

DIEPE INTRA-UTERIENE INSEMINATIE BIJ MELKVEE ONDER PRAKTIJKOMSTANDIGHEDEN

Deep intra-uterine insemination of dairy cattle under field conditions

S. Verberckmoes, A. Van Soom, I. De Pauw, J. Dewulf, A. de Kruijf

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

SAMENVATTING

Om sperma zo dicht mogelijk bij de eileider te kunnen deponeren, werd aan de Faculteit Diergeneeskunde een nieuwe inseminatiepipet (DIUI-pipet) ontwikkeld. Om de effectiviteit van de nieuwe DIUI-pipet na te gaan werden in deze veldproef 4064 koeien door 12 KI-dierenartsen geïnsemineerd. Het sperma werd op drie verschillende manieren afgezet: 1) met de klassieke inseminatiepipet in het corpus uteri, 2) met de DIUI-pipet in het corpus uteri, 3) met de DIUI-pipet in de top van beide uterushoornen. Bij elke techniek werden $10\text{-}15 \times 10^6$ ingevroren spermacellen gebruikt. De drachtigheidsresultaten werden significant beïnvloed door de inseminatietechniek ($p = 0,02$), door de KI-dierenarts ($p = 0,01$), door de pariteit van de koe ($p < 0,01$) en door het KI-rangnummer ($p < 0,01$). De tijd had net geen significant effect ($p = 0,07$) op de drachtigheidsresultaten die bekomen werden na diepe inseminatie. De drachtigheidsresultaten bekomen met de klassieke inseminatiemethode, waren significant beter dan deze bekomen met de DIUI-pipet in het corpus uteri ($p < 0,01$), maar niet significant beter dan die met de DIUI-pipet in de top van beide uterushoornen ($p = 0,27$). Hoewel de diepe intra-uteriene inseminatiemethode meer tijd en ervaring vergt dan de klassieke inseminatiemethode, kan besloten worden dat de DIUI-pipet geschikt is voor diepe intra-uteriene inseminaties bij melkvee onder praktijkomstandigheden. In hoeverre er bij lagere inseminatiedoses betere drachtigheidsresultaten zullen bekomen worden met de DIUI-pipet dan met de klassieke pipet dient nog nader onderzocht te worden.

ABSTRACT

A new insemination device for cattle (DIUI-device) was developed to deposit the semen near the oviduct. In this field study, 4064 cows were inseminated by 12 inseminators to assess the feasibility of the new DIUI-device. The cows were inseminated using three different methods: 1) in the uterine body with the classic insemination device, 2) in the uterine body with the DIUI-device, and 3) in the top of both uterine horns with the DIUI-device. Each insemination was performed with $10\text{-}15 \times 10^6$ frozen-thawed spermatozoa. The pregnancy rates (PRs) were significantly affected by the insemination technique ($p = 0.02$), the inseminator ($p = 0.01$), heifer or multi-parous cow ($p < 0.01$), and by the insemination number ($p < 0.01$). Time did not have a significant effect ($p = 0.07$). Pregnancy rates obtained after insemination with the classic insemination device were significantly better than those obtained after insemination in the uterine body with the DIUI-device ($p < 0.01$), but did not differ significantly from those obtained after deep insemination in both uterine horn tops ($p = 0.27$). Although the deep intra-uterine insemination method is more time consuming and requires more experience than the classic insemination method, it can be concluded that the DIUI-device is suitable for the insemination of dairy cattle under field conditions. Whether the new DIUI-device is also suitable for insemination with lower insemination doses is still to be examined.

INLEIDING

Wanneer bij het rund gebruik gemaakt wordt van kunstmatige inseminatie (KI) zijn er om dezelfde drachtigheidsresultaten te bekomen als bij natuurlijke

dekking veel minder spermacellen nodig. Op de meeste rundveebedrijven wordt KI uitgevoerd met ingevroren sperma. Hierbij worden 10 tot 15 miljoen ingevroren spermacellen na het ontdooien in het corpus uteri gedeponerd. Het grootste deel van deze

spermacellen gaat verloren, enerzijds via het slijm dat door de cervix wordt uitgestoten (Larsson en Larsson, 1985; Mitchell *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1987) en anderzijds ten gevolge van fagocytose door macrofagen in de uterus. Om echter goede drachtigheidsresultaten te bekomen, moet een voldoende aantal spermacellen het spermareservoir in de isthmus van de eileiders bereiken. Voordat de ovulatie plaatsgevonden heeft, wordt het sperma in de isthmus van de eileider bewaard. Na de ovulatie wordt de eicel in de ampulla van de eileider bevrucht door spermacellen die vrijgekomen zijn uit het reservoir (Suarez, 2001). Wanneer met een nieuwe inseminatietechniek de spermacellen tot tegen de utero-tubale junctie en vlakbij het spermareservoir zouden kunnen gedeponereerd worden, dan zou de inseminatiedosis verder verlaagd kunnen worden. Er zijn dan immers minder spermacellen nodig omdat 1) er geen of weinig retrograde sperma-uitvloeï met het cervixslijm aanwezig is, 2) er minder spermaverlies door fagocytose plaatsvindt tijdens de migratie doorheen de baarmoeder en 3) de spermacellen vlakbij het spermareservoir meerdere uren in een spermavriendelijk milieu kunnen overleven.

Meerdere onderzoekers hebben met wisselende resultaten getracht om bij rundvee de bevruchtingsresultaten te verbeteren door het sperma dicht bij de eileider te deponeren. Meestal werd er geen verschil gevonden tussen diepe intra-uteriene inseminatie en inseminatie in het corpus uteri (Knight *et al.*, 1951; Salisbury *et al.*, 1951; Stewart en Melrose, 1952; Olds *et al.*, 1953; Macpherson, 1968; Hawk en Tanabe, 1986; Williams *et al.*, 1988; Mc Kenna *et al.*, 1990). In één studie was het drachtigheidspercentage na diepe inseminatie lager (Marshall *et al.*, 1989), terwijl vier andere onderzoeksgroepen betere resultaten verkregen na diepe intra-uteriene inseminatie (Zavos *et al.*, 1985; López-Gatius *et al.*, 1988; Senger *et al.*, 1988; Dalton *et al.*, 1999). Een verklaring voor deze uiteenlopende resultaten kan gevonden worden in het gebruik van verschillende inseminatiedoses, het toepassen van uni- of bilaterale diepe inseminatie en het insemineren van pinken en koeien in natuurlijke oestrus of na superovulatie. Als gevolg van deze grote variatie in proefopzet en door het feit dat "diep intra-uterien" geen nauwkeurig omschreven begrip is, is het uiterst moeilijk om al deze verschillende studies met elkaar te vergelijken.

Ook al is diepe intra-uteriene inseminatie (DIUI) niet de meest eenvoudige inseminatietechniek, ze zou theoretisch gezien toch verscheidene voordelen kunnen hebben: 1) verlaging van het aantal spermacellen

per inseminatiedosis, 2) sperma van minder goede kwaliteit kan toch nog gebruikt worden, 3) er kan gebruik gemaakt worden van gesekst sperma en 4) sperma met een gewijzigde DNA-status (transgene spermacellen) kan toch nog tot bevruchting leiden (Gandolfi, 2000).

In de hier beschreven veldstudie was het de bedoeling om het drachtigheidspercentage na DIUI met diepvriessperma bij koeien in natuurlijke bronst te vergelijken met het percentage bekomen na KI met de klassieke inseminatietechniek. Tevens werd de bruikbaarheid van de nieuwe inseminatiepipet en -techniek onder praktijkomstandigheden geëvalueerd.

MATERIAAL EN METHODE

Sperma

Voor de inseminatieveldproef werd gebruik gemaakt van ingevroren sperma geleverd door de Vlaamse Rundveeteelt Vereniging (VRV). Het sperma van alle beschikbare stieren werd in de veldproef opgenomen. Het sperma werd verdund in een Tris-eigeeelverdunner, ingevroren in rietjes van 0,25 ml (Instruments Médecine Vétérinaire, l'Aigle, Frankrijk) en bewaard in vloeibare stikstof. In elk rietje bevonden zich $10-15 \times 10^6$ spermacellen.

Vlak vóór de inseminatie werd het sperma ontdooid door het rietje gedurende 1 minuut in water van 37°C te dompelen. Bij de klassieke inseminatiemethode werd het rietje aan één kant opengeknipt en vervolgens in de pipet gestopt. Bij de nieuwe inseminatiepipet werd het ontdooid sperma gesuspenderd in 0,25 ml 120 mM Na-citraat en vervolgens in een catheter opgezogen die daarna in de DIUI-pipet gebracht werd.

Dieren

In deze drie maanden durende veldproef werden alle koeien van het melktype of dubbeldoeltype die voor KI werden aangeboden, in de proef opgenomen op voorwaarde dat de voorgaande partus zonder keizersnede of een andere complicatie verlopen was.

KI-dierenartsen

Alle KI-dierenartsen van de Vlaamse Rundveeteelt Vereniging (VRV) werden na het voorstellen van de veldproef gevraagd om deel te nemen. Vijftien KI-dierenartsen wilden op vrijwillige basis meewerken. Bij het begin van de veldproef waren 12 van deze

15 dierenartsen beschikbaar. Nadat alle inseminaties verricht waren, werd door de dierenartsen een aantal vragen over de bruikbaarheid van de inseminatiepipet beantwoord.

Inseminatiepipet

De klassieke inseminatiepipet is een rigide metalen buis waarin het rietje wordt ingebracht en waarover een plastic hoes geschoven wordt. Het sperma wordt in het corpus uteri gedeponereerd door het watje dat aan het uiteinde van het rietje zit met een metalen staaf door te duwen. De nieuwe DIUI-pipet bestaat uit twee holle plastic buizen die over elkaar kunnen geschoven worden. In de binnenste holle buis wordt de catheter ingebracht die met sperma gevuld is. De top van de pipet is soepel zodat ze de kromming van de opgekrulde baarmoeder bij tochtige koeien kan volgen (Figuur 1). Het nadeel van de soepele top is dat er niet met rietjes kan geïnsemineerd worden. Het rietje moet, nadat het ontdooid is, geledigd worden in een ampul en vervolgens in de soepele catheter opgezogen worden. Zodra de soepele catheter met sperma gevuld is, wordt hij in de binnenste holle buis van de pipet geschoven en gefixeerd. Met een spuitje wordt er lucht in de catheter gebracht waardoor deze geledigd wordt.



Fig. 1. Nieuwe pipet voor diepe intra-uteriene inseminatie.

Oestrusdetectie en inseminatie

Koeien ($n = 3428$) en pinken ($n = 636$) in natuurlijke bronst werden door de dierenartsen geïnsemineerd. De bronstdetectie gebeurde door de veehouder. Dieren die in de voormiddag tochtig gezien werden, werden 's avonds geïnsemineerd en dieren die in de namiddag tochtig gezien werden, werden de volgende ochtend geïnsemineerd. Bij de klassieke inseminatiemethode werd de cervix onder rectale begeleiding met één hand zodanig gemanipuleerd dat de pipet er doorheen kon geschoven worden tot in het corpus uteri. Met de andere hand werd het rietje leeg geduwd. Bij de DIUI-pipet werd de met sperma gevulde catheter eerst in de pipet geschoven waarna die, net zoals met de klassieke pipet gebeurt, doorheen de cervix tot in het corpus uteri gemanipuleerd werd. Om de helft van de inseminatiedosis in de top van elke baarmoederhoorn te deponeren, werd de pipet eerst tot in de top van de linker baarmoederhoorn geschoven, voor de helft geledigd, en vervolgens teruggetrokken tot in het corpus uteri en dan tot in de top van de rechter baarmoederhoorn gebracht, waar het resterende sperma gedeponereerd werd. Voordat met de proef begonnen werd, had elke dierenarts 100 DIUI-devices gekregen om te oefenen.

derhoorn te deponeren, werd de pipet eerst tot in de top van de linker baarmoederhoorn geschoven, voor de helft geledigd, en vervolgens teruggetrokken tot in het corpus uteri en dan tot in de top van de rechter baarmoederhoorn gebracht, waar het resterende sperma gedeponereerd werd. Voordat met de proef begonnen werd, had elke dierenarts 100 DIUI-devices gekregen om te oefenen.

Proefopzet

De dieren werden at random in drie groepen verdeeld. De dieren van de eerste groep ($n = 1416$) werden met de klassieke inseminatiepipet in het corpus uteri geïnsemineerd. In de tweede groep ($n = 1334$) werd het sperma met de DIUI-pipet in het corpus uteri gedeponereerd. In de derde groep ($n = 1314$) werd het sperma met de DIUI-pipet in de top van beide uterus-hoornen gebracht. De inseminatiemethode werd vooraf at random bepaald. Per dag werden alle dieren die in de proef opgenomen werden via dezelfde methode geïnsemineerd. Op het moment van inseminatie werden de volgende gegevens ingevoerd in de handterminal: identiteit van de koe, identiteit van de gebruikte stier, rangnummer van de inseminatie (1^{ste}, 2^{de}, $\geq 3^{\text{de}}$ KI), nullipare (pink) tegenover uni- of multipare koe, de identiteit van het bedrijf, de datum van inseminatie, de gebruikte inseminatiemethode en de identiteit van de KI-dierenarts. De non return rate (NRR) werd bepaald aan de hand van de gegevens die ingevoerd werden met de handterminal, namelijk het percentage dieren dat niet opnieuw ter inseminatie werd aangeboden gedurende de eerste 56 dagen na de inseminatie. De effectieve drachtigheidsresultaten werden bekomen door rectaal onderzoek van de koeien die niet opnieuw ter inseminatie werden aangeboden tussen 45 en 90 dagen na de laatste inseminatie.

STATISTISCHE VERWERKING

Het effect van de inseminatiemethode, de dierenarts, de pariteit van de koe en het rangnummer van de inseminatie op de drachtigheidsresultaten (PR) werden geanalyseerd met behulp van multivariate logistische regressie (SPSS, 10,0, Chicago, USA).

RESULTATEN

In totaal werden 3428 koeien en 636 pinken geïnsemineerd. In Tabel 1 worden de NRR en PR gegeven in functie van de drie inseminatietechnieken.

Tabel 1. Non return rate (NRR) en drachtigheidsresultaten na inseminatie met de klassieke inseminatiepipet in het corpus uteri (KP corpus), met de DIUI-pipet in het corpus uteri (NP corpus) en met de DIUI-pipet in beide hoortoppen (NP hoornen).

| KI-methode | Aantal | NRR | Drachtig | Niet drachtig | Onbekend |
|---------------|---------------|--------------|---------------------|---------------|-------------|
| KI- corpus | n=1416 | 72,0% | 57,6% ^a | 37,2% | 5,2% |
| NP-corporis | n=1334 | 68,0% | 52,7% ^b | 43,4% | 3,9% |
| NP-hoornen | n=1314 | 69,0% | 53,8% ^{ab} | 43,5% | 2,7% |
| Totaal | n=4064 | 70,0% | 54,7% | 41,3% | 4,0% |

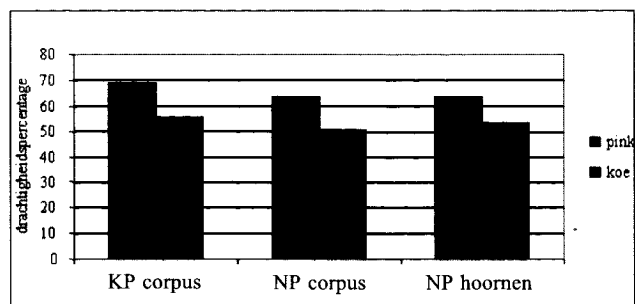
^{a,b} waarden met een verschillend superscript binnen dezelfde kolom zijn significant verschillend.

Tabel 2. Aantal inseminaties per dierenarts en hun drachtigheidspercentages per inseminatiemethode: klassieke pipet corpus (KP-corporis), nieuwe pipet corpus (NP corpus) en nieuwe pipet hoornen (NP hoornen).

| KI dierenarts | Aantal KI's | Drachtigheidspercentage | | |
|---------------|-------------|-------------------------|-------------|------------|
| | | KP-corporis | NP-corporis | NP-hoornen |
| 1 | 298 | 51,6 | 46,2 | 53,4 |
| 2 | 375 | 69,7 | 51,9 | 66,4 |
| 3 | 359 | 50,7 | 46,9 | 58,9 |
| 4 | 517 | 57,9 | 59,5 | 52,0 |
| 5 | 371 | 58,2 | 48,4 | 50,5 |
| 6 | 302 | 64,7 | 56,3 | 64,4 |
| 7 | 60 | 61,5 | 40,6 | 53,3 |
| 8 | 242 | 56,0 | 42,5 | 45,7 |
| 9 | 313 | 58,9 | 56,0 | 49,2 |
| 10 | 364 | 65,9 | 61,4 | 55,2 |
| 11 | 393 | 54,1 | 50,0 | 55,7 |
| 12 | 312 | 44,8 | 57,0 | 36,2 |

Rectaal drachtigheidsonderzoek kon worden uitgevoerd bij 3902 dieren. Bij 4% van de geïnsemineerde koeien kon geen drachtigheidsdiagnose uitgevoerd worden. De belangrijkste reden hiervoor was dat de koe ondertussen opgeruimd was. De effectieve drachtigheidsresultaten (PR) lagen gemiddeld 15% lager dan de NRR (Tabel 1). De multivariate logistische regressie toonde aan dat de drachtigheidsresultaten significant beïnvloed werden door de inseminatiemethode

($p=0,02$). Inseminatie met de DIUI-pipet in de toppen van beide uterushoornen bleek significant betere drachtigheidsresultaten te geven dan inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri ($p<0,01$); er werd echter geen verschil gevonden met de klassieke methode ($p=0,27$). Ook de dierenarts ($p=0,01$) (Tabel 2), de pariteit van de koe ($p<0,01$) (Figuur 2) en het rangnummer van de inseminatie ($p<0,01$) (Figuur 3) hadden een significant effect op de drachtigheidsre-



Figuur 2. Invloed van pariteit en inseminatiemethode op de drachtigheidsresultaten.

* = aantal inseminaties

KP-corpus: inseminatie met de klassieke inseminatiepipet in het corpus uteri

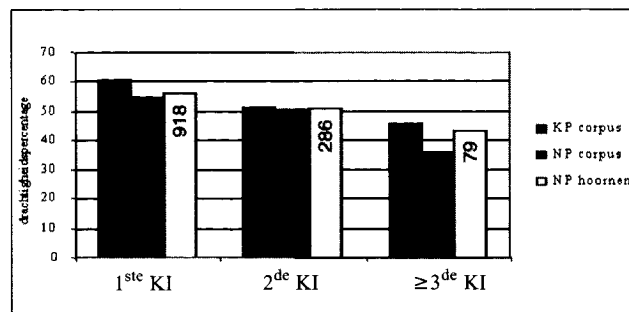
NP-corpus: inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri

NP-hoornen: inseminatie met de DIUI-pipet in beide hoorn-toppen

sultaten. Om de invloed van de inseminatie-ervaring met de nieuwe pipet na te gaan, werden voor elke dierenarts de PR's van de eerste 2 weken vergeleken met die van de laatste 2 weken van de inseminatieveldproef. Het gevonden verschil was echter niet significant ($p=0,07$). De interactie tussen de KI-dierenarts en de KI-methode bleek ook niet boven de significantiegrens te liggen ($p=0,06$). Uit de enquête kwam naar voor dat de beiderzijdse diepe intra-uteriene inseminatie $6,5 \pm 2,3$ minuten langer duurde dan de klassieke inseminatie en dat er in 7% van de DIUI-inseminaties duidelijk bloed aan de pipet kleefde.

DISCUSSIE

In de literatuur en bij de KI-centra wordt de reproductieve efficiëntie van een stier of de efficiëntie van een KI-methode meestal uitgedrukt als non return rate (NRR). Deze NRR geeft het percentage koeien weer dat na KI niet opnieuw ter inseminatie wordt aangeboden binnen een bepaalde tijdspanne (meestal 56 dagen). In de hier beschreven veldstudie werden drie verschillende inseminatietechnieken met elkaar vergeleken op basis van effectieve drachtigheidsresultaten vastgesteld door rectaal onderzoek tussen 45-90 dagen na inseminatie. Gemiddeld bedraagt de NRR na KI met $10-15 \times 10^6$ ingevroren spermacellen 70 à 72% (Foote en Kaproth, 1997). Een groot nadeel van de NRR is dat de koeien die niet opnieuw ter inseminatie worden aangeboden, als drachtig beschouwd worden, terwijl ze in feite ofwel niet drachtig zijn, ofwel gedekt werden door een stier, ofwel opgeruimd werden (de Kruif, 1975; Koops *et al.*, 1995). Door ge-



Figuur 3. Invloed van het rangnummer van inseminatie (1^{ste}, 2^{de} en ≥3^{de} KI) en de inseminatiemethode (KP-corpus, pipet corpus, pipet hoornen) op de drachtigheidsresultaten.

* = aantal inseminaties

bruik te maken van de werkelijke drachtigheidsresultaten zijn de verkregen resultaten veel betrouwbaarder dan die op basis van de NRR.

Ondanks het feit dat bij de diepe intra-uteriene inseminatie slechts de helft van de inseminatiedosis werd gedeponereerd in de top van elke uterushoorn, was er geen verschil in PR vergeleken met het gebruik van een volle inseminatiedosis in het corpus uteri met de klassieke inseminatiepipet. De drachtigheidsresultaten na inseminatie met de DIUI-pipet in de top van de uterushoornen waren gemiddeld iets lager, maar niet significant verschillend van de resultaten na inseminatie met de klassieke inseminatiepipet ($p=0,27$). De resultaten na inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri waren wel significant slechter ($p<0,01$) dan die na inseminatie in het corpus uteri met de klassieke pipet. Meerdere verklaringen voor de bekomen resultaten met de verschillende technieken zijn mogelijk. Een mogelijke verklaring voor de gemiddeld slechtere resultaten van de DIUI-pipet dan die met de klassieke methode kan gezocht worden in het feit dat het sperma dat met de DIUI-pipet geïnsemineerd wordt extra manipulaties moet ondergaan. Het sperma moet na ontdooien, gesuspendeerd worden in een ampul met Na-citraat en opgezogen worden in een soepele catheter die vervolgens in de DIUI-pipet wordt geschoven. Deze extra manipulaties kosten extra tijd en kunnen een negatief effect hebben op de spermakwaliteit. Dat de minst goede resultaten bekomen werden na inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri kan verklaard worden door het feit dat de DIUI-pipet niet ontworpen is om in het corpus uteri te insemineren. De pipet is langer dan een klassieke inseminatiepipet, wat het fixeren van de pipet in het corpus uteri bemoeilijkt. Het corpus uteri van de koe is maar 1 tot 3 cm lang (Nickel *et al.*, 1999), waardoor er bij beweging van de koe snel

beschadiging optreedt van het septum dat beide baarmoederhoornen scheidt.

Een ander aspect is het feit dat er af en toe bloed aan de top van de DIUI-pipet hing na inseminatie. Het is gekend dat het endometrium op het moment van inseminatie broos is door de hyperemie die optreedt tijdens de oestrusperiode (Dellman en Eurell, 1998). Hoe dieper de inseminatiepipet in de baarmoeder wordt ingebracht, hoe vaker er bloedspoortjes op het oppervlak van de inseminatiepipet kunnen waargenomen worden. Het bloed en de stukjes mucosa die kunnen vrijkomen in het uteriene lumen, kunnen een negatief effect hebben op het bevruchtend vermogen van de spermacellen. Het bloed tast niet zo zeer de spermakwaliteit zelf aan maar veroorzaakt vooral agglutinatie (Verberckmoes *et al.*, 2002). Deze agglutinatie zou de oorzaak kunnen zijn van een verlaagd aantal spermacellen dat de plaats van bevruchting bereikt, met lagere bevruchtingsresultaten tot gevolg. In ieder geval werd bij de mens bewezen dat het vermijden van endometriumbeschadiging tijdens DIUI de kans op bevruchting verhoogt (Lavie *et al.*, 1997). Wanneer daarentegen het sperma met de DIUI-pipet in de top van beide uterushoornen gedeponereerd werd in plaats van in het corpus uteri, waren de PR's significant beter. Doordat de spermacellen bij deze methode dichter bij de plaats van bevruchting gedeponereerd worden, zullen ze minder kans hebben om met bloed dat in de baarmoeder kan aanwezig zijn, in contact te komen en bijgevolg te agglutineren.

Een ander nadeel van DIUI zou kunnen zijn dat het de kans op een baarmoederinfectie zou kunnen verhogen. Williams *et al.* (1987) toonden echter aan dat de microbiële flora in de baarmoeder bij rundvee niet beïnvloed wordt door DIUI. Ook in onze veldproef waren er geen aanwijzingen voor baarmoederinfecties nadat tochtige koeien diep intra-uterien geïnsemineerd werden.

Om goed te kunnen insemineren met de DIUI-pipet is voldoende ervaring vereist, aangezien de pipet tot in de top van beide uterushoornen moet gebracht worden zonder de baarmoederwand te beschadigen. De subjectieve indruk van de KI-dierenartsen was dat wanneer een epidurale verdoving werd toegediend, er vlotter kon geïnsemineerd worden. De dieren persten dan immers niet en de manipulatie van het vrouwelijk geslachtsstelsel verliep gemakkelijker. Ondanks dit voordeel en het feit dat epidurale verdoving geen invloed heeft op het spermatransport in de baarmoeder (Thurmon *et al.*, 1996) werd door 11 van de 12 KI-dierenartsen geen epidurale verdoving meer gebruikt na enkele inseminaties met de nieuwe pipet. Het sparen

van tijd en het vermijden van infecties ter hoogte van de staartbasis waren daarvoor de belangrijkste redenen. Eén KI-dierenarts voerde alle DIUI's uit na het geven van een epidurale verdoving en behaalde met DIUI ruim 8% betere PR's dan na klassieke inseminatie. Dat de ervaring een belangrijke rol speelt in de resultaten bekomen na DIUI met de nieuwe pipet komt ook uit de analyse van de interactie tussen KI-dierenarts en KI-methode naar voor. Hoewel deze interactie net niet significant is ($p = 0,06$), toont het wel aan dat de ene KI-dierenarts betere resultaten behaalt met de DIUI-pipet dan de andere (Tabel 2). Ondanks het feit dat de deelnemende KI-dierenartsen de indruk hadden dat het gebruik van de DIUI-pipet vlotter ging naarmate er meer ervaring werd opgedaan, werd er eveneens net geen significant verschil gevonden tussen de drachtigheidsresultaten van de eerste en de laatste twee weken van de inseminatieveldproef. Mogelijk zou er bij het gebruik van een groter aantal dieren wel een significant verschil zijn ontstaan.

Voor elk van de drie KI-methoden werden betere PR's bekomen bij jonge pinken dan bij koeien (Figuur 2). Dit komt overeen met de resultaten beschreven in de literatuur (Fonseca *et al.*, 1983; Hansen *et al.*, 1983; Raheja *et al.*, 1989). Het verschil in drachtigheidspercentage tussen koeien en jonge pinken is te verklaren door een drietal factoren. Ten eerste is er bij melkvee het negatief effect van de toenemende productiviteit op de fertiliteit, dat vooral merkbaar is bij oudere koeien en niet bij mullipare pinken (Jorritsma en Jorritsma, 2000). Hoogproductieve koeien worden moeilijk tochtig gezien, waardoor het inschatten van het juiste inseminatiemoment veel moeilijker is dan bij pinken. Ook zouden de eicellen bij hoogproductieve koeien, die vaak in negatieve energiebalans zijn op het moment van inseminatie, van mindere kwaliteit zijn (Boland *et al.*, 2001; Butler en Smith, 1989). Eveneens hebben de partus en het puerperium een negatief effect op de fertiliteit en zijn de omstandigheden voor de innesteling van het embryo in de baarmoeder beter bij pinken dan bij koeien (Thompson *et al.*, 1983). In onze studie werden bij jonge pinken identieke PR's (63,3%) bekomen na inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri en in beide hoorn toppen. Bij koeien daarentegen lagen de PR's hoger na inseminatie in de hoorn toppen (52,8%) dan na inseminatie in het corpus uteri (50,6%) met de DIUI-pipet. Dit kan veroorzaakt worden door het verschil in baarmoedergrootte van koeien en pinken. Tijdens de spermamigratie van in het corpus uteri tot aan de utero-tubale junctie daalt het aantal spermacellen

beschadiging optreedt van het septum dat beide baarmoederhoornen scheidt.

Een ander aspect is het feit dat er af en toe bloed aan de top van de DIUI-pipet hing na inseminatie. Het is gekend dat het endometrium op het moment van inseminatie broos is door de hyperemie die optreedt tijdens de oestrusperiode (Dellman en Eurell, 1998). Hoe dieper de inseminatiepipet in de baarmoeder wordt ingebracht, hoe vaker er bloedspoortjes op het oppervlak van de inseminatiepipet kunnen waargenomen worden. Het bloed en de stukjes mucosa die kunnen vrijkomen in het uteriene lumen, kunnen een negatief effect hebben op het bevruchtend vermogen van de spermacellen. Het bloed tast niet zo zeer de spermakwaliteit zelf aan maar veroorzaakt vooral agglutinatie (Verberckmoes *et al.*, 2002). Deze agglutinatie zou de oorzaak kunnen zijn van een verlaagd aantal spermacellen dat de plaats van bevruchting bereikt, met lagere bevruchtingsresultaten tot gevolg. In ieder geval werd bij de mens bewezen dat het vermijden van endometriumbeschadiging tijdens DIUI de kans op bevruchting verhoogt (Lavie *et al.*, 1997). Wanneer daarentegen het sperma met de DIUI-pipet in de top van beide uterushoornen gedeponereerd werd in plaats van in het corpus uteri, waren de PR's significant beter. Doordat de spermacellen bij deze methode dicht bij de plaats van bevruchting gedeponereerd worden, zullen ze minder kans hebben om met bloed dat in de baarmoeder kan aanwezig zijn, in contact te komen en bijgevolg te agglutineren.

Een ander nadeel van DIUI zou kunnen zijn dat het de kans op een baarmoederinfectie zou kunnen verhogen. Williams *et al.* (1987) toonden echter aan dat de microbiële flora in de baarmoeder bij rundvee niet beïnvloed wordt door DIUI. Ook in onze veldproef waren er geen aanwijzingen voor baarmoederinfecties nadat tochtige koeien diep intra-uterien geïnsemineerd werden.

Om goed te kunnen insemineren met de DIUI-pipet is voldoende ervaring vereist, aangezien de pipet tot in de top van beide uterushoornen moet gebracht worden zonder de baarmoederwand te beschadigen. De subjectieve indruk van de KI-dierenartsen was dat wanneer een epidurale verdoving werd toegediend, er vlotter kon geïnsemineerd worden. De dieren persten dan immers niet en de manipulatie van het vrouwelijk geslachtsstelsel verliep gemakkelijker. Ondanks dit voordeel en het feit dat epidurale verdoving geen invloed heeft op het spermatransport in de baarmoeder (Thurmon *et al.*, 1996) werd door 11 van de 12 KI-dierenartsen geen epidurale verdoving meer gebruikt na enkele inseminaties met de nieuwe pipet. Het sparen

van tijd en het vermijden van infecties ter hoogte van de staartbasis waren daarvoor de belangrijkste redenen. Eén KI-dierenarts voerde alle DIUI's uit na het geven van een epidurale verdoving en behaalde met DIUI ruim 8% betere PR's dan na klassieke inseminatie. Dat de ervaring een belangrijke rol speelt in de resultaten bekomen na DIUI met de nieuwe pipet komt ook uit de analyse van de interactie tussen KI-dierenarts en KI-methode naar voor. Hoewel deze interactie niet significant is ($p = 0,06$), toont het wel aan dat de ene KI-dierenarts betere resultaten behaalt met de DIUI-pipet dan de andere (Tabel 2). Ondanks het feit dat de deelnemende KI-dierenartsen de indruk hadden dat het gebruik van de DIUI-pipet vlotter ging naarmate er meer ervaring werd opgedaan, werd er eveneens niet geen significant verschil gevonden tussen de drachtigheidsresultaten van de eerste en de laatste twee weken van de inseminatieveldproef. Mogelijk zou er bij het gebruik van een groter aantal dieren wel een significant verschil zijn ontstaan.

Voor elk van de drie KI-methoden werden betere PR's bekomen bij jonge pinken dan bij koeien (Figuur 2). Dit komt overeen met de resultaten beschreven in de literatuur (Fonseca *et al.*, 1983; Hansen *et al.*, 1983; Raheja *et al.*, 1989). Het verschil in drachtigheidspercentage tussen koeien en jonge pinken is te verklaren door een drietal factoren. Ten eerste is er bij melkvee het negatief effect van de toenemende productiviteit op de fertiliteit, dat vooral merkbaar is bij oudere koeien en niet bij mullipare pinken (Jorritsma en Jorritsma, 2000). Hoogproductieve koeien worden moeilijk tochtig gezien, waardoor het inschatten van het juiste inseminatiemoment veel moeilijker is dan bij pinken. Ook zouden de eicellen bij hoogproductieve koeien, die vaak in negatieve energiebalans zijn op het moment van inseminatie, van mindere kwaliteit zijn (Boland *et al.*, 2001; Butler en Smith, 1989). Eveneens hebben de partus en het puerperium een negatief effect op de fertiliteit en zijn de omstandigheden voor de innesteling van het embryo in de baarmoeder beter bij pinken dan bij koeien (Thompson *et al.*, 1983). In onze studie werden bij jonge pinken identieke PR's (63,3%) bekomen na inseminatie met de DIUI-pipet in het corpus uteri en in beide hoorn toppen. Bij koeien daarentegen lagen de PR's hoger na inseminatie in de hoorn toppen (52,8%) dan na inseminatie in het corpus uteri (50,6%) met de DIUI-pipet. Dit kan veroorzaakt worden door het verschil in baarmoedergrootte van koeien en pinken. Tijdens de spermamigratie van in het corpus uteri tot aan de utero-tubale junctie daalt het aantal spermacellen

met een factor 100 (Mitchell *et al.*, 1985; Hunter en Greve, 1998). Hoe groter echter de baarmoeder, hoe meer spermacellen in de plooiën van het endometrium achterblijven en gefagocyteerd zullen worden. Uit onderzoek blijkt immers dat een groot deel van de spermacellen tijdens de migratie verloren gaat door fagocytose (Hawk, 1983). Wanneer met voldoende hoge spermadosissen geïnsemineerd wordt, zal er geen verschil gevonden worden tussen koeien en pinken. Wanneer door het verlagen van de inseminatiedosis het aantal spermacellen dat de plaats van bevruchting bereikt onder de kritische drempelwaarde daalt, zal het voordeel van DIUI duidelijker worden doordat het aantal spermacellen dat verloren gaat tijdens de migratie doorheen de baarmoeder zal verminderen. Hoe groter de baarmoeder en hoe kleiner de inseminatiedosis, hoe groter het voordeel van diepe inseminatie tegenover de klassieke inseminatietechniek is.

Een laatste aspect is de significante daling van de PR's met toenemend rangnummer van de inseminatie. Dit kan verklaard worden door het relatief groter aantal probleemkoeien in de groep van de tweede of derde of meerdere inseminatie.

Hoewel de diepe intra-uteriene inseminatiemethode meer tijd kost dan de klassieke inseminatiemethode, werd in deze veldproef aangetoond dat de nieuwe DIUI-pipet geschikt is om diep intra-uterien te insemineren bij melkvee onder praktijkomstandigheden. In een volgende veldproef zal nagegaan worden of diepe inseminatie met lagere spermadoses even goede drachtigheidsresultaten geeft als inseminatie met de standaard inseminatiedosis met de klassieke KI-methode.

DANKBETUIGINGEN

Dank aan de mensen van de Vlaamse Rundveeteelt Vereniging (VRV) en in het bijzonder aan de KI-dierenartsen die aan de veldproef hebben deelgenomen.

Dank aan het ministerie van landbouw (beurs n° S6012) en het onderzoeksfonds van de RUG (beurs n° 011B8698) en de VRV voor de financiële steun zonder dewelke dit onderzoek niet mogelijk zou geweest zijn. Eveneens dank aan de firma Beldico die eveneens geïnvesteerd heeft in de ontwikkeling van de nieuwe inseminatiepipet.

REFERENTIES

- Boland M.P., Lonergan P., O'Callaghan D. (2001). Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55, 1323-1340.
- Butler W.R., Smith R.D. (1989). Interrelationship between energy balance and post partum reproductive function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 72, 767-783.
- Dalton J.C., Nadir S., Bame J.H., Saacke R.G. (1999). Effect of deep uterine insemination on spermatozoal accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. *Theriogenology* 51, 883-890.
- de Kruif A. (1975). Fertiliteit en subfertiliteit bij het vrouwelijke rund. Doctoraatsthesis, Utrecht.
- Dellman H.D., Eurell J.A. (1998). Female reproductive system. In: Dellmann H. D. and Eurell J.A. (Eds.). *Textbook of Veterinary Histology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA. pp 263-264.
- Fonseca F.A., Britt J.H., McDaniel B.T., Wilk J.C., Rakes A.H. (1983). Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effect of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *Journal of Dairy Science* 66, 1128.
- Foote R.H., Kaproth M.T. (1997). Sperm numbers inseminated in dairy cattle and non return rates revisited. *Journal of Dairy Science* 80, 3072-3076.
- Gandolfi F. (2000). Sperm-mediated transgenesis. *Theriogenology* 53, 127-137.
- Hansen L.B., Freeman A.E., Berger P.J. (1983). Association of heifer fertility with cow fertility and yield in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 66, 306.
- Hawk H.W. (1983). Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal of Dairy Science* 66, 2645-2660.
- Hawk H.W., Tanabe T.Y. (1986). Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *Journal of Animal Science* 63, 551-560.
- Hunter R.H.F., Greve T. (1998). Deep intra uterine insemination of cattle: a fruitful way forward with smaller numbers of spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavia* 39, 149-163.
- Jorritsma H., Jorritsma R. (2000). An overview of fertility statistics and milk production data of 15 dairy operations in south-east Friesland. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 125, 180-184.
- Knight C.W., Patrick T.E., Anderson H.W., Branton C. (1951). The relation of site of semen deposit to breeding efficiency of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 34, 199-202.
- Koops W.J., Grossman M., Den Daas J.H. (1995). A model for reproductive efficiency of dairy bulls. *Journal of Dairy Science* 78, 921-928.
- Larsson B., Larsson K. (1985). Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. *Acta Veterinaria Scandinavia* 26, 385-395.

- Lavie O., Margalioth E.J., Geva-Eldar T., Ben-Chetrit A. (1997). *Journal of Fertility and Sterility* 68, 731-734.
- López-Gatius F., Camón-Urgel J., Angulo-Asensio E. (1988). Effect of single deep insemination on transferable embryo recovery rates in superovulated dairy cows. *Theriogenology* 30, 877-885.
- Macpherson J.W. (1968). Semen placement effects on fertility in bovines. *Journal of Dairy Science* 51, 807-808.
- Marshall C.E., Graves W.M., Meador J.L., Swain J.B., Anderson J.I. (1989). A fertility comparison of uterine body and bicornual semen deposition procedures in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 72, 455.
- McKenna T., Lenz R.W., Fenton S.E., Ax R.L. (1990). Non return rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. *Journal of Dairy Science* 73, 1779-1783.
- Mitchell J.R., Senger P.L., Rosenberger J.L. (1985). Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *Journal of Animal Science* 61, 956-967.
- Nelson V.E., Aalseth E.P., Hawman C.H., Adams G.D., Dawon L.J., McNew R.W. (1987). Sperm discharge and distribution within the cows reproductive tract and after A.I. *Journal of Animal Science* 65, 401.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1999). Allgemeine und vergleichende Betrachtungen von die Gebärmutter. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Parey Buchverlag, Berlin. pp 402.
- Olds D., Seath D.M., Carpenter M.C., Lucas H.L. (1953). Interrelationships between site of deposition, dosage, and number of spermatozoa in diluted semen and fertility of dairy cows inseminated artificially. *Journal of Dairy Science* 36, 1031-1035.
- Rahaja K.L., Burnside E.B., Schaffer L.R. (1989). Heifer fertility and its relationship with cow fertility and production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 72, 2665-2669.
- Salisbury G.W., VanDemark N.L. (1951). The effect of cervical, uterine and cornual insemination on fertility of the dairy cow. *Journal of Dairy Science* 34, 68-74.
- Senger P.L., Becker W.C., Davidge S.T., Hillers J.K., Reeves J.J. (1988). Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *Journal of Animal Science* 66, 3010-3016.
- Stewart D.L., Melrose D.R. (1952). The comparative efficiency of the intra cervical and intra uterine methods of insemination in the dairy cow. *The Veterinary Record* 64, 605-607.
- Suarez S.S. (2001). Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. *Cells tissues organs* 168, 105-112.
- Thompson J.R., Pollak E.J., Pelissier C.L. (1983). Interrelationship of parturition problems, production of subsequent lactation, reproduction and age at first calving. *Journal of Dairy Science* 66, 1119-1127.
- Thurmon J.C., Tranquilli W.J., Benson G.J. (1996). Local and regional anesthetic techniques: ruminants and swine. In: *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia*, 3de uitg., Williams and Wilkins, Baltimore. pp 495.
- Verberckmoes S., De Pauw I., Van Soom A., Dewulf J., de Kruijff A. (2002). Influence of whole blood and blood serum on bovine sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 37, 255.
- Williams B.L., Senger P.L., Oberg J.L. (1987). Influence of cornual insemination on endometrial damage and microbial flora in the bovine uterus. *Journal of Animal Science* 65, 212-216.
- Williams B.L., Gwazdauskas F.C., Whittier W.D., Pearson R.E., Nebel R.L. (1988). Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. *Journal of Animal Science* 71, 2278-2283.
- Zavos P.M., Johns J.T., Heersche G., Miksch D.E. (1885). Site of semen deposition and subsequent conception in synchronized and artificially inseminated (AI) beef heifers. *Journal of Animal Science* 61, 37.