

NIEUWE INSEMINATIETECHNIEKEN BIJ DE MERRIE

J. Govaere, M. Hoogewijs, L. Paijmans, I. Van Crombruggen, P. Riga, J. Sterckx, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
jan.govaere@Ugent.be

SAMENVATTING

Kunstmatige inseminatie wordt bij het paard al bijna 100 jaar routinematig uitgevoerd. Meestal wordt het sperma aan een dosis van 500 miljoen tot 1 miljard spermatozoïden intra-uterien gedeponereerd onder vaginale controle. De grote populariteit van hengsten met hoogwaardige genetica en de beperkte voorraad aan zaad van hengsten die eventueel al gestorven zijn, leiden ertoe dat steeds kleinere inseminatiedosissen gebruikt worden. Het gebruik van verlaagde inseminatiedosissen heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende nieuwe inseminatietechnieken die reeds met wisselend succes uitgeprobeerd werden. De diepe inseminatie ter hoogte van de utero-tubale papil onder rectale begeleiding is een "blinde" inseminatie en heeft als nadeel dat door het inbrengen van de pipet de baarmoeder kan beschadigd worden, wat kan leiden tot verminderde drachtigheidsresultaten. Door te insemineren met behulp van hysteroscopie tot bij de papil kan dit probleem omzeild worden en kunnen met relatief lage dosissen aanvaardbare drachtigheidsresultaten bekomen worden. Andere technieken, zoals diepe inseminatie via laparoscopie, diepe inseminatie in de oviduct, intrafolliculaire inseminatie of intraperitoneale inseminatie, zijn in de literatuur beschreven, maar kunnen in de praktijk niet routinematig worden gebruikt.

INLEIDING

De klassieke kunstmatige inseminatie bij de merrie behelst dat het sperma door middel van een pipet tot juist voorbij de cervix, in het corpus van de baarmoeder wordt ingebracht. Dit kan onder manuele begeleiding in de vagina of beter, door de pipet via een steriel speculum tot in de cervix te brengen.

Bij een normale inseminatie met vers sperma bedraagt de dosis tussen 200 (Hyland and Bristol, 1979) en 500×10^6 (Squires *et al.*, 1999; Lindsey *et al.*, 2001) progressief motiele spermatozoa (pms). Bij sommige zeer fertiele hengsten kan men bij het gebruik van vers sperma de inseminatiedosis verlagen tot 100×10^6 pms zonder dat het bevruchtigingspercentage vermindert. In geen geval mag bij de normale inseminatietechniek de inseminatiedosis minder zijn dan 100×10^6 pms, omdat dan het drachtigheidspercentage sterk achteruitgaat (Demick, 1976; Yates en Whitacre, 1988; Brinsko en Varner, 1992). Indien er gekoeld sperma wordt gebruikt dan wordt, naargelang het aantal vereiste dosissen, ongeveer 1×10^9 pms ingebracht. Bij het gebruik van diepvriessperma wordt er 300×10^6 tot 1×10^9 pms

ingebracht (Squires *et al.*, 1999; Pickett *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2001).

Dergelijke hoge inseminatiedosissen beperken in sterke mate het aantal merries dat kan worden geïnsemineerd met één ejaculaat. Het aantal spermacellen moet immers voldoende hoog zijn om bevruchting te garanderen. Niet al het sperma dat ingebracht wordt, bereikt zijn bestemming. De baarmoeder van de merrie functioneert als een soort filter en laat slechts een beperkt aantal spermatozoa toe tot de oviduct, de plaats waar de bevruchting plaatsvindt (Rigby *et al.*, 2000). Toch is het om verschillende redenen interessant om de hoeveelheid spermacellen die bij de merrie dient ingebracht te worden, te trachten te verminderen met het behoud van de bevruchtigingsresultaten. Ten eerste kan men dan natuurlijk veel meer merries insemineren met hetzelfde ejaculaat. Ten tweede is het zo dat er bij het gebruik van diepvriessperma altijd een (milde) endometritis ontstaat die langer aanhoudt dan bij het gebruik van vers sperma (Troedsson *et al.*, 1998). Het verminderen van de spermadosis en het verder in de baarmoeder brengen van het sperma tot aan de utero-tubale papil kunnen de ernst van een en-

dometritis verminderen (Hunter en Greve, 1998; Lindsay *et al.*, 2001; Nie *et al.*, 2003).

Ten derde is men sinds kort in staat om het sperma te 'seksen'. Dit houdt in dat een spermastaal gescheiden wordt in X- en Y-chromosoomdragende spermacellen, waardoor men het respectievelijk voor de productie van uitsluitend merrie- en hengstenveulens kan gebruiken (Amann, 1999). De mogelijkheid om sperma te 'seksen' was een van de belangrijkste drijfveren om het insemineren met een verlaagde dosis op punt te stellen. Met een sorteringsratio van 1000 spermatozoa per seconde duurt het verschillende dagen voordat een normale inseminatiedosis met 'gesekst' sperma kan worden verkregen. Wanneer men met een dosis van 5 miljoen spermatozoa normale drachtigheidsresultaten zou kunnen bereiken dan wordt inseminatie met 'gesekst' sperma haalbaar (Lindsey *et al.*, 2000a).

Een bijkomend voordeel van diepe inseminatietechnieken is dat sperma van mindere kwaliteit of dat afkomstig is van reeds gestorven hengsten, efficiënter kan worden gebruikt (Lindsay *et al.*, 2001).

Uit het bovenstaande blijkt duidelijk dat het toepassen van alternatieve inseminatietechnieken waarbij minder sperma gebruikt wordt, meer en meer in de belangstelling komt. Grosso modo zijn er twee verschillende mogelijkheden om met een verlaagde spermadosis te insemineren: met name (video)endoscopische inseminatie ter hoogte van de papil, ofwel diepe inseminatie onder rectale begeleiding (al dan niet echografisch gecontroleerd). De laparoscopische inseminatie in de oviduct en de intraperitoneale inseminatie verkeren nog in een experimenteel stadium.

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van deze technieken en worden de resultaten ervan besproken.

DE VERDELING VAN HET SPERMA IN HET GESLACHTSAPPARAAT VAN DE MERRIE

Bij een normale dekking of inseminatie worden de meeste spermatozoa gedeponerd in het corpus uteri van de merrie. Het transport naar de oviduct gebeurt enerzijds door de activiteit van de spermatozoa en anderzijds door gecoördineerde contracties van de gladde spiercellen van het myometrium en de myosalpinx. Deze contracties treden waarschijnlijk op ten gevolge van oxytocineafgifte veroorzaakt door de dekking (Nikolakopoulos *et al.*, 2000). Reeds 2 uur na de inseminatie in het corpus kunnen er bij de utero-tubale verbinding spermatozoïden gevonden worden in de epitheliale plooien aan de uteriene en de lumenale

kant van de papil (Bader, 1982). Het spermatransport naar de oviduct is voltooid binnen de vier uur (Brinko *et al.* (1991). Scott *et al.* (2002) konden sperma aantonen, in hechte interactie met het lumenale epitheel, ter hoogte van de utero-tubale verbinding, hetgeen sterk gelijkt op de interacties die worden gezien bij andere species met een bekend preovulatoir spermareservoir.

Sperma wordt dus voornamelijk getransporteerd door de contracties van de baarmoeder. De myometriale activiteit verloopt in twee fasen waarbij de eerste fase bestaat uit contracties gericht naar de top van de baarmoederhoorn terwijl de tweede fase gericht is naar de cervix. De initiële activiteit duurt ongeveer 30 minuten en wordt gevolgd door de tweede fase die ongeveer 4 uur na de inseminatie begint en toeneemt tot minstens 12 uur na de inseminatie. Deze tweede fase lijkt sterk op de baarmoederactiviteit die wordt gezien na de inoculatie van bacteriën in de baarmoeder bij gezonde merries en zou dus het gevolg kunnen zijn van de ontstekingsreactie veroorzaakt door het sperma. Door dit proces komt er slechts een klein deel van het geïnsemineerde sperma op de plaats van fertilisatie. Reeds 20 minuten na de inseminatie is door de peristaltiek van de baarmoeder het grootste deel van het inseminaat naar buiten gebracht (Katila *et al.*, 2000). Tijdens het transport van de spermatozoïden naar de plaats van fertilisatie neemt hun aantal dus zeer snel af (Hunter en Greve, 1998). Dit gebeurt deels door de retrograde flow en deels door de fagocytose gedurende het transport doorheen de baarmoeder (Hawk, 1983).

Naargelang men vers, verdund of diepvriessperma gebruikt, bedraagt het verlies te wijten aan de retrograde flow, respectievelijk 25%, 74% en 96% (Troedsson *et al.*, 1998). Een mogelijke verklaring van deze verschillen in expulsie van vers, gekoeld en diepvriessperma zou kunnen liggen in het verschil in membraanbeschadiging van de spermatozoa door de verwerking (Troedsson *et al.*, 1998).

Daar waar de capacitatie en de selectie van het sperma bij de meeste diersoorten tijdens het transport door de cervix gebeuren, vinden ze bij de merrie plaats in de buurt van de utero-tubale junctie (UTJ), ook wel papil genoemd of, met de anatomisch correcte benaming, pars uterina tubae uterinae. De UTJ treedt waarschijnlijk ook op als filter om te verhinderen dat te grote aantallen spermatozoa de bevruchttingsplaats in de ampulla bereiken. Aldus wordt het risico op polyspermie gereduceerd (Boyle *et al.*, 1987). De spermatozoa worden opgeslagen in de oviduct totdat de ovulatie optreedt. Door deze tijdelijke opslag worden de spermatozoïden beschermd tegen

fagocytose door de polymorfonucleaire leukocyten. Het gedeelte van de oviduct waar het sperma wordt opgeslagen, is de caudale isthmus. Dit is ook bij de merrie het spermareservoir waar de spermacellen verblijven tot juist vóór de ovulatie (Boyle *et al.*, 1987; Troedsson *et al.*, 1998). Omdat er bij een inseminatie na ovulatie ook een goede kans bestaat op bevruchting, leiden Troedsson *et al.* (1998) daaruit af dat een verlengde opslag van het sperma geen noodzakelijke voorwaarde is voor de capacitatie van het sperma.

De vorming van het spermareservoir gebeurt door een lectinegemedieerde binding van het sperma aan het oviductepitheel in de isthmus (Lefebvre *et al.*, 1995). Deze binding houdt de calciumconcentratie in de spermatozoa op een basaal niveau en voorkomt zo de capacitatie. Hierdoor wordt de levensduur van het sperma in het vrouwelijk geslachtsstelsel verlengd (Dobrinski *et al.*, 1996b).

Tijdens de oestrus is het oppervlak van de UTJ en van de distale oviduct moeilijk te onderscheiden van het oedemateuze oppervlak van het endometrium (Figuur 1). Het oppervlakte-epitheel van de UTJ of papil is gespannen, oedemateus en vertoont draaiingen door verschillende additionele plooien. Na de ovulatie verdwijnt het oedeem en verminderen de transverse en secundaire rimpels van het lumenale oppervlak en blijven slechts de longitudinale plooien over. Gelijkaardige veranderingen worden gezien in het caudale deel van de oviduct daar waar deze aansluit op de UTJ (Boyle *et al.*, 1987).

Bij histologisch onderzoek van de betrokken regio worden zowel gecilieerde als niet-gecilieerde cellen aangetroffen. Sommige cellen zijn convex aan de kant van het lumen en vele cellen zijn uitgerust met microvilli en ciliën. In de distale oviduct worden de-



Figuur 1. Hysteroscopisch beeld van de papil (pars uterina tubae uterinae) waarop het inseminaat zal worden ge-deponeerd door middel van een inseminatiëpipet.

zelfde cellen gevonden. Het epitheel van de UTJ en van de caudale oviduct bij de merrie vertoont sterke gelijkenissen met dat van de zeug. Door deze gelijkenis kan verondersteld worden dat ook bij de merrie deze structuren functioneren als een mechanische klep die in staat is om het lumen van de oviduct af te sluiten (Boyle *et al.*, 1987).

Ondanks de verschillende plooien en crypten ter hoogte van de UTJ blijven de spermatozoiden er kwetsbaar voor leukocyten. De spermatozoa kunnen door hun motiliteit ontsnappen aan fagocytose en kunnen een “functioneel spermareservoir” vormen in de caudale isthmus van de oviduct (Gaddum-Rose, 1981). In de oviduct worden dan ook procentueel meer morfologisch normale spermatozoiden gevonden dan bij de UTJ (Ellington *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2000). Door de tijdelijke opslag van het sperma in dit functioneel spermareservoir wordt de kans op polyspermie verkleind (Hunter, 1972) en wordt de fertiliteit van het sperma langer op peil gehouden mede door het feit dat de capacitatie en de hyperactivatie van de spermatozoiden worden uitgesteld (Dobrinski *et al.*, 1996b).

Het vrijkomen van spermatozoa uit het reservoir wordt beïnvloed door het ovulatietijdstip. Er blijken grote variaties te bestaan betreffende het spermtransport en de -overleving tussen fertiele en subfertiele hengsten, tussen fertiele en subfertiele merries en tussen vers en diepvriessperma in vivo, wat resulteert in een zeer grote variatie in bevruchtingsresultaten (Dobrinski *et al.*, 1996a; Ellington *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 1995; Troedsson *et al.*, 1998).

Het inbrengen van alleen spermatozoiden, dus zonder zaadplasma of bacteriële contaminanten, veroorzaakt reeds een influx van neutrofielen in de baarmoeder. Spermatozoiden induceren chemotaxis van neutrofielen via complementactivatie. Zaadplasma heeft daarentegen een onderdrukkend effect op deze chemotaxis en ook op de migratie van macrofagen. Een voorbijgaande endometritis na dekking of inseminatie is dus een fysiologisch gebeuren. Dit heeft als doel het overschot aan spermatozoa, zaadproducten en bacteriële contaminanten op te ruimen (Troedsson *et al.*, 1998; 1999; Alghamdi *et al.*, 2004).

Bij de klassieke inseminatie met 500×10^6 pms bereikt slechts een klein aantal van de spermatozoiden de oviduct. Er werd aangetoond dat bij diepe inseminatie aan de zijde van de dominante follikel, meer spermatozoiden de oviduct bereiken dan wanneer in het corpus wordt geïnsemineerd (77% versus 54% van het ingebrachte inseminaat, Rigby *et al.*, 2000).

Door het inseminaat te deponeren dicht bij de plaats waar het zijn functie moet uitoefenen, tracht

men te besparen op de dosis en tracht men de hoeveelheid overtollig zaadplasma in de baarmoeder te beperken. Logischerwijs zal dan ook bij een diepe inseminatie met een verlaagde dosering de kwaliteit van het inseminaat van relatief groter belang zijn. Bij een doorgedreven selectie van de kwaliteit van het inseminaat (Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden) (Erel *et al.*, 2000), glass wool/Sephadex (Samper *et al.*, 1991), Silane-coating (Macpherson *et al.*, 2003), zullen de drachtigheidspercentages dan ook toenemen (Nie *et al.*, 2003).

TECHNIEKEN VOOR DIEPE INSEMINATIE BIJ DE MERRIE

Diepe inseminatie ter hoogte van de papil onder rectale begeleiding

Bij de diepe inseminatie wordt een flexibele, lange pipet in de uterus hoorn ipsilateraal van de dominante pre-ovulatoire follikel ingebracht. Men brengt de inseminatiepipet via de cervix in het lumen van de uterus, waarna onder rectale begeleiding de pipet in de goede positie wordt gebracht. Als men de positie van de pipet ter hoogte van de UTJ of papil heeft gecontroleerd door echografie of door rectale palpatie dan wordt de binnencatheter uitgeschoven naar de papil toe en kan het sperma ingebracht worden (Buchanan *et al.*, 2000; Morris en Allen, 2002; Verberckmoes *et al.*, 2002, 2003; Brinsko *et al.*, 2003).

Bij die techniek is men niet zeker waar het sperma wordt gedeponereerd. Zelfs indien er echografisch wordt gecontroleerd, kan slechts een "ruwe" schatting worden gemaakt van de lokalisatie van de pipet. Ook de lokalisatie van de papil kan variëren. Het is dan ook duidelijk dat de precisie van de spermadepositie via de rectaal begeleide (al dan niet echografisch gecontroleerde) techniek lager is dan deze die kan worden bereikt via hysteroscopie (Buchanan *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2002a).

Buchanan *et al.* (2000) zagen in hun studie dat er veel beschadigingen ontstonden van de baarmoederwand na het inbrengen van de relatief stugge pipet. Dit kan leiden tot een verminderde levensduur van het sperma en tot meer embryonale sterfte.

Volgens Lindsey *et al.* (2002) dient er bij diepe inseminatie een volume te worden gebruikt van minimaal 500 µl ten einde de passage van de spermatozoa naar de oviduct te vergemakkelijken.

Diepe inseminatie ter hoogte van de papil via hysteroscopie

Via hysteroscopie (video-endoscopie) is de utero-tubale papil gemakkelijk te visualiseren (Bracher and Allen, 1992) waardoor het mogelijk is het inseminaat precies op de papil te deponeren. Het sperma wordt op de papil gebracht via een catheter doorheen het werkkanaal van de endoscoop. Om de beeldvorming mogelijk te maken, wordt de baarmoeder opgeblazen met gefilterde lucht of CO₂-gas. De endoscoop wordt gericht naar de papil in de baarmoederhoorn aan de zijde van de dominante follikel. Het aanbrennen van het sperma in een klein volume en onder de vorm van schuim zou de adherentie aan het oppervlak van de papil vergemakkelijken. Daarna wordt de endoscoop voorzichtig teruggetrokken terwijl het gas wordt afgezogen (Morris *et al.*, 2000; Morris en Allen, 2002; Lindsay *et al.*, 2002b; Brinsko *et al.*, 2003). De depositie van het inseminaat op de papil vergemakkelijkt de intrede van het sperma in de isthmus van de oviduct. Zo vermijdt men de verspreiding van het zaad en de extensieve fagocytose die anders optreedt in het uteriene lumen (Morris *et al.*, 2000). De incidentie van "post-breedings endometritis" is na hysteroscopische inseminatie dan ook verwaarloosbaar (1% bij vers sperma (Morris *et al.*, 2000); 3,5% bij diepvriessperma (Morris *et al.*, 2000b)). Morris *et al.* (2000) noemen de hysteroscopische inseminatietechniek dan ook de minst invasieve inseminatiemethode. Door de inseminatie via hysteroscopie uit te voeren, is het ook mogelijk om de verliezen aan spermacellen in de endometriale plooien en crypten van een oedemateuze baarmoeder te beperken (Lindsey *et al.*, 2002). Hierdoor kan er worden geïnsemineerd met lagere volumes (100 µl) omdat het inseminaat nauwkeuriger in de buurt van de UTJ kan worden gebracht.

Als mogelijke technische nadelen bij deze techniek worden vermeld: de desoriëntatie van de inseminator door het torderen van de scoop in de baarmoeder (Lindsey *et al.*, 2002a) en de moeilijke lokalisatie van de papil door excessief oedeem van de baarmoederwand zodat het noodzakelijk wordt alsnog "blind" te insemineren (Morris *et al.*, 2000). Bij drie merries in een proef van Morris *et al.* (2000) waarbij deze moeilijkheid optrad, kon geen dracht bekomen worden na blinde inseminatie van 1×10^6 pms. Om die problemen te vermijden, wordt de lokalisatie van de scoop het best steeds rectaal gecontroleerd (Lindsay *et al.*, 2002a). Naast voldoende aandacht voor de vulvahygiëne en de endoscoopreiniging dient aandacht te

Tabel 1. Diepe inseminatie ter hoogte van de papil bij de merrie.

Inseminaties met	Controle	Dosis ($\times 10^6$)	Drachtigheidspercentage (16d)	Auteur
Vers sperma	echo	5	0	Lindsey et al., 2002a
	echo	5	30	Buchanan et al., 2000
	echo	5	40	Buchanan et al., 2000
	echo	5	0	Brinsko et al., 2003
	echo	25	57	Buchanan et al., 2000
	rectale	25	50	Nie et al., 2003
	rectale	25	43,3	Nie et al., 2003
	rectale	25	33	Nie et al., 2003
	echo	25	30	Buchanan et al., 2000
	echo	25	50	Buchanan et al., 2000
Gekoeld sperma	rectale	5	56	Brinsko et al., 2003
	rectale	5	50	Rigby et al., 2001
Gekoeld, gesekst sperma	rectale	20	38	Lindsey et al., 2002c
Ingevroren sperma	rectale	2×50	64*	Petersen et al., 2002
	rectale	200	20*	Squires et al., 2003

worden besteed aan het verwijderen van de lucht uit de baarmoeder na de inseminatieprocedure ten einde het risico op endometritis te minimaliseren (irritatie; Caslick, 1937).

De resultaten die werden verkregen bij de reductie van het aantal pms per inseminatiedosis wijzen erop dat 1×10^6 pms het minimumaantal spermatozoa is dat ter hoogte van de UTJ moet worden gedeponerd ten einde voldoende hoge drachtigheidsresultaten te bekomen (Morris *et al.*, 2000) (Tabel 2).

Een variant van deze techniek, waarbij sperma doorheen de papil in de oviduct wordt gebracht door deze vanuit de baarmoeder onder endoscopische begeleiding te sonderen, gaf slechts povere resultaten. Het inbrengen van de catheter in de papil is namelijk

erg moeilijk (Manning *et al.*, 1998) en veroorzaakt een lokale ontstekingsreactie (Morris *et al.*, 2000).

Diepe inseminatie in de oviduct via laparoscopie

Bij deze techniek wordt het sperma in de top van de baarmoederhoorn gebracht door middel van een laparoscopie via de paralumbale groeve, aan de zijde van de dominante follikel. Met deze techniek, waarbij er, net als bij de laparotomische inseminatie (zie verder), minimale dosissen sperma worden ingebracht (0,01% van de gebruikelijke intra-uteriene dosis, i.e. 5×10^4 pms), werden er bij andere diersoorten reeds successen geboekt (McCue *et al.*, 2000).

De laparoscopische techniek wordt voornamelijk bij het schaap toegepast om met meer rendement het

Tabel 2. Hysteroscopische inseminatie bij de merrie.

Inseminatie met	Dosis(10 ⁶)	Drachtigheids- percentage (16d)	Auteur
Vers sperma	0,001	10	Morris et al., 2000
	0,1	22	Morris et al., 2000
	0,5	29	Morris et al., 2000
	1	64	Morris et al., 2000
	4	30	Vasquez et al., 1998
	5	50	Lindsey et al., 2002a
	5	0	Lindsey et al., 2002b
Vers, gesekst sperma	5	25	Lindsey et al., 2002a
Vers sperma	5	75	Morris et al., 2000
	5	40	Squires et al., 2000
	10	60	Morris et al., 2000
Vers, gesekst sperma	20	72	Lindsey et al., 2002
Gekoeld sperma	5	67	Brinsko et al., 2003
	5	62	Rigby et al., 2001
Gekoeld, gesekst sperma	20	55	Lindsey et al., 2002
Ingevroren sperma	3	4	Morris et al., 2000b
	3,0±0,9	8	Morris et al., 2003
	3,2±1,1	14	Morris et al., 2003
	3,1±0,6	47	Morris et al., 2003
	5	38	Squires et al., 2000
	14,4±4,7	64	Morris et al., 2003
	14	64	Morris et al., 2000b

kostbare sperma van ARR-genotyperammen, die ongevoelig zijn voor Scrapie, te benutten. Bij het paard wordt deze techniek alleen gebruikt voor onderzoeksdoeleinden (Tabel 3).

Laparotomische inseminatie in de oviduct

Na laparotomie wordt een catheter in het infundibulum van de oviduct gebracht en wordt er zo geïn-

semineerd (Carnevale *et al.*, 2000; McCue *et al.*, 2000).

Een variatie op deze techniek is de zogenaamde GIFT (gamete intrafallopian transfer). Hierbij worden de spermatozoa en de oöcyten, die gecollecteerd worden uit follikels van een donormerrie, overgebracht naar de oviduct van de receptormerrie (Coutinho da Silva *et al.*, 2000; Carnevale *et al.*, 2001). Van-

Tabel 3. Inseminatie met vers sperma in de oviduct bij de merrie.

Methodie	Dosis	Drachtigheidspercentage(16d)	Auteur
Laparoscopisch	5×10^4	21	McCue et al., 2000
Hysteroscopisch	1×10^6	22	Manning et al., 1999
Hysteroscopisch	10×10^6	0	Manning et al., 1988

wege de noodzakelijke chirurgische ingreep wordt laparotomische inseminatie bij het paard weinig toegepast.

Directe intrafolliculaire inseminatie (DIFI)

Bij deze techniek worden er spermatozoïden (100×10^6 pms) rechtstreeks via punctie in de dominante follikel geïnjecteerd. De techniek van directe intrafolliculaire inseminatie (DIFI) heeft enkele interessante toepassingsmogelijkheden, met als voornaamste het omzeilen van de uteriene ontstekingsreactie na inseminatie (postbreeding endometritis) en het gebruik van oligosperme ejaculaten (ejaculaat met een te laag aantal pms) (Eilts *et al.*, 2002). Tot op heden werd er via deze techniek geen dracht bekomen.

Directe intraperitoneale inseminatie (DIPI)

Bij deze techniek wordt het sperma door middel van een punctie door de abdominale wand of doorheen de vaginawand gedeponneerd in de onmiddellijke omgeving van de ovulatiegroeve.

Het voordeel van de directe intraperitoneale inseminatie ligt voornamelijk in het feit dat het inseminaat geen hinder ondervindt van bepaalde fysische barrières, zoals de cervix en de UTJ. Het nadeel is het negatieve effect van de abdominale omgeving op de spermatozoa, de grotere kans op polyspermie en peritonitis. Ook wordt bij de muis beschreven dat er een immunisatie kan optreden tegen het geïnsemineerde zaad. Deze techniek werd tot op heden nog niet met succes toegepast bij het paard (Yanis *et al.*, 2002).

DRACHTIGHEIDSRÉSULTATEN NA DIEPE INSEMINATIE BIJ DE MERRIE

De meest gebruikte inseminatievolumes voor verdund sperma variëren van 10 tot 25 ml. Als men vlak bij het ovulatiestip insemineert, kan men een graviditeit bekomen met lagere volumes (0,5ml ingevroren/ontdood sperma). Te grote volumina (100ml en meer) geven geen extra voordeel omdat het grootste deel direct verloren gaat via de gedilateerde cervix van de merrie na de inseminatie (Yates en Whitacre, 1988; Brinsko en Varner, 1992; Troedsson *et al.*, 1998). Ook bij hysteroscopische inseminatie met diepvriessperma wordt een negatief effect gezien wanneer de inseminatievolumes groter zijn dan 12 ml (Manning *et al.*, 1998). Bij het gebruik van zeer lage volumes (0,03-0,15ml), zagen Morris *et al.* (2000a) echter geen negatief effect meer op de fertiliteit bij inseminatie met verlaagde doseringen. Leidpold *et al.* (1998) hebben aangetoond dat als er een beperkte dosis wordt gebruikt deze dosis beter in een hoge concentratie kan worden ingevroren om zo betere drachtigheidsresultaten te verkrijgen. De drachtigheidsresultaten en de *in vitro* levensvatbaarheid van de spermatozoïden zijn optimaal wanneer ze ingevroren worden aan een concentratie van 25 à 50 miljoen/ml (Varner *et al.*, 1987). Morris *et al.* (2000a) concluderen dan ook dat bij kleine volumes het aantal pms in de dosis van belang is en niet zozeer het volume van het inseminaat.

Ook de resultaten van inseminatie in het corpus met een normale dosis werden vergeleken met die van diepe inseminatie met een verminderde dosis. De waargenomen verschillen tussen de vele studies kunnen waarschijnlijk verklaard worden door verschillen in de kwaliteit van het gebruikte sperma, in de merriepopulatie en in de ervaring van de inseminator (Vidament *et al.*, 1997; Loomis, 2001; Samper, 2001; Mor-

ris en Allen, 2002). Buchanan *et al.* (2000) verkregen bij de diepe inseminatie met een honderdste van de normale dosis (5×10^6 pms in plaats van 500×10^6 pms) nog aanvaardbare drachtigheidsresultaten (30-40% versus 90%)(Tabel 1). Petersen *et al.* (2002) verkregen betere resultaten bij de verlaagde dosering (2 maal 50×10^6 pms) die diep intra-uterien werd ingebracht, dan bij de volledige dosis (2 maal 500×10^6 pms) die met de klassieke methode werd ingebracht (64% versus 37%) (Tabel 1) ($p > 0,05$).

Waar een verlaagde inseminatiedosis voornamelijk van belang is voor het optimaal gebruik van diepvriessperma, kan het ook zijn voordelen hebben bij gekoeld sperma. Rigby *et al.* (2001) verkregen dezelfde resultaten na hysteroscopische inseminatie (62%) en na rectaal begeleide inseminatie (50%) met gekoeld sperma in een dosering van 5×10^6 pms. Ook als gesekst sperma wordt gebruikt, verkrijgt men goede resultaten met een lage dosering gekoeld (en bewaard) sperma (Lindsey *et al.*, 2002)(Tabel 2).

Uit een relatief uitgebreide studie van Morris *et al.* (2000a) kan de conclusie worden getrokken dat bij hysteroscopische inseminatie minimaal 1×10^6 (Percoll geselecteerde) pms noodzakelijk is om tot acceptabele drachtigheidsresultaten te komen. De betere resultaten die door Morris *et al.* (2000) werden geboekt ten overstaan van eerdere studies (Vazques *et al.*, 1998: 33% bij $3,8 \times 10^6$ pms en Manning *et al.*, 1998: 22% bij $1,0 \times 10^6$ pms) zijn onder andere te verklaren door toepassing van de Percoll-centrifugatie-techniek. Door middel van deze techniek kan men de progressief motiele spermatozoa van het seminaal plasma scheiden, en kan men de concentratie van pms opdrijven in een beperkt inseminatievolume (Morris *et al.*, 2000a) (Tabel 2).

Bij inseminatie met de normale dosis werden er door Squires *et al.* (2003) betere resultaten bekomen na inseminatie in het corpus (50%; 10/20) dan na inseminatie in de hoorn (20%; 4/20). Ook Reger *et al.* (2001) behaalden vergelijkbare resultaten ($p = 0,05$).

Rigby *et al.* (2001) vonden bij een vergelijking van de hysteroscopische en de rectaal begeleide inseminatie met verlaagde doseringen (5 miljoen, Percoll behandeld, in $200 \mu\text{l}$) geen significante verschillen (13/21, 62% hysteroscopisch en 10/20, 50% diep intra-uterien). Ook Brinsko *et al.* (2003) vonden bij een soortgelijk experiment geen verschil tussen beide methoden.

De lagere drachtigheidsresultaten die werden bekomen in andere studies met rectaal begeleide diepe inseminatie wijten Brinsko *et al.* (2003) aan verschil-

len in spermakwaliteit, aan verschillen tussen de gebruikte merries en aan de ervaring van de inseminator.

In een interessante studie van Sieme *et al.* (2004) worden de verschillende inseminatiemethoden (routine-inseminatie in het corpus van de baarmoeder, diepe intra-uteriene inseminatie onder rectale begeleiding en de hysteroscopische inseminatie) met verschillende concentraties en zowel met vers, gekoeld als met diepvriessperma vergeleken. Hun conclusie luidde: "noch de inseminatietechniek, noch het volume of de concentratie, noch de merrie of de gebruikte hengst, hebben significante effecten op de fertiliteit" (Sieme *et al.*, 2004). Het enige significante verschil dat ze in hun studie konden aantonen was dat bij het gebruik van vers sperma bij normale merries de hysteroscopische methode betere drachtigheidsresultaten opleverde dan de routinematig toegepaste corpusinseminatie (27/38, 71% versus 18/38, 47,3%). Bij probleemmerries daarentegen, resulteerde de hysteroscopische diepe inseminatie met vers sperma in significant lagere drachtigheidsresultaten dan de conventionele corpusinseminatie (5/15, 33,3% versus 16/19, 84,2%). Dit zou kunnen verklaard worden door de hogere gevoeligheid voor infectie bij deze probleemmerries door de uteriene manipulatie.

Squires *et al.* (2003) vergeleken de "timed insemination" (twee inseminaties met elk 400×10^6 pms, 24 uur en 40 uur na ovulatie-inductie door middel van hCG) met de inseminatie na follikelopvolging om de 6 uur. Ze konden geen significante verschillen aantonen tussen de twee gebruikte inseminatieprotocollen, noch wat de drachtigheidsresultaten betrof, noch wat het optreden van "postbreeding endometritis" betrof.

Eerder werd door Petersen *et al.* (2002) aangetoond dat aanvaardbare resultaten (64%; 7/11) konden worden bekomen bij een "timed insemination" met tweemaal een verlaagde dosis van 50 miljoen pms diep intra-uterien ingebracht.

Naar analogie van een eerder uitgevoerde studie (Vidament *et al.*, 1997) besluiten Petersen *et al.* (2002) dat twee inseminaties betere resultaten geven dan één enkelvoudige inseminatie met dubbele dosering.

CONCLUSIE

Door (video)endoscopische inseminatie kan het sperma nauwkeuriger op de utero-tubale papil gedeponeerd worden dan bij een diepe inseminatie onder rectale of echografische begeleiding (Lindsay *et al.*, 2002a). Een ander voordeel van de (video)endoscopische inseminatie is dat de baarmoeder minder wordt beschadigd dan bij de rectaal begeleide diepe insemi-

natie. Een dergelijke beschadiging kan aanleiding geven tot ontsteking van het endometrium, wat nadelig is voor de ontwikkeling van het embryo (Buchanan *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2002a).

Wanneer met dosissen lager dan 5 miljoen pms wordt geïnsemineerd, worden er betere resultaten verkregen met de hysteroscopische techniek dan onder rectale begeleiding. Daarom wordt aan deze techniek de voorkeur gegeven bij het gebruik van gesekst sperma (Morris *et al.*, 2000; Lindsey *et al.*, 2001; Morris en Allen, 2002). De beste resultaten worden bekomen indien de dosis aan pms boven de drempel van 1 tot 5×10^6 wordt gehouden (Brinsko *et al.*, 2003).

Beide technieken hebben echter gelimiteerde toepassingsmogelijkheden als er sperma van infertiele (met een groot aantal kop- en middenstukafwijkingen) hengsten wordt gebruikt (Morris en Allen, 2002).

Tot op heden zijn de resultaten van hysteroscopische inseminatie beter dan die die worden bekomen onder rectale begeleiding. De diep intra-uteriene techniek geeft echter een belangrijke winst qua tijd en kosten in vergelijking met de hysteroscopische techniek. Beide technieken geven redelijke resultaten als diepvriessperma van fertiele hengsten wordt gebruikt in een verlaagde dosering (1 tot 5×10^6 pms, al dan niet gesekst). Als algemene conclusie kan gesteld worden dat de diepe inseminatietechniek onder rectale begeleiding aanvaardbare resultaten oplevert. Deze techniek is een valabel alternatief voor de hysteroscopische techniek, omdat ze gemakkelijk uitvoerbaar is onder praktijkomstandigheden (Morris en Allen, 2002; Brinsko *et al.*, 2003).

DANKBETUIGING

Met dank aan Dr. S. Verberckmoes, dierenarts P. Vervaet en dierenarts O. Aspelagh voor hun advies en aan dierenarts P. Cornillie voor het ophelderen van enige anatomische details.

LITERATUUR

Alghamdi A.S., Foster D.N., Troedsson M.H.T. (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* 127, 593-600.

Amann R.P. (1999). Issues affecting commercialization of sexed sperm. *Theriogenology* 52, 1441-1457.

Bader H. (1982). An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)* 32, 59-64.

Bedford S.J., Hinrichs K. (1994). The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. *Theriogenology* 42, 571-578.

Boyle M.S., Cran D.G., Allen W.R., Hunter R.H. (1987). Distribution of spermatozoa in the mare's oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility* 35, 79-86.

Bracher V., Allen W.R. (1992). Videoendoscopic examination of the mare's uterus. I. Findings in normal fertile mares. *Equine Veterinary Journal* 24, 274-278.

Buchanan B.R., Seidel G.E.Jr., McCue P.M., Schenk J.L., Herickhoff L.A., Squires E.L. (2000). Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. *Theriogenology* 53, 1333-1344.

Brinsko S.P., Rigby S.L., Lindsay A.C., Blanchard T.L., Love C.C., Varner D.D. (2003). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or transrectally guided insemination with low sperm numbers at the utero-tubal papilla. *Theriogenology* 59, 1001-1009.

Brinsko S.P., Varner D.D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 8, 205-218.

Brinsko S.P., Varner D.D., Blanchard T.L. (1991). The effect of uterine lavage performed four h post insemination on pregnancy rate in mares. *Theriogenology* 35, 1111-1119.

Carnevale E.M., McLellan L.J., Coutinha da Silva M.A., Scott T.J., Squires E.L. (2000). Comparison of culture and insemination techniques for equine oocyte transfer. *Theriogenology* 54, 981-98.

Carnevale E.M., McLellan L.J., Coutinha da Silva M.A., Checure C.M., Scogging C.F., Squires E.L. (2001). Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and uterine inseminations of recipients for oocyte transfer. *Animal Reproduction Science* 68, 305-314.

Caslick E.A. (1937). The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. *Cornell Veterinarian* 27, 178-187.

Coutinha da Silva M.A., Carnevale E.M., McLellan L.J., Preis K.A., Squires E.L. (2000). Embryo development rates after oocyte transfer comparing intrauterine or intraoviductal insemination and fresh or frozen semen in mares. *Theriogenology* 55, 359.

Demick D.S., Voss J.L., Picket B.W. (1976). Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal of Animal Science* 43, 633-637.

Dobrinski I., Suarez S.S., Ball B.A. (1996b). Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biology of Reproduction* 54, 783-788.

Dobrinski I., Thomas P.G.A., Timothy Smith T., Ball B.A. (1996a). Sperm-oviduct interaction: role of sperm adhesion and effect of sperm cryopreservation. *Reproduction* 42, 144-145.

Eilts J.E., Pinto C.R.F., Paccamonti D.L., Niemanstverdreit A.S., Garcia E., Godke R.A. (2002). Transvaginal intrafollicular sperm cell injection with concomitant artificial insemination in the cyclic mare. *Theriogenology* 58, 631-633.

- Ellington J.E., Samper J.C., Jones A.E., Oliver S.A., Burnett K.M., Wright R.W. (1999). In vitro interactions of cryopreserved spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Animal Reproductive Science* 56, 51-65.
- Erel C.T., Senturk L.M., Irez T., Ecran L., Elter K., Colgar U., Ertungealp E. (2000). Sperm preparation techniques for men with normal and abnormal semen analysis. A comparison. *Journal of Reproductive medicine* 45, 917-922.
- Gaddum-Roze P. (1981). Some observations on sperm transport through the utero-tubal junction of the rat. *American Journal of Anatomy* 160, 333-341.
- Hawk H.W. (1983). Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science* 66, 2645-2660.
- Hunter R.H.F. (1972). Local action of progesterone leading to polyspermic fertilisation in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 31, 433-444.
- Hunter R.H.F., Greve T. (1998). Deep intrauterine insemination of cattle: a fruitful way forward with smaller numbers of spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica* 39, 149-163.
- Hyland J.H., Bristol F. (1979). Synchronisation of oestrus and timed insemination of mares. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)* 27, 251-255.
- Katila T., Sankari S., Mäkelä O. (2000). Transport of spermatozoa in the genital tracts of mares. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)* 56, 571-578.
- Lefebvre R., DeMott R.P., Suarez S.S., Samper J.C. (1995). Specific inhibition of equine sperm binding to oviductal epithelium. *Biology of Reproduction Monograph Series I*, 689-696.
- Leipold S.D., Graham J.K., Squires E.L., McCue P.M., Brinsko S.P., Vanderwall D.K. (1998). Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology* 49, 1537-1543.
- Lindsey A.C., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2001). Low dose insemination of mares using non-sorted and sex sorted sperm. *Animal Reproduction Science* 68, 279-289.
- Lindsey A.C., Morris L.H.A., Allen W.R., Schenk J.L., Squires E.L., Bruemmer J.E. (2002a). Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34, 128-132.
- Lindsey A.C., Morris L.H.A., Allen W.R., Schenk J.L., Squires E.L., Bruemmer J.E. (2002b). Low dose hysteroscopic insemination of mares with fresh and sex sorted spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34, 128-132.
- Lindsey A.C., Schenk J.L., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2002). Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal* 34, 121-127.
- Lindsey A.C., Varner D.D., Seidel G.E.jr., Bruemmer J.E., Squires E.L. (2002c). Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18h at either 15°C prior to flow-cytometric sorting. *Theriogenology* 58, 659-662.
- Loomis P.R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science* 68, 191-200.
- Macpherson M., Blanchard T.L., Love C.C., Brinsko S.P., Thompson J.A., Varner D.D. (2003). Use of a Silane-Coated Silica Particle Solution to Enhance Semen of Stallions. In *49th annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 2003, New Orleans, Louisiana.
- Manning S.T., Bowman P.A., Fraser L.M., Card C.E. (1998). Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. *Proceedings of Annual Meeting Society of Theriogenology*, Baltimore, M.D., 84-85.
- McCue P.M., Fleury J.J., Denniston D.J., Graham J.K., Squires E.L. (2000). Oviductal insemination of mares. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)* 56, 499-502.
- Morris L.H.A., Hunter R.H.F., Allen W.R. (2000a). Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 95-100.
- Morris L.H.A., Tiplady C., Wilsher S., Allen W.R. (2000b). Hysteroscopic utero-tubal insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. *Proceedings of the 5th International Symposium on equine Embryo Transfer. Havemeyer Foundation Monograph Series* 3, 4-6.
- Morris L.H.A., Allen W.R. (2002). An overview of low dose insemination in the mare. *Reproduction of Domestic Animals* 37, 206-210.
- Morris L.H.A., Tiplady C., Allen W.R. (2003). Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. *Equine Veterinary Journal* 35, 197-201.
- Nie G.J., Johnson K.E., Wenzel J.G.W. (2003). Pregnancy outcome in mares following insemination deep in the uterine horn with low numbers of sperm selected by glass wool/Sephadex separation or absolute number. *Animal Reproduction Science* 79, 103-109.
- Nikolakopoulos E., Kindahl H., Gilbert C.L., Goode J., Watson E.D. (2000). Release of oxytocin and prostaglandin F₂ around teasing, natural service and associated events in the mare. *Animal Reproduction Science* 63, 89-99.
- Petersen M.M., Wessel M.T., Scott M.A., Liu I.K.M., Ball B.A. (2002). Embryo recovery rate in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 58, 663-665.
- Pickett B.W., Voss J.L., Squires E.L., Vanderwall D.K., McCue P.M., Bruemmer J.E. (2000). Collection, Preparation and Insemination of Stallion semen. *Bulletin No.10. Animal Reproduction and Biotechnology laboratory, Colorado State University, Colorado*.
- Rigby S.L., Derczo S., Brinsko S., Blanchard T., Taylor T., Forrest D.W., Varner D. (2000). Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. *Proceedings of 46th AAEP, San Antonio, TX*, 332-334.

- Rigby S.L., Lindsey A.C., Brinsko S.P., Blanchard T.L., Love D.D. (2001). Pregnancy rates in mares following hysteroscopic or rectally guided utero-tubal insemination with low sperm numbers. *Proceedings of the 3rd International Symposium on Stallion Reproduction 2001 (abstract)*, 49.
- Samper J.C. (2001). Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science* 68, 219-228.
- Samper J.C., Hellander J.C., Crabo B.G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen quality. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107-114.
- Scott M.A., Liu I.K., Overstreet J.W. (1995). Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. *Proceedings of the 41th Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, 1-2.
- Scott M.A., Liu I.K.M., Overstreet J.W., Enders A.C. (2000). The structural morphology and epithelial association of spermatozoa at the utero tubal junction: a descriptive study of equine spermatozoa in situ using scanning electron microscopy. *Journal of Reproduction and Fertility (Suppl.)* 56, 415-421.
- Scott M.A., Varner D.D., Liu I.K.M., Enders A.C. (2002). Presumptive evidence of preovulatory sperm reservoir in the mare: morphological investigations using scanning electron microscopy. *Theriogenology* 58, 639-642.
- Sieme H., Bonk A., Hamann H., Klug E., Katila T. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology* (in press).
- Squires E.L., Picket B.W., Graham J.K., Vanderwall D.K., McCue P.M., Bruemmer J.E. (1999). Cooled and Frozen stallion semen. *Collin State University, Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin No 09, Fort Collins, CO*.
- Squires E.L., Lindsey A.C., Bruemmer J.E. (2001). Sex selection of stallion spermatozoa. *Proceedings of the Havemeyer Foundation Workshop: from epididymis to embryo. New Orleans*, 16.
- Squires E.L., Barbacini S., Necchi D., Reger H.P., Bruemmer J.E. (2003). Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. *49th annual convention of the American Association of Equine Practitioners, 2003, New Orleans, Louisiana*.
- Troedsson M.H.T., Liu I.K.M., Crabo B.G. (1998). Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology* 50, 807-818.
- Troedsson M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52, 461-471.
- Varner D.D., Blanchard T.L., Love C.L., Garcia M.C., Kenney R.M. (1987). Effects of semen fractionation and dilution ration on spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 28, 709-723.
- Vazquez J.J., Medina V., Lui I.K., Ball B.A., Scott M.A. (1998). Non-surgical uterotubal insemination of the mare. *Proceedings of Annual Meeting Society of Theriogenology, Baltimore, MD*, 82-83.
- Verberckmoes S., A.Van Soom, I.De Pauw, J.Dewulf, A.de Kruif (2003). Deep intra-uterine insemination of dairy cattle under field conditions. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 72, 202-209.
- Verberckmoes S., de Pauw I., van Soom A., Dewulf J., de Kruif A. (2002). Assessment of a new deep intra uterine insemination device in dairy cattle under field conditions. *VIIth annual Conference of ESDAR, Parma 12-14 september 2002, Reproduction in Domestic Animals* 37, 255.
- Vidament M., Dupere A.M., Julienne P., Evain P., Noue P., Palmer E. (1997). Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917.
- Yanis J.L., Lopez-Bejar M., Santolaria P., Rutllant J., Lopez-Gatius F. (2002) Intraperitoneal insemination in mammals: a review. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 75-80.
- Yates D.J., Whitacre M.D. (1988). Equine artificial insemination. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2, 291-304.