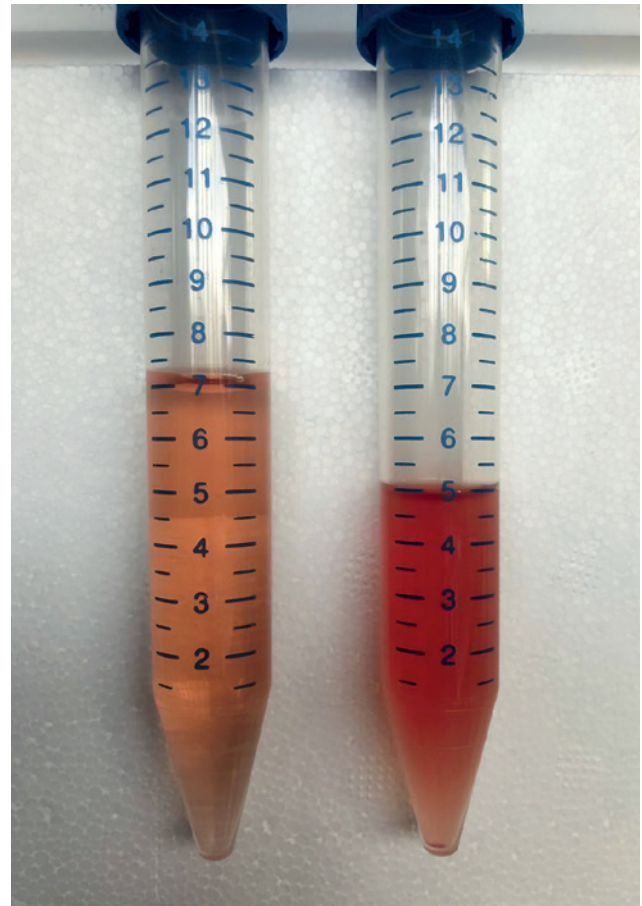
Evaluatie van de spermakwaliteit

De basisparameters zoals het totale aantal spermatozoa, de motiliteit en de morfologie van de spermatozoa werden beoordeeld door middel van conventionele technieken. Dit gebeurde zowel van de stalen verzameld met de float-up-methode, als die bekomen met de aspiratiemethode. Eerst werd de spermatozoa-concentratie bepaald met een hematocytometer. Door dit aantal spermacellen per ml te vermenigvuldigen met het volume van het staal werd het totaal

aantal spermatozoa berekend per staal. De spermotiliteit werd geschat door microscopische evaluatie van het staal op een voorverwarmd draagglas. Tot slot werd een eosine-nigrosinekleuring gemaakt om de morfologie van de spermatozoa te beoordelen. Op deze manier werden de levend/dood-verhouding, het aantal spermatozoa met een normale morfologie en het aantal abnormaliteiten, zoals een abnormale kop, abnormale staart, proximale protoplasmadruppels en distale protoplasmadruppel, geteld.

Invries- en ontdooiproces

Nadat de kwaliteitsparameters voor het invriezen geëvalueerd waren, kon het invriesproces opgestart worden. Het protocol dat gebruikt werd in deze studie was de Uppsala-methode (Linde-Forsberg, 2010) met kleine aanpassingen, zoals beschreven door Rijsselaere et al. (2011). De proefbuisen werden met medium en spermatozoa, die verzameld werden volgens de corresponderende methode, gedurende vijf minuten gecentrifugeerd aan 37°C en aan 720g. Daarna werd de bekomen spermapellet geresuspendeerd in een eerste verdunner; op die manier werd het sperma over een verloop van 90 tot 120 minuten au bain-marie gekoeld tot 4°C. Vervolgens werd het sperma verder verdund met een tweede verdunner, waarna het in gelabelde rietjes werd overgebracht die in een geautomatiseerde invriesmachine werden geplaatst en ingevroren volgens het temperatuurprotocol van Schäfer-Somi (2006). De bevroren stalen werden bewaard in containers met vloeibare stikstof. Bij het ontdooien werden de rietjes gedurende tien seconden aan de lucht



Figuur 4. Testbuisjes met Hapes-TALP-medium en sperma verzameld met de aspiratiemethode (links) en met de float-up-methode (rechts), waarbij meer bloed aanwezig was dan bij aspiratie.

Tabel 1. Effect van ras, leeftijd, lichaamsgewicht, gewicht van de testes en een mogelijk gezondheidsprobleem op het totaal aantal spermatozoa. De testes inclusief epididymis van alle honden wogen tussen 3,7g en 39,5g met een gemiddelde van 16,2g.

Hond ID	Ras	Leeftijd (jaar; maand)	Lichaamsgewicht (kg)	Staalnamemethode	Gewicht testis (g)	Totaal aantal spermacellen (10 ⁶)	Spermatozoa per gram testisweefsel
1	Pomeriaan	3	3,45	Float-up-methode	3,8	80	21,05
				Aspiratiemethode	3,7	44	11,89
2*	Franse bulldog	2; 2	15,6	Float-up-methode	7,6	268	35,26
				Aspiratiemethode	7,3	88	12,05
3	Australische herder	9; 4	32,6	Float-up-methode	25,2	3328	132,06
				Aspiratiemethode	23,7	1456	61,43
4	Deense dog	1; 10	53	Float-up-methode	39,5	4448	112,61
				Aspiratiemethode	35,6	1136	31,91
5*	Peruviaanse naakthond	6	10,5	Float-up-methode	8,35	896	107,31
				Aspiratiemethode	8,34	384	46,04
6	Australische herder	0; 7	27,7	Float-up-methode	18,7	1840	98,40
				Aspiratiemethode	18,7	1056	56,47

*Gezondheidsproblemen: brachycefal obstructief syndroom (BOS) (hond 2); perineale hernia + staal 48 u koel voor invriezen (hond 5).

geëquilibreerd en daarna gedurende één minuut ontdooit in water van 37°C. Na het ontdooien werden de spermamotiliteit en -morfologie opnieuw bepaald met dezelfde technieken als hierboven beschreven.

Statistiek

De statistische analyse gebeurde via het programma SPSS25 door middel van een gepaarde t-toets. De data worden weergegeven als het gemiddelde \pm standaardfout. Verschillen waarbij de p-waarde kleiner was dan 0,05 werden als significant beschouwd en verschillen met een p-waarde kleiner dan 0,1 werden beschouwd als een trend.

RESULTATEN

In deze studie kon er van zes van de negen honden een bruikbaar spermastaal van voldoende kwaliteit bekomen worden. Het spermastaal van de drie andere honden vertoonde azoöspermie: de hond van vijf maanden was vermoedelijk nog niet geslachtsrijp, de hond van elf jaar had een testistumor en testisatrofie en voor de derde hond was er geen aanwijsbare reden van de azoöspermie.

Resultaten voor het invriezen

Met de float-up-methode konden significant meer spermacellen verzameld worden dan met de aspiratiemethode (Tabel 1 en 2). Wat betreft de kwaliteit van het verkregen spermastaal kon er geen verschil vastgesteld worden voor wat betreft de motiliteit en de levend/dood-verhouding. Het aantal spermatozoa met een abnormale morfologie was voor beide methoden hoog en vergelijkbaar (Tabel 2).

Resultaten na het ontdooien

Na het ontdooien van de spermastalen werd het totaal aantal spermatozoa niet meer opnieuw bepaald, aangezien de spermaconcentratie niet mag veranderen tijdens het invriesproces. Bij de float-up-methode werd een trend tot een hogere motiliteit na ontdooiing waargenomen dan bij de aspiratiemethode (Tabel 2).

De levend/dood-verhouding fluctueerde rond 85/15 en was opnieuw vergelijkbaar voor beide methoden (Tabel 2). De morfologie van de spermacellen toonde een zeer hoog aantal abnormale spermatozoa, maar verschilde niet tussen beide methoden.

DISCUSSIE

Wanneer een eigenaar nageslacht wil van een reu die niet meer kan ejaculeren, is kunstmatige inseminatie met epididymaal sperma een mogelijke oplossing. Echter, zelfs als dit lukt, wordt een slechte fertiliteit bekomen (Wydooghe et al., 2016; Marks et al., 1994). Een mogelijke verklaring is dat epididymaal sperma niet het volledige rijpingsproces, inclusief de ejaculatie zelf en het mengen met seminaal plasma vanuit de prostaat, heeft doorgemaakt en daarom van inferieure kwaliteit is. Bovendien beïnvloedt het invriesproces de spermakwaliteit, zowel voor geëjaculeerd als voor epididymaal sperma en is de fertiliteit na inseminatie met gecryopreserveerd sperma lager dan met vers sperma. Daarnaast is ook de methode van staalname voor epididymaal sperma belangrijk en kan ze het fertiliserend vermogen beïnvloeden. Het is duidelijk dat een heel aantal factoren nog onderzocht moet worden.

In deze studie werd ingegaan op de staalname-methoden van epididymaal sperma en werd getracht te bepalen welke methode het beste gebruikt wordt in de praktijk. Middels de float-up-methode is de kans groter dat het sperma onderhevig is aan de mogelijk nadelige effecten van bloedcontaminatie dan met de aspiratiemethode. Daarom zou verwacht kunnen worden dat het bekomen sperma met deze laatste techniek kwalitatief superieur zou zijn, alhoewel in sommige studies met ratten het tegenovergestelde gesuggereerd wordt (Klinefelter et al., 1991; Seed et al., 1996). In de voorliggende studie werd duidelijk aangetoond dat met de float-up-methode een hoger aantal spermatozoa verzameld kon worden dan met de aspiratiemethode. De evaluatie van de spermakwaliteit toonde een tendens naar een hogere motiliteit zowel voor het invriezen als na het ontdooien.

Mogelijke verklaringen voor de grotere spermaopbrengst van de float-up-methode dan de aspiratiemethode is de combinatie van een groter, totaal ingesne-

Tabel 2. Karakteristieken van spermastalen afgenomen met de twee verschillende methoden voor en na het invriezen.

	Voor invriezen		Na invriezen	
	Float-up-methode	Aspiratiemethode	Float-up-methode	Aspiratiemethode
Totale sperma-output	1 810 \pm 718,1 miljoen ^a	694 \pm 244,5 miljoen ^b	-	-
Motiliteit (%)	75 \pm 4,1	70 \pm 5,3*	52 \pm 9,4	44 \pm 9,4*
Levend (%)	88 \pm 1,6	89 \pm 1,5	88 \pm 1,6	87 \pm 2,4
Abnormale morfologie (%)	51 \pm 4,4	60 \pm 6,7	74 \pm 4,6	80 \pm 4,0

Verschillen waarbij de p-waarde kleiner is dan 0,05 worden als significant beschouwd en worden weergegeven met een verschillend superscript. Verschillen met een p-waarde kleiner dan 0,1 worden beschouwd als een trend en worden aangeduid met een asterisk.

den oppervlak van de epididymis en een grotere tijdspanne. Door de vele incisies bij de float-up-methode kunnen spermacellen uit het hele parenchym van de epididymis gedurende dertig minuten zwemmen. Bij de aspiratiemethode kunnen echter alleen de spermatozoa die aanwezig zijn in het vocht dat uit de incisie vloeit, verzameld worden. De cellen die nog achterblijven in het parenchym dat niet ingesneden is, worden niet verzameld door de beperkte zuigkracht van de pipet. De betere kwaliteit van het staal gewonnen via de float-up-methode kan mogelijk verklaard worden door de verschillende mate waarin beide technieken interfereren: bij de aspiratiemethode is er een hoger risico op beschadiging door de kracht van de aspiratie alsook door schuimvorming door het intensiever mengen met lucht. Opmerkelijk in de voorliggende studie is de afwezigheid van het nadelige effect van bloedcontaminatie met de float-up-methode. Hoewel op Figuur 4 duidelijk zichtbaar is dat in het staal gewonnen via de float-up-methode meer bloed aanwezig was dan in het staal verkregen met de aspiratiemethode, was de spermakwaliteit zowel voor als na het invriezen beter. Zodoende lijkt het dat bloedcontaminatie geen nadelige invloed heeft op het sperma indien het behandeld wordt zoals in de voorliggende studie.

CONCLUSIE

In deze studie werd aangetoond dat de float-up-methode verkozen dient te worden boven de aspiratiemethode voor het verzamelen van epididymaal sperma. Toch garandeert kunstmatige inseminatie met epididymaal sperma verzameld met de float-up-methode geen succesvolle bevruchting. Tussen het moment van sperma-verzameling en de fertilisatie van de oocyt is er een aantal factoren die het succes van de inseminatie bepalen. In de voorliggende studie werd enkel aangetoond dat de float-up-methode geprefereerd dient te worden boven de aspiratiemethode. Dit beslaat echter slechts één stap in de complexe procedure van kunstmatige inseminatie met epididymaal sperma. Bovendien zijn de conceptie-resultaten verre van ideaal te noemen. Om de kans op conceptie en de worpgrootte bij gebruik van epididymaal sperma te verhogen, dient nog verder onderzoek te gebeuren naar de invloed van het gebruik van alternatieve verdunners en van de componenten van prostaatvocht om de resultaten met dit sperma te verbeteren.

LITERATUUR

Angrimani, D.S.R., Losano, J.D.A., Lucio, C.F., Veiga, G.A.L., Pereda, M.C., Nichi, M., Vannucchi, C.I., (2014). Role of residual cytoplasm on oxidative status during sperm maturation in dogs. *Animal Reproduction Science* 151, 256-261.

Angrimani, D.S.R., Losano, J.D.A., Lucio, C.F., Veiga, G.A.L., Landim, F.C., Nichi, M., Vannucchi, C.I., (2017). Cytoplasmic droplet acting as a mitochondrial modulator during sperm maturation in dogs. *Animal Reproduction Science* 181, 50-56.

Angrimani, D.S.R., Nichi, M., Losano, J.D.A., Lucio, C.F., Veiga, G.A.L., Franco, M.V.M., Vannucchi, C.I., (2017). Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8, 18.

De Pauw, I. M. C., Van Soom, A., Mintiens, K., Verberckmoes, S., de Kruif, A., (2003). In vitro survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. *Theriogenology* 59, 1093-1107.

Hewitt, D.A., Leahy, R., Sheldon, I.M., England, G.C.M., (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science* 67, 101-111.

Hori, T., Ichikawa, M., Kawakami, E., Tsutui, T., (2003). Artificial insemination of frozen epididymal sperm in Beagle dogs. *The journal of Veterinary Medical Science* 66, 37-41.

Hori, T., Haguida, K., Kawakami, E., Tsutui, T., (2004). Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in Beagle dogs. *Theriogenology* 63, 1573-1583.

Hori, T., Matsuda, Y., Kobayashi, M., Kawakami, E., Tsutui, T., (2011). Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. *The journal of Veterinary Medical Science* 73, 1685-1688.

Klinefelter, G.R., Gray, L.E., Suarez, J.D., (1991). The method of sperm collection significantly influences sperm motion parameters following ethane dimethanesulphonate administration in the rat. *Reproductive Toxicology* 5, 39-44.

Kutzler, M.A., (2005). Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64, 747-754.

Linde-Forsberg, C., (2010). Canine artificial insemination: State of the art. In: *Proceedings 7th EVSSAR Congress*, Louvain-La-Neuve, Belgium, pp. 22-26.

Marks, S.L., Dupuis, J., Michelsen, W.D., Menton, M.A., Platz, C.C. Jr., (1994). Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 204, 1639-1640.

Peña, F.J., Núñez-Martínez, I., Morán, J.M., (2006). Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction of Domestic Animals* 41, 21-29.

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., de Kruif, A., (2003). Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 61, 1589-1602.

Rijsselaere, T., Maes, D., Van den Berghe, F., Van Soom, A., (2011). Preservation and shipment of chilled and cryopreserved dog semen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 80, 248-253.

Schäfer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., Aurich, C., (2006). Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66, 173-182.

Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal, L.A., Foote, R.H., Hurtt, M.E., Klinefelter, G.R., Makris, S.L., Perreault, S.D., Schrader, S. (1996). Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology* 10, 237-244.

Wydooghe, E., Snoeck, F., Van Soom, A., (2016). Establishment of live birth following intravaginal artificial insemination with chilled epididymal dog semen collected post mortem: case report. In: *Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR (Paris, France)*, 231.