

KUNSTMATIGE INSEMINATIE BIJ DE HOND

T. Rijsselaere, A. Van Soom, W. Van Den Broeck, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
tom.rijsselaere@rug.ac.be

SAMENVATTING

De laatste jaren is er een groeiende interesse voor kunstmatige inseminatie (KI) bij de hond, voornamelijk vanuit de sector van de hondenfokkerij. Naast economische overwegingen zijn anatomische en psychologische afwijkingen bij de reu of de teef en de mogelijkheid om meer dan één teef met hetzelfde ejaculaat te insemineren de belangrijkste beweegredenen om tot KI over te gaan. KI bij een teef kan met vers sperma, met gekoeld sperma of met diepvriessperma gebeuren. De bepaling van het juiste inseminatietijdstip gebeurt door een combinatie van verschillende methoden, zoals progesteronbepaling, vaginoscopie, vaginale cytologie en het observeren van fysische veranderingen en gedragsveranderingen bij de teef. Vers of gekoeld sperma kan diep vaginaal geïnsemineerd worden door middel van een plastic inseminatiepipet of een osirispipet. Een eerste inseminatie wordt uitgevoerd op de dag van de ovulatie gevolgd door een tweede inseminatie twee dagen later. Diepvriessperma wordt door zijn verminderde motiliteit en beperkte levensduur bij voorkeur rechtstreeks in de baarmoeder gebracht. Intra-uteriene inseminatie kan plaatsvinden door middel van laparotomie, wat ethisch omstreden is. Betere technieken zijn inseminatie met een transcervicale katheter of inseminatie met een katheter onder endoscopische visualisatie. Inseminatie met diepvriessperma vereist bovendien een exacte bepaling van het inseminatietijdstip. Bepaling van de concentratie van progesteron in het bloed is hiervoor de meest betrouwbare methode: progesterongehalten van 10 ng/ml bij de eerste inseminatie en 18-25 ng/ml bij de tweede inseminatie zijn een goede leidraad. De drachtigheidpercentages na KI met vers sperma variëren van 60 tot 94%. Na KI met diepvriessperma liggen deze lager. Recente studies vermelden echter betere drachtigheidpercentages die vergelijkbaar zijn met die van vers sperma, indien een goede invriestechniek en inseminatiemethode gebruikt worden en er een correcte foktechnische begeleiding plaatsvindt.

INLEIDING

Hoewel het gebruik van KI bij sommige diersoorten (rund en varken) sinds de eerste helft van de twintigste eeuw een enorme toename heeft gekend, is dit bij de hond tot op heden niet gebeurd en staat in België KI bij deze diersoort nog in de kinderschoenen. De redenen zijn: het beperkt aantal teven dat kan geïnsemineerd worden met één ejaculaat, de moeilijke bereikbaarheid van de cervix en de uterus, de problemen om de cyclus van de teef te synchroniseren, de korte levensduur van ontdooid, ingevroren sperma en de minder goede drachtigheidresultaten.

Ondanks deze moeilijkheden blijkt KI bij de hond aan populariteit te winnen, voornamelijk wegens zoötechnische en economische redenen. Vanuit de sector van de hondenfokkerij is er een groeiende belangstelling voor KI, aangezien steeds meer gebruik

gemaakt wordt van internationaal geïmporteerd sperma bij het fokken van rashonden.

Alvorens tot KI wordt besloten, is het beslist noodzakelijk het sperma van de desbetreffende reu eerst te onderzoeken om te bepalen of het sperma wel bevruchtingskrachtig is. Een gedegen kennis met betrekking tot de behandeling van hondensperma en de toepassing van KI is absoluut noodzakelijk om succes te boeken. KI kan uitgevoerd worden met vers sperma, met gekoeld sperma (Pinto *et al.*, 1999) of met ingevroren sperma (Linde-Forsberg en Forsberg, 1989; Fontbonne en Badinand, 1993; Wilson, 1993). De houdbaarheid van hondensperma is in sterke mate afhankelijk van de bewaarmethode (England, 1998b). Vers bewaard en gekoeld tot kamertemperatuur is hondensperma ongeveer vier uur houdbaar. Wanneer het in een geschikte verdunner wordt gebracht en gekoeld wordt tot 5°C, kan het twee tot vier dagen be-

Kader 1: Indicaties voor KI bij de hond.

1. Economische - foktechnische redenen
2. Inseminatie van verschillende teven met een ejaculaat
3. Anatomische afwijkingen bij de reu of de teef
 - ◆ Problemen bij het bestijgen van de teef
 - ◆ Verworven defecten van de penis: trauma's, laceraties, neoplasie van de penis of het preputium
 - ◆ Vaginale stricturen
4. Psychologische factoren bij de reu of de teef
 - ◆ Dominante teef
 - ◆ Te weinig libido
 - ◆ Onervaren reu of onbereidwillige teef
 - ◆ Eerste dekking tussen twee onervaren dieren
 - ◆ Dekking in een ongeschikte omgeving
5. Sanitaire redenen

waard worden. Sperma dat ingevroren wordt in vloeibare stikstof (-196°C) is onbepaald houdbaar en kan op ieder tijdstip ontdooid en geïnsemineerd worden (England, 1998b; Van Soom *et al.*, 2001b).

Verschillende factoren beïnvloeden de resultaten die met KI bij de hond behaald worden. Een aantal van deze factoren vereist nog nader onderzoek. Verrassend genoeg is er bijvoorbeeld weinig bekend over de relatie tussen spermakwaliteit en vruchtbaarheid. Verder is er weinig informatie over het minimum aantal spermacellen dat nodig is om drachtigheid te bewerkstelligen. Het inseminatietijdstip, het aantal inseminaties en de plaats waar het sperma moet worden ingebracht zijn eveneens belangrijke factoren (Morton en Bruce, 1989). Door de hoge kosten die gepaard gaan met het invriesproces en het intra-uterien insemineren van ingevroren sperma, is de behoefte aan optimalisatie van deze factoren groot (Farstad en Andersen Berg, 1989).

In dit overzichtsartikel wordt dieper ingegaan op de mogelijke indicaties om tot KI over te gaan, op het belang van het juiste inseminatietijdstip en de correcte inseminatiedosis, op de verschillende inseminatietechnieken en de bereikte drachtigheidresultaten.

INDICATIES VOOR KI

Grosso modo zijn er een vijftal redenen waarom tot KI kan overgegaan worden (Kader 1). Import van nieuw genetisch materiaal bleek in een grootschalige studie in Zweden de belangrijkste reden voor KI te zijn (Linde-Forsberg en Forsberg, 1993). Wanneer er met buitenlandse fokdieren gewerkt wordt of wan-

neer meerdere teven geïnsemineerd moeten worden met één ejaculaat, is het aan te raden om het sperma in te vriezen of het vers verdund te bewaren en te transporteren. Transport en import van sperma van buitenlandse reuen zijn immers gemakkelijker en goedkoper dan transport van de honden zelf.

Anatomische afwijkingen of psychologische factoren bij de reu of de teef vormen de belangrijkste indicaties om over te gaan tot KI met vers sperma. Ook het vermijden van dekinfecties (onder andere transmissibel venereaal granuloom) en andere infectieuze ziekten is bij sommige hondenfokkers een belangrijke reden om KI te gebruiken.

Het spreekt voor zich dat KI ethisch niet verantwoord is bij problemen te wijten aan een erfelijke afwijking.

DE BEPALING VAN HET INSEMINATIETIJDSTIP

Naast een aangepaste en juiste inseminatietechniek is een goede foktechnische kennis een van de belangrijkste vereisten voor het welslagen van KI. Hierbij is het bepalen van het optimale inseminatietijdstip van groot belang, zeker wanneer ingevroren sperma of sperma van mindere kwaliteit gebruikt wordt.

Teven accepteren de reu gedurende een lange periode (gemiddeld 9 dagen). Dit wil echter niet zeggen dat ze gedurende gans deze periode bevrucht kunnen worden. Een hondeneicel wordt immers in een immature toestand geovuleerd 24 tot 48 uur na de LH-piek. Na de ovulatie heeft de eicel nog een maturatietijd van 48 tot 72 uur nodig alvorens ze bevrucht kan worden (Morton en Bruce, 1989; Rota *et al.*, 1999). Vervol-

gens blijft de eicel 2 dagen vruchtbaar (Tsutsui, 1989). Bijgevolg is de periode van 2 tot 5 dagen na de ovulatie de meest geschikte periode om een teef te laten dekken of te insemineren. Hoewel de ovulatie bij de teef gemiddeld 12 dagen na het begin van de pro-oestrus plaatsvindt, vertoont het ovulatiestip een grote variatie (dag 7-22; Johnston, 1995). Verschillende methoden werden beschreven om het ovulatiestip te voorspellen. Samen met fysische veranderingen en gedragsveranderingen bij de teef laten deze methoden toe om het juiste inseminatiestip te bepalen.

Fysische veranderingen en gedragsveranderingen

Tijdens de pro-oestrus is de teef aantrekkelijk voor de reu maar ze laat beslist geen dekking toe. Zwelling van de vulvalippen, frequenter urineren en het verschijnen van serohemorragische uitvloei kunnen tijdens de pro-oestrus geobserveerd worden. De oestrus start als de teef de dekking toelaat. Tijdens de oestrus vertoont de teef de sta-reflex en druk op de rug of perivulvaire induceert het opzighouden van de staart (staart-reflex). De uitvloei vermindert geleidelijk en het bloederig aspect neemt af, hoewel dit niet altijd wordt waargenomen.

Progesteronbepaling

Progesteronbepaling in het bloed geeft een betrouwbare indicatie van het ovulatiestip (Tabel 1). Progesteron kan bepaald worden door middel van RIA (laboratorium) en ELISA. De waarden worden uitgedrukt in ng/ml of in nmol/l (1 ng/ml = 3,25 nmol/l). Staalname kan het best om de 2 à 3 dagen vanaf de zevende dag van de pro-oestrus plaatsvinden.

Tabel 1. Progesteronverloop bij de teef.

Progesteronwaarde (ng/ml)	Fysiologie
< 2	Anoestrus, pro-oestrus, LH-piek
4-6	Ovulatie van immature eicel
6-12	Rijping van de eicel (48-72h)
> 12	Fertilisatie, dracht, schijndracht

Vaginoscopie

Vaginoscopie is een snel uit te voeren, goedkoop diagnostisch hulpmiddel dat, mits de nodige ervaring, toelaat het juiste inseminatiestip te bepalen. Bij deze techniek wordt het middendeel en zelfs het craniale deel van de vagina gevisualiseerd en beoordeeld met een rigide pediatrie proctoscoop of een flexibele endoscoop met kleine diameter (5 mm). Otoscopen zijn ontoereikend voor vaginoscopisch onderzoek. De cervix is niet in beeld te brengen, omdat de dorsale vaginawand als een plooi (pseudocervix of paracervix) voor de cervix ligt. Met vaginoscopie worden de mucosa van het vestibulum en de vagina beoordeeld (Lindsay, 1990; Jeffcoate, 1998).

Tijdens de anoestrus is het vestibulum rozerood en kan het dunne epitheel bloeden bij het inbrengen van de vaginoscoop. Tijdens de vroege pro-oestrus wordt het speculum vlot naar binnen geschoven en toont het vaginoscopisch beeld een oedemateuze, gladde mucosa die te vergelijken is met "gespannen ballonnen". Tijdens het midden van de pro-oestrus verdwijnt het oedeem en krijgt het oppervlak een bleekroze en gerimpeld aspect (plooien in lengterichting met loopheidssecret ertussen). Het oppervlak van de plooien wordt geleidelijk aan scherper en hoekiger, de kleur van de mucosa wordt roomachtig tot wit. Het einde van de oestrus wordt gekenmerkt door een breed vaginaal lumen en een "crêpe-papierachtige" bleke mucosa. Dekking of inseminatie wordt gepland 4-6 dagen na de eerste waarneming van mucosa-inkrimping of rond het moment van maximale uitdroging (England, 1998a). Tijdens de metoestrus zullen de plooien in de vagina weer afronden en is de paracervix soms zichtbaar als een rozet.

Vaginale cytologie

Hoewel deze methode geen precieze voorspelling van het juiste dek- of inseminatiestip geeft (noch de LH-piek, noch de ovulatie worden immers exact bepaald), kan ze gebruikt worden om op een snelle en goedkope manier het cyclusstadium van de teef te bepalen. Voor de bepaling van het exacte inseminatiestip wordt deze methode echter het best gecombineerd met vaginoscopie of progesteronbepaling. Vaginale cytologie kan bijkomende informatie geven, aangezien elk cyclusstadium specifieke kenmerken heeft. Een eenmalige progesteronbepaling kan immers in bepaalde situaties leiden tot verkeerde conclusies: een progesteronconcentratie van bijvoorbeeld 10 ng/ml kan zowel gezien worden bij een teef

in oestrus als bij een teef op het einde van de metoestrus.

De staalname gebeurt door middel van een steriele katoenswab ingebracht in de dorsale vulvacommissuur. De swab wordt in craniodorsale richting geschoven tot tegen de wervelkolom, wordt vervolgens horizontaal in de bekkenholte gebracht, rondgedraaid en op een draagglasje uitgerold. Na het drogen aan de lucht gedurende 30 minuten of na de fixatie met fixeerspray of 95-100% methanol wordt het preparaat gekleurd door middel van Diff-Quik, methyleenblauw of Wright-Giemsma (Holst en Phemister, 2001).

De bepaling van het cyclusstadium gebeurt door het bepalen van de verhoorningsgraad van de vaginale cellen en door de beoordeling van de aanwezigheid van rode en witte bloedcellen (Jeffcoate, 1998). Onder invloed van stijgende oestradiolconcentraties in het plasma tijdens de pro-oestrus wordt het vaginaal epitheel meerlagig (20-30 cellagen) en gaat het verhoornen. Tijdens de pro-oestrus worden gewoonlijk grote hoeveelheden rode bloedcellen aangetroffen en is er een afname in het aantal gekernde vaginale cellen. Maximale verhoorning wordt gezien bij het begin van de oestrus. Het einde van de oestrusperiode en het begin van de metoestrus worden gekenmerkt door het opnieuw verschijnen van gekernde vaginale cellen en van grote hoeveelheden leucocyten.

KUNSTMATIGE INSEMINATIE MET VERS SPERMA

KI met vers sperma is veruit de meest gebruikte methode van inseminatie onder praktijkomstandigheden. Belangrijk is dat men de teef en de reu op een rustig moment naar de praktijk laat komen en niet als de eigenaars al een halve dag of langer gepoogd hebben om alsnog een natuurlijke dekking voor elkaar te krijgen. Het sperma wordt afgenomen (afnametechniek: zie Linde-Forsberg, 1991) en opgevangen in een steriel, verwarmd recipiënt om beschadiging van de zaadcellen te voorkomen. Na een microscopische controle (motiliteit, morfologie en concentratiebepaling; Van Soom *et al.*, 2001a) wordt het sperma onmiddellijk geïnsemineerd.

Inseminatietechniek

Vers sperma kan door zijn lange levensduur in de vrouwelijke geslachtstractus (4-6 dagen; Linde-Forsberg en Forsberg, 1989) met goed resultaat intravaginaal geïnsemineerd worden (Linde-Forsberg en Forsberg, 1993). Diep intravaginale inseminatie is

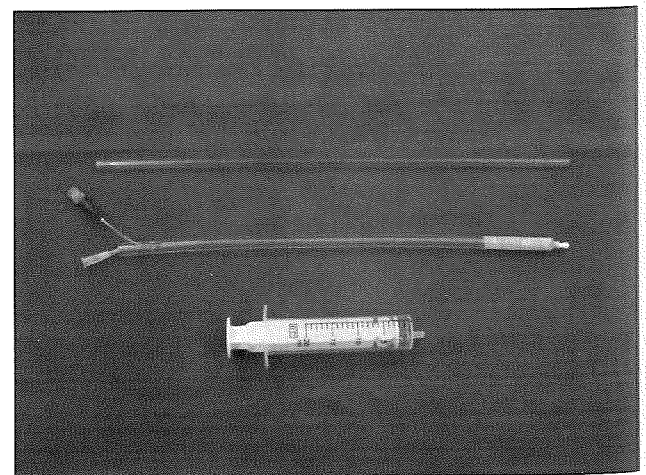
mogelijk met behulp van een rigide plastic pipet gekoppeld aan een 2 of 5 ml spuit of met een osirispijet (Figuur 1 - Fontbonne en Badinand, 1993). Kleine of middelgrote honden worden op tafel gezet, grote honden laat men op de grond staan.

De *plastic inseminatiepipet* (zoals gebruikt voor de intra-uteriene behandeling van runderen en paarden - Figuur 1) wordt in de dorsale vulvacommissuur ingebracht. De pipet wordt eerst in craniodorsale richting tot tegen de wervelkolom geschoven en vervolgens horizontaal tot caudaal van de cervix. Terugvloeit van sperma wordt zoveel mogelijk vermeden door het sperma langzaam te insemineren en het achterlijf van de teef gedurende 10 minuten omhoog te houden (England, 1998b). Pinto *et al.* (1995) vermelden echter dat dit laatste kan beperkt worden tot 1 minuut zonder invloed op het drachtigheidpercentage. Prikkeling van de vulva (met de vinger) stimuleert het spermatransport naar de eicellen, aangezien er op deze manier uteriene contracties opgewekt worden (Linde-Forsberg en Forsberg, 1989; Farstad 1998). Tenslotte dient er na de inseminatie 10 minuten met de teef gewandeld te worden waarbij erop gelet wordt dat de teef niet urineert.

Deze inseminatiemethode is gemakkelijk en snel uit te voeren en geeft goede resultaten (Tabel 2) op voorwaarde dat het inseminatietijdstip correct is (Linde-Forsberg en Forsberg, 1989).

De *osirispijet* (Figuur 1) is een handig alternatief. Deze pipet bestaat uit een binnenkatheter en een flexibele buitenste mantelpipet met vooraan een opblaasbare cuff. De pipet wordt intravaginaal ingebracht tot juist caudaal van de cervix. Vervolgens wordt de cuff opgeblazen en wordt het sperma via de binnenkatheter langzaam craniaal in de vagina gebracht. Tenslotte

Fig. 1. Intravaginale inseminatiekatheters (bovenaan: plastic inseminatiepipet; onderaan: osirispijet).



Tabel 2. Drachtigheidpercentages en aantal puppy's per nest na intravaginale inseminatie van vers sperma met een plastic inseminatiepipet.

N teven	N inseminaties	Drachtigheid percentage	Aantal puppy's/nest	Referentie
374	1 tot 4	63,4	5,73	Linde-Forsberg en Forsberg, 1989
424	1 tot 4	51,2	-	Linde-Forsberg en Forsberg, 1993
18	3,7	94	7,2	Pinto <i>et al.</i> , 1999

wordt de pipet met opgeblazen cuff gedurende 10 minuten in de vagina gelaten door bijvoorbeeld het buitendeel van de katheter aan de staart van de teef te fixeren met kleefband. Een alternatief is met de ene hand de katheter vasthouden en met de andere hand de staart van de teef fixeren (naar dorsaal gericht). Door aan de staart te heffen, zal de teef niet gaan zitten en hoeft er geen druk op de buik uitgeoefend te worden om de teef recht te houden.

Het voordeel van deze pipet is de opblaasbare cuff waarmee de bulbus van de penis wordt nagebootst. Hierdoor wordt de terugvloeit van sperma vermeden en zouden vaginale contracties, nuttig voor het spermtransport, opgewekt worden.

Tijdstip van inseminatie

Rekening houdend met enerzijds de maturatie van de eicel na ovulatie en anderzijds de levensduur van de spermatozoa, kunnen de volgende adviezen worden gegeven: een eerste inseminatie op de dag van de ovulatie gevolgd door een tweede inseminatie twee dagen later (Farstad, 1998). Meerdere inseminaties tijdens dezelfde loopsheid geven een significant hoger drachtigheidpercentage dan een eenmalige inseminatie (Linde-Forsberg en Forsberg, 1989 en 1993).

Resultaten

De drachtigheidpercentages na KI met vers sperma variëren van 51 tot 94% (Tabel 2; England, 1998, Pinto *et al.*, 1999) en zijn afhankelijk van de kwaliteit van het sperma, de correcte bepaling van het inseminatietijdstip en de inseminatiemethode. Als een natuurlijke

dekking onder gecontroleerde omstandigheden wordt uitgevoerd, bedraagt het drachtigheidpercentage 85 tot 90% (Rota *et al.*, 1999).

KUNSTMATIGE INSEMINATIE MET GEKOELD SPERMA

De eerste succesvolle KI met verdund, gekoeld sperma dateert van 1954. Hierbij werd melk als spermaverdunner gebruikt. Het sperma werd gedurende 100 uur bij 4°C bewaard (Harrop, 1954).

In ons laboratorium wordt routinematig de Tris-ei-dooier-citraatverdunner gebruikt. Na afname wordt één deel sperma met drie delen spermaverdunner op kamertemperatuur verdund en langzaam afgekoeld tot 5°C. De functie van de spermaverdunner is het sperma te beschermen tijdens het afkoelen, het sperma van energiesubstraten te voorzien en de pH en de osmolariteit van het sperma op peil te houden (England, 1993). Zo kan hondensperma dat gekoeld en bewaard wordt in een goede verdunner gedurende twee tot vier dagen zijn beweeglijkheid en bevruchtingskracht behouden (Morton en Bruce, 1989). Aangeraden wordt om het verdunde sperma te insemineren binnen de twee dagen na afname.

De voornaamste indicatie voor KI met gekoeld sperma is transport naar het buitenland (voornamelijk binnen Europa). Wanneer sperma slechts voor een korte periode dient bewaard te worden, is het gebruik van gekoeld sperma te verkiezen boven ingevroren sperma. Het sperma verdund en gekoeld bewaren is goedkoper dan het in te vriezen. Bovendien heeft gekoeld sperma een langere levensduur in het geslachts-

Tabel 3. Drachtigheidpercentage en nestgrootte na intravaginale inseminatie met verdund, gekoeld sperma (1 tot 2 dagen bewaard).

N teven	Drachtigheid- percentage	Aantal puppy's/nest	Referentie
67	77,6	5,8	Goodman en Cain, 1993
20	95	7,1	Pinto <i>et al.</i> , 1999

apparaat van de teef en zijn de drachtigheidresultaten beter.

Inseminatietechniek

Zie inseminatie met vers sperma.

Tijdstip van inseminatie

Op voorwaarde dat de inseminatie op het correcte tijdstip wordt uitgevoerd, kan met KI met verdund, gekoeld sperma een goed drachtigheidresultaat bereikt worden. De bepaling van het exacte inseminatie-tijdstip gebeurt door observatie van fysische veranderingen en gedragsveranderingen gecombineerd met vaginale cytologie (Pinto *et al.*, 1999) en progesteronbepalingen. Inseminaties worden uitgevoerd op dag 2, 3 of 4 na de ovulatie (Goodman en Cain, 1993).

Resultaten

De drachtigheidresultaten variëren van 18 tot 95% (Pinto *et al.*, 1999). Linde-Forsberg en Forsberg (1993) vermelden drachtigheidpercentages die gemiddeld 16% lager zijn dan na KI met vers sperma. Het gemiddeld aantal jongen per nest was voor beide methoden gelijk (Tabel 3).

KUNSTMATIGE INSEMINATIE MET DIEPVRIES-SPERMA

In 1954 werd hondensperma voor de eerste maal met succes ingevroren (Rowson, 1954) en vijftien jaar later kwam de eerste dracht tot stand met diepvriessperma (Seager, 1969). De mogelijkheid om sperma van waardevolle reuen in te vriezen, te bewaren en naar het buitenland te transporteren biedt talloze perspectieven. Spijts de voordelen wordt dit tot op he-

den nog niet veel gedaan. De hele procedure voor het invriezen en bewaren is tamelijk duur en het aantal inseminaties dat kan uitgevoerd worden met één ingevroren ejaculaat is beperkt en houdt verband met de initiële spermacentratie en de gebruikte inseminatiedosis. Bijkomend zijn in het algemeen de resultaten van KI met diepvriessperma pover. De drachtigheidresultaten zijn gemiddeld 30% lager en de nestgrootten zijn gemiddeld 30% kleiner dan na KI met vers sperma (Linde-Forsberg en Forsberg, 1993; Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

De voornaamste problemen bij het gebruik van diepvriessperma zijn de bepaling van het juiste inseminatietijdstip, het intra-uterien brengen van de spermacellen en de korte levensduur van het sperma in de geslachtstractus van de teef (England, 1993).

Diepvriessperma heeft minder bevruchtungskracht dan vers sperma, omdat het invriesproces de stabiliteit van de spermacelmembraan aantast. Daardoor zijn de levensduur en de beweeglijkheid van de spermacellen na het ontdooien aanzienlijk verminderd (Ferguson *et al.*, 1989; Wilson, 1993). De spermamembraan en het acrosoom zijn zodanig instabiel geworden dat het sperma slechts een bevruchtend vermogen van enkele uren heeft en tevens niet meer in staat is de cervix te passeren. Deze beperkte levensduur heeft tot gevolg dat bij KI met ingevroren sperma het tijdstip van inseminatie heel exact bepaald moet worden en dat het sperma bij voorkeur rechtstreeks in de uterus gebracht wordt. De anatomie van de vagina bij de teef is helaas zodanig dat een gemakkelijke katheterisatie van de cervix en de uterus niet mogelijk is. De vagina bij de teef is lang en smal en de toegang tot de cervix wordt verhinderd door de dorsale vaginawand die als een plooi (pseudocervix of paracervix) over de cervix ligt (England, 1993; Wilson, 1993).

Tabel 4. Vergelijking tussen intra-uteriene en intravaginale inseminatie met diepvriessperma. Het inseminatietijdstip werd bepaald op basis van het progesterongehalte in het bloed en vaginale cytologie.

	Aantal teven	Drachtigheid- percentage	Aantal puppy's/nest	Referentie
Intravaginale inseminatie	38	52,6	4,2	Fontbonne en Badinand, 1993
Intra-uteriene inseminatie	19	73,6	5,5	"
Intravaginale inseminatie	141	58,9	4,0	Linde-Forsberg <i>et</i> <i>al.</i> , 1999
Intra-uteriene inseminatie	167	84,4	5,4	"

Wanneer het ontdooide sperma diep intravaginaal wordt geïnsemineerd, zijn de drachtigheidresultaten beduidend lager. Intra-uteriene inseminatie van diepvriessperma leidt tot hogere geboortepercentages en grotere nestgrootten (Tabel 4).

Inseminatietechniek

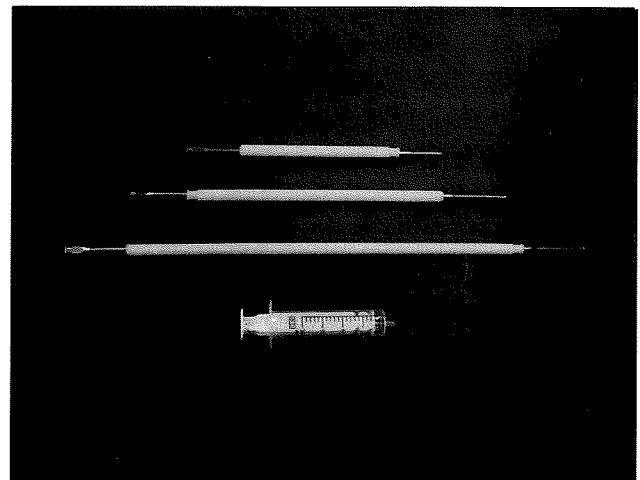
Intra-uteriene inseminatie

Voor de intra-uteriene inseminatie met diepvriessperma bestaan er verschillende mogelijkheden: laparotomie, de transcervicale katheter (Noorse katheter) of inseminatie onder endoscopische begeleiding.

De gemakkelijkste techniek is laparotomie. Onder algemene anesthesie wordt een kleine incisie gemaakt in de linea alba van de buikwand 5 cm craniaal van de bekkenrand. De baarmoeder wordt extra-abdominaal gebracht en het sperma wordt met een insulienaald traag in de uterus geïnjecteerd. In de Verenigde Staten en Canada is chirurgische intra-uteriene inseminatie de meest gebruikte methode voor de inseminatie van diepvriessperma. Hoewel deze techniek tot goede drachtigheidresultaten leidt, is het een ethisch omstreden methode die voornamelijk in Europa aanleiding heeft gegeven tot het zoeken naar alternatieven.

Een alternatief is de transcervicale katheter (Noorse katheter; Andersen, 1975), ontwikkeld in de Scandinavische landen en oorspronkelijk gebruikt voor de

Fig. 2. Transcervicale katheters (3 maten naargelang de grootte van de hond).



inseminatie van vossen. Het materiaal bestaat uit een nylon speculum en een metalen katheter met een fijne punt waaraan een spuitje is gekoppeld (Figuur 2). Bij deze techniek is weinig of geen sedatie nodig en wordt de cervix transabdominaal gefixeerd en over de metalen pipet geschoven. Vervolgens wordt het sperma rechtstreeks in de baarmoeder gebracht (Farstad en Andersen-Berg, 1989; Fontbonne en Badinand, 1993).

In België wordt deze methode weinig of niet gebruikt, omdat het een moeilijk aan te leren techniek is (Nöthling en Volkmann, 1993; Wilson, 1993) die bovendien niet bij elke hond kan gebruikt worden. Bij

Tabel 5. Resultaten van intravaginale inseminatie van diepvriessperma door middel van een plastic inseminatiepipet.

N teven	Drachtigheid percentage	Nestgrootte	Referentie
156	39,1	4,1	Seager <i>et al.</i> , 1975
10	60	2,4	Nöthling en Volkmann, 1993

Tabel 6. Effect van het aantal intravaginale inseminaties met diepvriessperma op het geboortepercentage (Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

N inseminaties	N teven	Geboortepercentage	Nestgrootte
1	23	34,8	2,5
2	60	60,0	3,4
3	36	63,9	5,1
4	17	70,6	5,0
5	5	80,0	3,3

grote, obese dieren en nerveuze dieren met gespannen abdomen zijn palpatie en fixatie van de cervix onmogelijk (England, 1998b). Endoscopisch onderzoek heeft aangetoond dat de positie van de portio vaginalis van de cervix bij de teef varieert en zich wijzigt tijdens het cyclusverloop, wat verklaart waarom sommige teven moeilijk of niet te katheteriseren zijn (Wilson, 1993). Eens de techniek beheerst wordt, vergt de inseminatie maar enkele minuten (Linde-Forsberg en Forsberg, 1999).

Een andere mogelijkheid is het sperma intra-uterien te insemineren met een flexibele plastic katheter onder endoscopische begeleiding. Endoscopen laten een directe visualisatie van de cervix toe (Wilson, 1993). Een rigide endoscoop wordt onder sedatie tot aan de cervix ingebracht. Na visualisatie van de cervix wordt de inseminatiekatheter in de cervix gebracht. Bij deze inseminatiemethode worden dus zowel de katheter als de endoscoop gemanipuleerd; dit vergt aanzienlijke oefening (Linde-Forsberg *et al.*, 1999).

Belangrijke voordelen van deze techniek zijn dat de inseminator zeker is van intra-uteriene depositie van het sperma en dat de kans op trauma bijna nihil is. De kostprijs van de apparatuur vormt echter een belangrijk nadeel. Mits voldoende training kan met deze techniek een betrouwbare intra-uteriene inseminatie uitgevoerd worden.

Intravaginale inseminatie

Zoals eerder vermeld, kan diepvriessperma ook intravaginaal worden ingebracht. De drachtigheidresultaten zijn echter beduidend lager dan bij intra-uteriene inseminatie (Tabel 4 en 5; Nöthling en Volkmann, 1993; Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Meerdere intravaginale inseminaties tijdens dezelfde loopsheid verhogen het drachtigheidpercentage (Tabel 6, Linde-Forsberg *et al.*, 1999). De inseminaties werden uitgevoerd tijdens de fertiele periode (2 tot 5 dagen na de ovulatie). Zoals uit Tabel 6 blijkt zijn meerdere intravaginale inseminaties nodig om met diepvriessperma

Tabel 7. Resultaten van intra-uterine inseminatie van diepvriessperma met de transcervicale katheter.

N teven	Drachtigheid percentage	Aantal puppy's	Referentie
36	67	6,4	Farstad en Andersen-Berg (1989)
65	69,3	4,4	Linde-Forsberg en Forsberg (1989) (*)
19	73,6	5,5	Fontbonne en Badinand (1993)
59	51,1	-	Linde-Forsberg en Forsberg (1993) (*)
167	84,4	5,4	Linde-Forsberg et al. (1999)

(*) na correctie voor spermakwaliteit en inseminatietijdstip

resultaten te bekomen die vergelijkbaar zijn met deze na intra-uteriene inseminatie of na inseminatie met vers sperma (Linde-Forsberg *et al.*, 1999). De benodigde grote hoeveelheid sperma om 3, 4 of 5 inseminaties uit te voeren, is echter lang niet altijd beschikbaar.

Tijdstip van inseminatie

Door de verminderde levensduur en beweeglijkheid van ontdooid sperma moeten de spermacellen geïnsemineerd worden exact op het tijdstip wanneer er rijpe eicellen aanwezig zijn (Wilson, 1993; Linde-Forsberg *et al.*, 1999). Bijgevolg wordt relatief laat in de cyclus geïnsemineerd: een eerste inseminatie op dag twee na de ovulatie gevolgd door een tweede inseminatie 24-48 uur later. Progesteronbepalingen in het bloed zijn hiervoor een betrouwbare methode. Hoewel sommige auteurs andere criteria hanteren (Fontbonne en Badinand, 1993) zijn progesterongehalten van 10-15 ng/ml bij de eerste inseminatie (Farstad en Andersen Berg, 1989) en 18-25 ng/ml bij de tweede inseminatie een goede leidraad (Farstad, 1998).

Resultaten

Chirurgische inseminatie van diepvriessperma is een methode die bij elke teef kan uitgevoerd worden en waarbij drachtigheidresultaten van 60-80% kunnen worden bereikt (Olar, 1985).

De resultaten van niet-chirurgische, intra-uteriene inseminatie met diepvriessperma variëren sterk, afhankelijk van de gebruikte inseminatiemethode, het aantal inseminaties en van de onderzoeksgroep (Ta-

bel 7; Olar, 1985; Farstad en Andersen-Berg, 1989; Linde-Forsberg en Forsberg, 1989). De meest recente studies van Linde-Forsberg *et al.* (1999) geven aan dat mits er gebruik wordt gemaakt van een goede invriesteknik en van inseminatie op het juiste moment, er met de Noorse katheter geboortepercentages kunnen bereikt worden vergelijkbaar met deze na KI met vers sperma.

INSEMINATIEDOSIS

De inseminatiedosissen die in de literatuur worden aangeraden, variëren sterk naargelang de auteur, de inseminatietechniek en naargelang er vers of diepvriessperma wordt gebruikt. Er bestaan echter geen literatuurgegevens over de minimale hoeveelheid spermacellen die nodig is om bevruchting tot stand te brengen. Uiteraard is niet alleen het drachtigheidpercentage van belang, maar ook de nestgrootte moet nauwlettend in het oog gehouden worden.

Wanneer vers sperma wordt gebruikt, worden in onze kliniek twee intravaginale inseminaties met minimum 150 miljoen spermacellen uitgevoerd. Voor een chirurgische intra-uteriene inseminatie met diepvriessperma worden routinematig eenmalig 300 miljoen spermacellen geïnsemineerd, aangezien ongeveer de helft van de spermacellen het invriesproces niet overleeft. Succesvolle intravaginale inseminatie met diepvriessperma kan plaatsvinden door hetzij grote hoeveelheden spermacellen intravaginaal te brengen, hetzij herhaaldelijke inseminaties (Tabel 6) uit te voeren of door beide (England, 1993). Intra-uteriene inseminatie van diepvriessperma vereist minder

spermatozoa dan intravaginale inseminatie. England (1993) gebruikte 150 tot 200 miljoen spermacellen voor inseminatie met diepvriessperma.

BESLUIT

KI met vers sperma wordt in de praktijk het meest toegepast. Twee intravaginale inseminaties met vers sperma geven goede drachtigheidresultaten op voorwaarde dat het sperma op het juiste tijdstip ingebracht wordt. Wanneer sperma naar het buitenland moet worden gebracht, wordt gebruik gemaakt van verdund, gekoeld sperma of van diepvriessperma. Het invriesproces beïnvloedt in sterke mate de kwaliteit van het sperma na ontdooien. Diepvriessperma wordt bij voorkeur intra-uterien geïnsemineerd. In België gebeurt dit voornamelijk door laparotomie, wat ethisch omstreden is. Drachtigheidresultaten na KI met diepvriessperma vertonen een grote variatie, maar liggen in ieder geval duidelijk lager dan na KI met vers sperma. Ook is het aantal pups per nest lager. Een goede invries- en inseminatietechniek op het juiste tijdstip uitgevoerd, kan deze resultaten aanzienlijk verbeteren.

LITERATUURLIJST

- Andersen K. (1975). Insemination with frozen dog semen based on a new technique. *Zuchthygiene* 10, 1-4.
- England G.C.W. (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 243-255.
- England G.C.W. (1998a). Chapter 10: Fertilization. In: Sutton J.B. en Swift S.T. (editors). *Allen's Fertility and Obstetrics in the Dog* (2nd edition). Blackwell Science Ltd. Editorial Offices, Londen, p. 72-73.
- England G.C.W. (1998b). Chapter 9: Artificial Insemination. In: Sutton J.B. en Swift S.T. (editors). *Allen's Fertility and Obstetrics in the Dog* (2nd edition), Blackwell Science Ltd Editorial Offices, Londen, p. 165-172.
- Farstad W. en Andersen Berg K. (1989). Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 289-292.
- Farstad W. (1998). Mating and Artificial Insemination in the Dog. In: England G., Harvey M. and Simpson G. (editors). *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, British Small Animal Veterinary Association, Shurdington, p. 101-103.
- Ferguson J.M., Renton J.P., Farstad W. en Douglas T.A. (1989). Insemination of beagle bitches with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 293-298.
- Fontbonne A. en Badinand F. (1993). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intra-uterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 325-327.
- Goodman M.F. en Cain J.L. (1993). Retrospective evaluation of artificial insemination with chilled extended semen in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 554.
- Harrop A.E. (1954). Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *British Veterinary Journal* 110, 424-425.
- Holst P.A. en Phemister P.A. (2001). Chapter 3: Vaginal cytology. In: Johnston S.D., Root Kustritz M.V. en Olsen P.N.S. (editors). *Canine and Feline Theriogenology*, W.B. Saunders Company, London, p 32-40.
- Jeffcoate I. (1998). Physiology and endocrinology of the bitch. In: England G., Harvey M. and Simpson G. (editors). *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, British Small Animal Veterinary Association, Shurdington, p 5.
- Johnston S.D. (1995). Breeding management of the bitch. In: Ettinger S.J. (editor). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 4th edition, Vol 2., WB Saunders, Philadelphia, p 1604-1606.
- Linde-Forsberg C. en Forsberg M. (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 299-310.
- Linde-Forsberg C. (1991). Achieving canine pregnancy using frozen or chilled extended sperm. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 21, 467-485.
- Linde-Forsberg C. en Forsberg M. (1993). Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 313-323.
- Linde-Forsberg C., Ström Holst B. en Govette G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal versus intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52, 11-23.
- Lindsay F.E.F. (1990). Postuterine endoscopy in the bitch. In: Tams T.R. (editor). *Small Animal Endoscopy*, The C.V. Mosby Co., Philadelphia, p 327-366.
- Morton D.B. en Bruce S.G. (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 311-316.
- Nöthling J.O. en Volkmann D.H. (1993). Effect of addition of autologous fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intra-vaginal insemination. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 329-333.
- Olar T.T. (1985). Using frozen canine semen: a guide for practitioners. *Veterinary Medicine* 80, 22-30.
- Pinto C.R.F., Eilts B.E. en Paccamonti D.L. (1995). The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology* 50, 301-305.
- Pinto C.R.F., Paccamonti D.L. en Eilts B.E. (1999). Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52, 609-616.
- Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (1999). Fertility after vaginal or uterine deposition of

- dog semen frozen in a tris extender with or without equex STM paste. *Theriogenology* 51, 1045-1058.
- Rowson L.E.A. (1954). Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal* 8, 216-221.
- Seager S.J.W. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A.I. Digest* 17, 6-16.
- Seager S.W.J., Platz C.C., Fetcher W.S. (1975). Conception rates and related data using frozen dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 45, 189-192.
- Tsutsui T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 39, 269-275.
- Van Soom A., Rijsselaere T., Van Den Broeck W., de Kruif A. (2001 a). Beoordeling van de fertiliteit van vers en ontdooid hondensperma. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 262-270.
- Van Soom A., Rijsselaere T., Van Den Broeck W., de Kruif A. (2001 b). Invriezen van sperma bij de hond. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 70, 253-261.
- Wilson M.S. (1993). Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 307-311.