

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2016 – 2017

## **NEONATALE ISOERYTHROLYSE**

Door

Anne-Sofie VERMEERSCH

Promotoren: Dr. Govaere

M. Sc. Roels

Klinische casusbespreking in het kader

van de Masterproef

© 2017 Anne-Sofie Vermeersch



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2016 – 2017

## **NEONATALE ISOERYTHROLYSE**

Door

Anne-Sofie VERMEERSCH

Promotoren: Dr. Govaere

M. Sc. Roels

Klinische casusbespreking in het kader

van de Masterproef

© 2017 Anne-Sofie Vermeersch

## **VOORWOORD**

De verloskunde en neonatologie van de grote huisdieren fascineert mij enorm in al haar facetten. Het was voor mij evident om een casus te kiezen in dit vakgebied. Ik was dan ook verheugd toen dr. Govaere mij deze interessante casus aanbood. Ik zou graag dr. Govaere en M. Sc. Roels bedanken voor hun begeleiding bij deze masterproef. Mijn ouders en vrienden hebben mij onvoorwaardelijk gesteund waarvoor ik erg dankbaar ben.

## INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING .....	1
INLEIDING.....	2
CASUSBESPREKING.....	3
1. BESCHRIJVING.....	3
1.1 Signalement, anamnese en klinisch onderzoek.....	3
1.2 Differentiaal diagnose .....	3
1.3 Diagnostisch plan en verdere aanpak.....	4
2. BESPREKING .....	6
2.1 Neonatale isoerythrolyse .....	6
2.1.1 Wat is neonatale isoerythrolyse? .....	6
2.1.2 Voorwaarden.....	6
2.2 Het belang van colostrum .....	7
2.3 Bloedgroepen.....	8
2.3.1 Systeem van bloedgroepen .....	8
2.3.2 Bloedchimerisme .....	9
2.3.3 Bloedgroepen geassocieerd met neonatale isoerythrolyse.....	9
2.4 Vergelijking met erythroblastosis fetalis bij de mens.....	12
2.5 Klinische symptomen en bloedparameters .....	14
2.6 Diagnose.....	17
2.6.1 Bloedgroepetyping.....	17
2.6.2 Screeningstesten .....	17
2.6.3 Jaundiced Foal Agglutination test .....	18
2.6.4 Differentiaal diagnose .....	19
2.7 Behandeling.....	19
2.7.1 Adequate kwantiteit antistoffen .....	19
2.7.2 Ondersteunende therapie .....	20
2.7.3 Bloedtransfusie en bloedproducten.....	21
2.7.4 Antibiotica .....	23
2.8 Prognose .....	24
2.9 Preventie.....	24
REFERENTIELIJST .....	25
BIJLAGEN .....	27
BIJLAGE I: BLOEDGROEPTYPING VAN DE MERRIE EN HAAR VEULEN .....	27
BIJLAGE II: REFERENTIEWAARDEN VAN HET NEONATALE VEULEN .....	27
BIJLAGE III: POSTNATALE VERANDERINGEN IN HEMATOLOGISCHE PARAMETERS .....	28
BIJLAGE IV: DE VOOR-EN NADELEN VAN DE DIAGNOSTISCHE METHODES.....	29
BIJLAGE V: PROTOCOL VAN DE MINOR CROSS MATCHING TEST .....	29
BIJLAGE VI: HET PROTOCOL VAN DE JAUNDICED FOAL AGGLUTINATION TEST.....	30

## **SAMENVATTING**

In de zomer van 2016 werd een hoog drachtige merrie aangeboden aan de dienst voortplanting en verloskunde van de grote huisdieren. Zij had in de voorgaande jaren reeds 2 veulens verloren aan neonatale isoerythrolyse en de eigenaars vreesden dat dit scenario zich zou herhalen. Deze aandoening ontstaat ten gevolge van de bloedgroep incompatibiliteit tussen de foetus en de merrie. Na de opname van het colostrum dat rijk is aan antistoffen gericht tegen de rode bloedcellen van het veulen, is er een risico op het ontstaan van hemolytische anemie. Naargelang de graad van de ernst van de anemie doen verscheidene symptomen zich voor zoals lethargie en icterus bij de milde klinische uiting van de ziekte en convulsies en zelfs sterfte bij erge gevallen. Er bleek geen bloedgroep incompatibiliteit te bestaan tussen de merrie en haar veulen waardoor er geen risico was op de ontwikkeling van neonatale isoerythrolyse. Er werden postpartum preventieve maatregelen getroffen aangezien de resultaten van de bloedgroepbepaling pas 10 dagen na de geboorte bekend waren.

**Sleutelwoorden:** bloedgroep, colostrum, hemolytische anemie, icterus, neonatale isoerythrolyse

## INLEIDING

Neonatale isoerythrolyse is een immuungemedieerde aandoening die hoofdzakelijk bij het paard, het muilnier en de kat bekend is. Bij de mens komt een gelijkaardige aandoening voor onder de naam 'erythroblastosis foetalis'. Het is de voornaamste oorzaak van hemolytische anemie bij het neonatale veulen doch kent deze aandoening een lage prevalentie in de paardenpopulatie. De rode bloedcellen van de neonaat worden aangevallen door maternale antistoffen die aanwezig zijn in het colostrum. Deze antistoffen ontstaan door bloedgroep incompatibiliteit tussen de merrie en haar veulen. Dit wordt meestal waargenomen bij merries die Aa of Qa negatief zijn: hierbij worden antistoffen tegen Aa en Qa doorgegeven aan het Aa of Qa positieve veulen via het colostrum. De hemolytische anemie leidt tot hypoxie wat in ergere gevallen het falen van één of meerdere organen veroorzaakt. Onder andere lethargie, tachypnee, tachycardie, icterus, hemoglobulinurie en convulsies kunnen optreden. Tevens kunnen verscheidene complicaties zich voordoen zoals leverfalen, kernicterus en septicemie. Het veulen mag de eerste 24-36 h niet meer drinken bij de merrie en moet tijdig voorzien worden van een alternatieve antistoffenbron. Ernstige gevallen van neonatale isoerythrolyse komen in aanmerking voor een bloedtransfusie van een geschikte donor.



# CASUSBESPREKING

## 1. BESCHRIJVING

### 1.1 Signalement, anamnese en klinisch onderzoek

Deze casusbespreking gaat over een 15-jarige schimmelkleurige Belgische Warmbloed merrie. De merrie had reeds 3 veulens gekregen waarvan 2 veulens gestorven waren aan neonatale isoerythrolyse. Over deze veulens is er voor de rest niets bekend. De eigenaar was bang dat dit veulen eveneens neonatale isoerythrolyse zou ontwikkelen maar deze angst bleek onterecht te zijn. Er werd prepartum plasma genomen bij de merrie en opgestuurd naar het laboratorium van de University of California (UC) te Davis voor een bloedgroepanalyse. Het resultaat was niet bekend op het ogenblik van de partus waardoor preventieve maatregelen werden getroffen. Na de partus werd plasma van het veulen genomen en ook opgestuurd naar het diagnostisch laboratorium voor de bloedgroep typing. Vermits het veulen eenzelfde bloedgroep (Ca) draagt als de merrie was hier geen risico voor het optreden van neonatale isoerythrolyse. De partus vond 3 dagen voor de uitgerekende datum plaats. De totale drachtduur bedroeg 334 dagen. Het veulen stond 2 h na de partus recht en na 5 h kwam het meconium af. De placenta kwam 175 min na de partus af. De omtrek van de thorax van het merrieveulen was 91 cm, de schofhoogte bedroeg 108 cm en de kruin-staartbasislengte was 88 cm. Het veulen woog 65 kg op de eerste dag postpartum.

### 1.2 Differentiaal diagnose

Icterus, anemie en hemolyse kunnen optreden door diverse oorzaken naast neonatale isoerythrolyse. Zo kan icterus veroorzaakt worden door leverfalen, hypoxisch-ischemische encephalopathie, septicemie, bacteriële hepatitis, equine herpesvirus 1 infectie, piroplasmose en meconiumobstipatie. Zaken die aanleiding geven tot anemie zijn onder andere bloedingen ten gevolge van trauma, stollingsstoornissen, trombocytopenie, equine infectieuze anemie virus, piroplasmose, disseminated intravascular coagulation (DIC), auto-immuungemedieerde hemolyse, vitamine B12 tekort, ijzertekort, Fell pony syndrome, oxiderende agentia (ajuinen, fenothiazines,...), overmatige toediening van hypotone vloeistoffen en toediening van onvoldoende verdunde dimethylsulfoxide (DMSO). Ook onvoldoende aanmaak van rode bloedcellen door een stoornis ter hoogte van het beenmerg of de nier (erythropoëtiëproductie) kan aanleiding geven tot anemie. Hemothorax en/of hemopericardium ontstaan door bijvoorbeeld een rib die breekt tijdens de partus: een ribfractuur is een frequent voorkomend probleem bij het neonatale veulen. Meestal gaat het om een breuk in de cranioventrale thorax waarbij de derde tot de achtste rib de grootste kans hebben om te breken. Dit kan leiden tot een inwendige bloeding waardoor anemie zich voordoet. Het bloedbeeld kan toch vrij normaal zijn gezien autotransfusie van het bloed optreedt. Als het hart of een groot bloedvat scheurt, kan een fatale bloeding optreden.

De drachtige merrie werd aangeboden vanwege haar voorgeschiedenis van neonatale sterfte toegeschreven aan isoerythrolyse. Het veulen mocht gedurende de eerste levensdagen niet drinken

bij de moeder. Ze vertoonde geen icterus, anemie of hemolyse waardoor er geen sprake was van klinische neonatale isoerythrolyse noch van de differentiaaldiagnoses die hierboven vermeld staan. De bloedgroepbepaling sluit neonatale isoerythrolyse uit.

### **1.3 Diagnostisch plan en verdere aanpak**

Om neonatale isoerythrolyse te diagnosticeren kan men verschillende methodes aanwenden die vermeld zijn in de bespreking. In dit geval werd een bloedgroepbepaling uitgevoerd. Het plasma van zowel de merrie als het veulen werd in het klinisch diagnostisch laboratorium van de UC onderzocht op de aanwezigheid van bloedfactoren A, C, K, P, Q en/of U. Het bloedgroepstype van het veulen was Ca en dat van de merrie Ca en Ka (bijlage I). Er was dus geen risico op het ontwikkelen van neonatale isoerythrolyse. De resultaten van de bloedgroepbepaling waren pas 10 dagen na de partus bekend. Deze aandoening manifesteert zich gedurende de eerste levensdagen waardoor postpartum preventieve maatregelen werden getroffen.

De Jaundiced Foal Agglutination test (JFA test) werd tot op de 1:64 verdunning gedaan op het colostrum van de merrie: er was geen sprake van incompatibiliteit (zie 2.6.3). Een SNAP® foal IgG test (IDEXX Pharmaceuticals, Inc., Hoofddorp, Nederland) werd 29 uur na de partus uitgevoerd waarbij het resultaat  $\geq 800$  mg/dL bedroeg: dit betekent dat het veulen voldoende immunoglobulines had gekregen. De melk van de merrie werd op de eerste dag postpartum gecontroleerd met een refractometer. Het totaal eiwit bedroeg 92 g/L en de specifieke dichtheid 1,353. Enkele uren later was het eiwitgehalte reeds gezakt naar 77,3 g/L waarbij de specifieke dichtheid 1,350 bedroeg. De dag nadien was er een reductie tot 67,0 g/L. Hoe denser de melk en hoe hoger het eiwitgehalte is, des te meer antistoffen er in aanwezig zijn.

Het veulen werd de eerste 2 levensdagen weerhouden om te drinken bij de merrie. De uier van de merrie werd afgeplakt met tape en het veulen kreeg een mondmasker op. Als alternatief kreeg het veulen biest uit de colostrumvoorraad en opgewarmde kunstmelk. Het veulen kreeg tijdens de eerste levensuren 6 keer om het half uur 500 mL biest (3 L biest in totaal) die van een andere merrie afkomstig was. Hierna kreeg ze om het uur tussen de 300 en 550 mL opgewarmde kunstmelk (FoalMilk® van PAVO®, Ingelmunster, België) via een papfles. De merrie werd elke 4 h gemolken waarbij er telkens een variabele kwantiteit melk werd verkregen. Deze variabiliteit kan onder andere te wijten zijn aan de gebruikte melkmethode en het feit dat dit gedaan werd door verschillende studenten. Vanaf de derde levensdag mocht het veulen bij de merrie drinken. Het veulen werd op de eerste dag postpartum om het uur gecontroleerd op icterus en de volgende 3 levensdagen vond deze controle om de 2 h plaats. Het veulen vertoonde geen klinische tekenen van neonatale isoerythrolyse. Het veulen perste en deed koliek op haar tweede levensdag: men voerde een klysma (120 mL) uit en gaf 3 mL Buscopan Compositum® (3,2743 mg butylhyoscine/ml en 443,10 mg metamizol/ml, 5 ml/100 kg, traag I.V., SCS Boehringer Ingelheim Comm. V., Brussel, België). Hierna kwamen zeer harde mestballetjes af. Het klysma werd 2 h later herhaald waarbij er wederom harde mestballen afkwamen. De algemene toestand van het veulen was vrij goed. De huidturgor was soms licht vertraagd. Het veulen en de merrie werden ontslagen uit de kliniek 11 dagen na de geboorte.

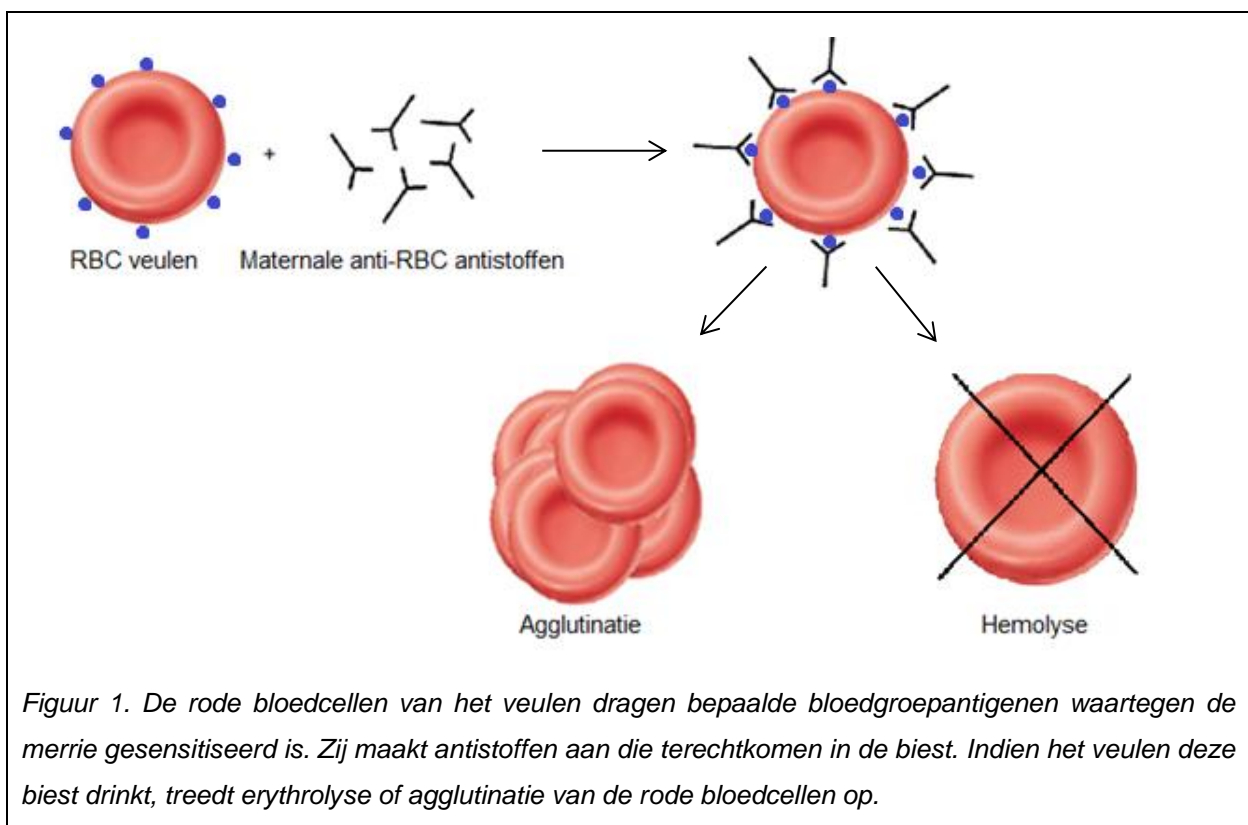
De prognose was goed aangezien hier geen risico was op het optreden van neonatale isoerythrolyse. Er was in het kader van deze casus dus geen verdere opvolging van het veulen noodzakelijk. Nu men de bloedgroepen van de merrie kent, kan men vóór de volgende dekking de bloedgroep van de potentiële dekhengst controleren a.d.h.v. diverse testen die in 2.6 worden besproken.

## 2. BESPREKING

### 2.1 Neonatale isoerythrolyse

#### 2.1.1 Wat is neonatale isoerythrolyse?

Bij neonatale isoerythrolyse worden de rode bloedcellen van het neonatale veulen aangevallen door maternale antilichamen. Deze antilichamen bevinden zich in het colostrum en worden door middel van passieve intestinale opname opgenomen in de bloedbaan. Ze binden aan de rode bloedcellen wat leidt tot agglutinatie en/of voornamelijk lyse van de rode bloedcellen. De complexen worden verwijderd via extravasculaire hemolyse door het mononucleair fagocyterend systeem in de milt en de lever en/of via complement-gemedieerde intravasculaire hemolyse (1,2). Het veulen wordt gezond geboren maar de algemene toestand kan slechter worden na opname van het colostrum. In de Verenigde Staten is de incidentie van neonatale isoerythrolyse het hoogst bij de Standardbreds (2%) en Thoroughbreds (1%) (2-5). Neonatale isoerythrolyse wordt eveneens, zij het met een lagere incidentie, gerapporteerd bij de Appaloosa, Paso Fino, Morgan, Quarter Horse en het Arabische volbloed (5). Bijgevolg is neonatale isoerythrolyse een vrij zeldzame aandoening (2,5). Het wordt wel gezien als de belangrijkste oorzaak van neonatale icterus en anemie (3-6). Neonatale isoerythrolyse treedt slechts op indien aan bepaalde voorwaarden voldaan wordt (zie 2.1.2).



*Figuur 1. De rode bloedcellen van het veulen dragen bepaalde bloedgroepantigenen waartegen de merrie gesensitiseerd is. Zij maakt antistoffen aan die terecht komen in de biest. Indien het veulen deze biest drinkt, treedt erythrolyse of agglutinatie van de rode bloedcellen op.*

#### 2.1.2 Voorwaarden

Neonatale isoerythrolyse treedt op indien er aan de volgende voorwaarden voldaan wordt: De hengst geeft zijn bloedgroepfactor die de merrie niet heeft door aan het veulen. Bovendien moet

de merrie geïmmuniseerd worden via blootstelling aan het vreemde antigen waarop ze als reactie antistoffen produceert. Dit contact kan via meerdere wegen plaatsvinden zoals via een bloedtransfusie met incompatibel bloed, vaccinatie met een homolog weefsel vaccin, transplacentaal contact met foetaal bloed die het vreemde antigen draagt tijdens de (huidige en voorgaande) dracht ten gevolge van een placentale abnormaliteit (bijvoorbeeld een bloeding) of door contact met foetaal bloed tijdens de partus. Indien er sprake is van antigen incompatibiliteit tussen de merrie en haar eerstgeboren veulen is er weinig risico op neonatale isoerythrolyse. Het contact met het foetale bloed vindt vrij laatstijdig in de dracht of zelfs pas bij de partus plaats waardoor de titer van de antistoffen gericht tegen de bloedgroep van het veulen in het colostrum aan de lage kant is (1-2,5-6). Als het volgende veulen eenzelfde antigen incompatibiliteit vertoont, zal de antistoffentiter hoger zijn en loopt het veulen een significant hoger risico op neonatale isoerythrolyse indien er niet ingegrepen wordt (7). Er is een kans op het optreden van neonatale isoerythrolyse als er een sterke hemolytische reactie is vanaf een verdunning van 1:16 in de JFA test (zie 2.6.3). De laatste voorwaarde is dat het veulen de biest van de moeder moet gedronken hebben vooraleer de passieve transfer van antistoffen via de darm niet meer mogelijk is (1-2,8).

## **2.2 Het belang van colostrum**

Paarden kennen geen transplacentale transfer van antilichamen door de specifieke bouw van de placenta waardoor veulens agammaglobulinemisch geboren worden. Er is een minimale hoeveelheid IgM aanwezig in de bloedbaan van de pasgeboren neonatus (9-10). Gespecialiseerde cellen in de dunne darm nemen colostrumdruppels op via pinocytose die via het lymfatische stelsel opgenomen worden in de bloedbaan. De absorptiecapaciteit bereikt een piek 6-8 h na de partus. Na 24 h is er geen absorptie van immunoglobulines meer mogelijk via de darm wegens verlies van deze gespecialiseerde cellen en de aanmaak van borstelzooenzymen zoals lactase en maltase. Tevens daalt de concentratie antistoffen in het colostrum binnen de 6-8 h (1-2,8-9). Gedurende de laatste weken prepartum worden nutriënten en immunoglobulines (IgG, IgM, IgA, IgE) geconcentreerd in het colostrum (11). De belangrijkste colostrale antistof is IgG (1500-5000 mg/dL), gevolgd door IgA (500-1500 mg/dL) en IgM (100-350 mg/dL) (10). Vaccinatie tijdens de dracht helpt om voldoende antistoffen aan te maken die doorgegeven kunnen worden via het colostrum. Het is van vitaal belang dat het veulen dit zo snel mogelijk na de geboorte opneemt om 'failure of passive transfer' te voorkomen: de overlevingskansen van het veulen nemen significant toe na inname van colostrum van een goede kwaliteit. Adequate overdracht van antistoffen zorgt voor een lokale en systemische bescherming tegen pathogene agentia. De lokale bescherming wordt bewerkstelligd door de opname van IgA antistoffen. Op 18 h ouderdom wordt getest of het veulen voldoende antistoffen heeft gekregen. Hiervoor zijn meerdere testen beschikbaar (zie 2.7.1). Directe beoordeling van de kwaliteit van het colostrum gebeurt door middel van radiale immunodiffusie (RID) en enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Het grote nadeel van de RID is dat de testresultaten pas na 24-48 h bekend zijn. De zinksulfaat turbiditeitstest en glutaraaldehyde coagulatie test kunnen ook aangewend worden: deze testen zijn snel, accuraat en goedkoop. De kwaliteit kan indirect beoordeeld worden met eiwit

elektroforese, een Brix refractometer of een colostrometer: deze methodes zijn niet zo accuraat als de voorgaande directe testen. De Brix refractometer meet de optische dichtheid: hoe dener de vloeistof en dus hoe meer antistoffen aanwezig zijn, des te hoger de Brix score zal zijn (tabel 1). Een ander hulpmiddel is de colostrometer die de relatieve dichtheid van het colostrum meet: hoe dener de vloeistof, des te hoger de kwantiteit aan antistoffen. De resultaten van beide instrumenten zijn gecorreleerd met het antistofgehalte in de melk. Macroscopisch hoort colostrum van degelijke kwaliteit dik, kleverig en gelig te zijn (9).

*Tabel 1. De brixscore en de specifieke dichtheid gecorreleerd aan de biestkwaliteit (naar Cash et al., 1999).*

Kwaliteit	Brix score (%)	Specifieke dichtheid	IgG (g/L)
Uitstekend	> 30	≥ 1,10	>80
Goed	20-30	1,08-1,09	50-80
Voldoende	15-20	1,06-1,07	28-50
Onvoldoende	< 15	< 1,06	0-28

## 2.3 Bloedgroepen

### 2.3.1 Systeem van bloedgroepen

Bij het paard zijn 7-8 bloedgroepsystemen bekend die bovendien nog eens onderverdeeld kunnen worden in bloedgroepfactoren (tabel 2). Bloedgroepsysteem T wordt niet internationaal aanvaard. De laboratoria die de bloedgroeptest aanbieden zijn lid van de International Society For Animal Genetics (ISAG). Zij worden om de 2 jaar aan een test onderworpen waarbij hun testresultaten worden vergeleken en gestandaardiseerd. Bovendien krijgt een bloedgroep zo internationale erkenning: een bloedgroep wordt officieel aanvaard indien 2 laboratoria er in slagen om een antilichaam te isoleren tegen deze bloedgroepfactor. Een tweede voorwaarde is dat de resultaten reproduceerbaar moeten zijn voor minstens 40 rode bloedcellen. Het niet voldoen aan deze voorwaarden verklaart waarom bloedgroep T niet officieel aanvaard wordt. Bloedgroepen R en S zijn eveneens geëxcludeerd wegens onvoldoende reactie in de bloedgroeptestprocedure. Het bloedgroepsysteem van het paard wordt aangeduid met een hoofdletter en de bloedgroepfactor met een kleine letter. Indien het paard de bloedgroep niet draagt, wordt er een '-' achter geplaatst. De genen die corresponderen met een welbepaalde bloedgroep coderen voor de aanmaak van moleculen die zich op de oppervlakte van de rode bloedcellen bevinden (12). Deze oppervlaktemoleculen kunnen als antigen fungeren waardoor antistoffen aangemaakt worden.

Tabel 2. De verschillende bloedgroepsystemen en -factoren (naar Bowling et al., 2007).

Bloedgroepsysteem (locus)	Bloedgroepfactoren
A	a, b, c, d, e, f, g
C	a
D	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l, m, o, p, q, r
K	a
P	a, b, c, d
Q	a, b, c
U	a
T	a

### 2.3.2 Bloedchimerisme

Vasculaire anastomose bij een tweeling kan leiden tot de vorming van chimere: dit komt hoofdzakelijk voor bij runderen en schapen maar kan eveneens bij het paard voorkomen. In een studie van Vandeplassche et al. (1970) kwam bloedchimerisme bij 11 van de 34 equine tweelingen voor (13). Bij 7 tweelingen kon geen definitieve diagnose gesteld worden. De chorionale membranen bij deze dizygote tweelingen raakten elkaar louter aan, vormden adhesies of waren zelfs gefusioneerd. In deze studie zag men dat chimerisme reeds bij kleine vasculaire verbindingen kon voorkomen. Bij 4 tweelingen waarvan de chorionale membranen geen fusie of adhesie vertoonden werd chimerisme vastgesteld. Bij 2 tweelingen werd vasculaire anastomose vastgesteld maar geen chimerisme. Het geslachtsapparaat van de merrieveulens bleek normaal te zijn. Bij het rund geeft vasculaire anastomose bij een heteroseksuele tweeling aanleiding tot kweenvorming (freemartinisme). Hierbij vertoont het 'vrouwelijke' kalf een variabele graad van interseksualiteit. Het is nog onzeker of freemartinisme wel voorkomt bij het paard. Door de vasculaire verbindingen vindt een overdracht van cellen waaronder rode bloedcellen plaats. Bloedgroepypering van een veulen wordt zo dus bemoeilijkt indien de kwantiteit van de rode bloedcelpopulaties van beide veulens boven een bepaalde threshold ligt (12,14-15).

### 2.3.3 Bloedgroepen geassocieerd met neonatale isoerythrolyse

Niet alle bloedgroepfactoren zijn even antigeen: voornamelijk de sterk antigenische bloedgroepsystemen A en Q leiden tot de aanmaak van antistoffen (6,12). Hoofdzakelijk de bloedgroepen Aa en Qa worden geassocieerd met neonatale isoerythrolyse bij het veulen. Dit wil zeggen dat de veulens van een Aa- of Qa- merrie een grotere kans hebben op het ontwikkelen van deze aandoening (1). Het feit dat een merrie Aa- en/of Qa- is, leidt niet altijd automatisch tot neonatale isoerythrolyse: Er moet aan een aantal voorwaarden voldaan worden die in 2.1.2 vermeld zijn. In de Thoroughbred populatie is 98% van de merries Aa+ waardoor men bij het fokken van de 2% Aa-merries de bloedgroep van de hengst in de gaten moet houden (tabel 3). Vermoedelijk produceert slechts 50% van de Aa- Thoroughbred merries en 17% van de Aa- Standardbred merries anti-Aa

antilichamen ondanks de bloedgroep incompatibiliteit met de hengst (16). Als men een Aa+ hengst fokt met een Aa- merrie loopt het veulen een aanzienlijk risico op het ontwikkelen van neonatale isoerythrolyse. Het Qa antigen is bij 85% van de Thoroughbred merries aanwezig (tabel 3). Amper 3% van de Qa- Thoroughbred merries produceert anti-Qa antilichamen. Het laatstgenoemde antigen komt quasi niet voor in de Standardbred populatie (16). Andere bloedgroepen zoals Ab, Ac, Db, Pa, Pb, Qc en Ua worden uitzonderlijk gelinkt aan neonatale isoerythrolyse (1-2,4). In een studie van De Graaf-Roelfesema (2007) worden de bloedgroepen Qc en Ua als zwakke antigenen beschouwd maar vermoedelijk veroorzaakten zij bij een aantal Friese veulens neonatale isoerythrolyse (4).

Tabel 3. Frequentie van diverse bloedfactoren bij een aantal paardenrassen (uit Bowling et al., 2007).

Frequentie van bloedfactoren										
	A systeem		C systeem		Q systeem		U systeem		K systeem	
	Aa+	Aa-	Ca+	Ca-	Qa+	Qa-	Ua+	Ua-	Ka+	Ka-
Thoroughbred	98%	2%	83%	17%	85%	15%	18%	82%	5%	95%
Arabisch volbloed	97%	3%	97%	3%	37%	63%	38%	62%	0%	100%
Standardbred	81%	19%	83%	17%	1%	99%	56%	44%	54%	46%
Morgan	81%	19%	90%	10%	1%	99%	46%	54%	1%	99%
Quarter horse	74%	26%	94%	6%	32%	68%	44%	56%	8%	92%
Paso fino	74%	26%	60%	40%	15%	85%	57%	43%	0%	100%
Peruviaanse paso	78%	22%	93%	7%	4%	96%	55%	45%	5%	95%
Tennessee walking horse	70%	30%	93%	7%	3%	97%	88%	12%	4%	96%

Een specifieke ezelfactor is aanwezig op de rode bloedcellen van ezels waardoor elke dracht die voortkomt uit het fokken van een ezelhengst met een paardenmerrie een risico vormt (1,6,16). Deze veulens ontwikkelen vaak ook thrombocytopenie door de aanwezigheid van anti-thrombocyt antistoffen in het colostrum. De preventie van neonatale isoerythrolyse kan in dat geval slechts na het fokken plaatsvinden terwijl men bij het fokken van paarden reeds voor het fokproces kan ingrijpen door middel van het testen van bloedgroep compatibiliteit. Hierbij valt op te merken dat niet elke dracht die voortkomt uit het fokken van paarden waarbij er sprake is van bloedgroep incompatibiliteit leidt tot neonatale isoerythrolyse. Het voorkomen van de ziekte hangt onder andere af van de kans dat het veulen een bloedgroep (met een sterke antigeniciteit) die de merrie niet heeft overerft van de hengst, de kans dat de merrie antistoffen produceert en deze concentreert in het colostrum, de kwantiteit van de antistoffen in het colostrum en hoe sterk desbetreffende antistoffen reageren met antigenen (4). Pariteit en ras spelen ook een belangrijke rol. Pluripare merries die gefokt worden met een incompatibele hengst lopen een groter risico op een veulen met neonatale isoerythrolyse.

Anti-rode bloedcel antilichamen komen niet frequent van nature voor bij het paard en als ze dan toch voorkomen, kennen zij een lage titer. Antistoffen tegen Ca zijn in dat geval de meest voorkomende



natuurlijke antistoffen (12). Een onderzoek van Bailey et al. (1988) toonde aan dat bepaalde merries anti-Ca antistoffen bezitten ondanks het feit dat ze nooit eerder blootgesteld waren aan rode bloedcellen die Ca-moleculen dragen op hun oppervlakte (7). Men vermoedde dat deze paarden antistoffen produceerden tegen omgevingsantigenen die gelijkaardige epitopen vertoonden met de Ca bloedgroep waardoor een kruisreactie met het Ca antigen kon plaatsvinden. De anti-Ca antistoffen konden bij 10% van de Thoroughbred merries en 20% van de Standardbred merries worden aangetoond. De Ca antistoffen lijken geen neonatale isoerythrolyse te veroorzaken en schijnen zelfs een zeker beschermend effect uit te oefenen (1,7): de prevalentie van anti-Aa antistoffen daalt indien anti-Ca antistoffen aanwezig zijn. Men vermoedt dat dit verwezenlijkt wordt doordat de anti-Ca antistoffen de foetale rode bloedcellen uit de maternale bloedbaan verwijderen vooraleer er anti-Aa antistoffen gemaakt kunnen worden tegen deze Aa+ rode bloedcellen (16).

Een studie van De Graaf-Roelfsema (2007) duidde op het onderschatte belang van specifieke hemolytische allo-antilichamen in het ontstaan van neonatale isoerythrolyse (4). Deze antistoffen reageerden in een hemolytische serumtest met alle bloedgroepen uitgezonderd deze van de multipare merrie zelf. Vermoedelijk had de merrie in dit geval antistoffen ontwikkeld tegen een ubiquitair voorkomend antigen. Dit antigen was waarschijnlijk zwak gezien het immuunsysteem vrij laatstijdig werd geactiveerd. Een andere hypothese was dat de antilichamen gevormd werden na een kruisreactie met epitopen op bijvoorbeeld bacteriën. Zowel rode bloedcellen als de celwand van de meeste bacteriën hebben immers gelijkaardige suikerzijketens. Dit fenomeen is bekend in de humane geneeskunde bij het ABO-bloedgroepsysteem.

De antistoffen die neonatale isoerythrolyse veroorzaken bij het paard, verschijnen in het serum rond de laatste maand prepartum en kennen een piek op 9 dagen na de veulening (4,17). In een onderzoek van Bailey et al. (1987) was de antistoffentiter gedaald bij 66% van de merries op dag 28 postpartum (17). In diezelfde studie werden bij 19% van de Standardbred en 9,8% van de Thoroughbred merries anti-rode bloedcel antilichamen in hun serum gedetecteerd (tabel 4). Het leeuwendeel van deze immunoglobulines reageerden echter mild of reageerden enkel bij een lage verdunning in de screeningstest. De meeste immunoglobulines waren gericht tegen Aa, Ca en Qa. Anti-Ca antistoffen vond men bij 13,5% van de merries: de reactiesterkte nam toe naarmate de partus naderde en nam nadien terug af. De anti-Ca antistoffen veroorzaakten geen neonatale isoerythrolyse in deze studie. De maternale antistoffen gericht tegen Ua, Ab, Qa en Aa bereikten hun hoogste titer en activiteit 9 dagen postpartum in 8 van de 12 serumstalen. Dit is van weinig klinisch belang aangezien het veulen na 24 h ouderdom geen antistoffen meer opneemt via de darm. De Ca antistoffen gaven over het algemeen tot 25% hemolyse of zwakke agglutinatie van de rode bloedcellen van het veulen in de screeningstest bij een serumverdunning van  $\geq 1:16$ . Alhoewel deze antistoffen bij een aantal merries zelfs tot 75% hemolyse bij een 1:32 verdunning gaven, vertoonden hun veulens geen klinische symptomen. Antilichamen gericht tegen de overige bloedgroepantigenen (Aa, Ab, Da, Df, Ka, Qa, Ua en een aantal onbekende bloedgroepantigenen) veroorzaakten meestal agglutinatie of hemolyse bij  $\leq 1:4$  verdunning. Bij 1 merrie werden anti-Ab antilichamen aangetroffen die hemolyse veroorzaakten in

de screeningstest tot een 1:128 verdunning maar *in vivo* trad geen klinische neonatale isoerythrolyse op (17).

*Tabel 4. Het percentage van hemolytische en agglutinerende anti-rode bloedcel antistoffen in de sera van drachtige merries. De serumstalen werden 2-4 weken prepartum genomen (naar Bailey et al., 1987).*

Sera	Totaal (reactief)	Lysines	Agglutinines	Lysines + agglutinines	Niet/mild reactief
Standardbred (n = 136)	19,0%	13,2%	3,7%	2,1%	81,0%
Thoroughbred (n = 235)	9,8%	7,2%	1,3%	1,3%	90,2%

## 2.4 Vergelijking met erythroblastosis fetalis bij de mens

Neonatale isoerythrolyse is tevens bekend in de humane geneeskunde onder de naam 'erythroblastosis fetalis'. Dit wordt in veruit de meeste gevallen veroorzaakt door het al dan niet aanwezig zijn van factor D van het rhesus-bloedgroepsysteem: mensen met het genotype Dd of DD zijn rhesuspositief terwijl iemand met het genotype dd rhesusnegatief is. Desondanks het feit dat factor D een sterk antigeen is, reageert het immuunsysteem van de incompatibele moeders niet altijd even krachtig.

Tijdens de bevalling, zeker bij een keizersnede, kan de rhesusnegatieve (Rh-) moeder in contact komen met het rhesuspositieve (Rh+) bloed van haar kind waardoor de moeder anti-Rh antistoffen aanmaakt. Ook bloedtransfusies vormen een mogelijk risico voor de aanmaak van deze antistoffen. Lekkage van foetale rode bloedcellen in de maternale bloedstroom ten gevolge van een placentale bloeding is de belangrijkste oorzaak van erythroblastosis fetalis. Bij haar volgende zwangerschap worden deze IgG's in utero doorgegeven aan haar foetus. Indien dit kind de rhesusfactor draagt op de rode bloedcellen treedt isoerythrolyse op. Bij de mens wordt reeds tijdens de zwangerschap transplacentaal antistoffen tegen de rhesusfactor van het kind doorgegeven. Dit komt door de sterk verschillende bouw van de placenta: de mens heeft een placenta haemochorialis waarbij de maternale endometriale bloedvaten rechtstreeks in contact komen met de chorionale villi van het foetale gedeelte van de placenta. Een Rh+ kind van een Rh- moeder die op voorhand gesensibiliseerd werd, wordt geboren met deze hemolytische aandoening. Het paard daarentegen heeft een placenta epitheliochorialis: alle foetale en maternale lagen van de placenta zijn intact. Bij het paard worden de antistoffen gedurende de laatste maand van de dracht geconcentreerd in het colostrum. Het veulen loopt risico op het ontwikkelen van neonatale isoerythrolyse na opname van het colostrum van diens moeder gedurende de eerste levensuren (18).

Bilirubine wordt na de hemolyse gevormd uit het vrijgekomen hemoglobine en wordt in utero gemetaboliseerd door de placenta. Icterus treedt pas na de bevalling op aangezien de baby de

overmaat aan bilirubine niet zelf kan verwerken. De klinische symptomen van equine en humane neonatale isoerythrolyse zijn gelijkaardig. Een humane baby kan reticulocytose vertonen als reactie op de hemolyse maar bij het paard wordt dit nooit waargenomen. Bij de ergere vormen van erythroblastosis fetalis kan hartfalen, hydrops foetalis of zelfs intra-uteriene sterfte optreden. De foetale hydrops ontstaat door hartfalen die uitgelokt wordt door een verhoogde cardiac output.

Preventief kan men anti-Rh antistoffen toedienen om de Rh+ rode bloedcellen uit de circulatie van de Rh- moeder te verwijderen. Zo kan het immuunsysteem van de moeder niet meer reageren op de Rh+ foetale rode bloedcellen en worden geen anti-Rh antistoffen gevormd. Men dient dit profylactisch toe tijdens het derde trimester (vanaf 28 weken zwangerschap tot de geboorte) of wanneer er een mogelijke sensibilisatie heeft plaatsgevonden zoals bijvoorbeeld een miskraam die in 6% (eerste trimester) tot  $\geq 20\%$  (derde trimester) van de gevallen leidt tot een placentale bloeding. Binnen de 72 h postpartum moet de Rh- moeder nogmaals anti-Rh antistoffen krijgen: dit zorgt ervoor dat de resterende anti-Rh antistoffen verwijderd worden uit de maternale bloedbaan.

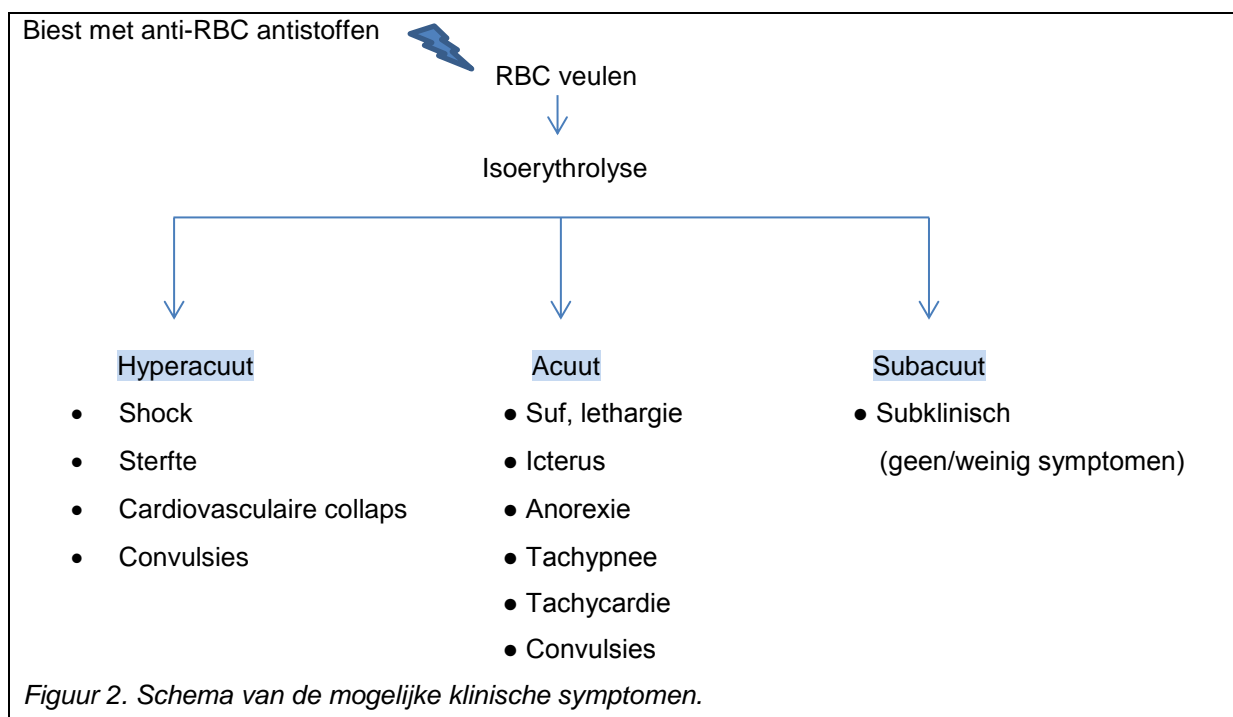
Tijdens het eerste trimester en bij het begin van het derde trimester van de humane zwangerschap gaat men de aanwezigheid van anti- rode bloedcel antistoffen na met behulp van de indirecte Coombs test. Men kan dan ook een screening van de maternale en paternale bloedgroep doen indien dit nog niet bekend is. Na de geboorte kan men navelstrengbloed gebruiken om de bloedgroep van het kind op te bepalen om te zien of hij/zij risico loopt op het ontwikkelen van erythroblastosis fetalis. Gestoorde bloedparameters die gelinkt zijn aan erythroblastosis fetalis kunnen aangetoond worden. De Kleihauer test wordt op het bloed van de moeder uitgevoerd waarbij gekeken wordt hoeveel foetale rode bloedcellen aanwezig zijn om de omvang van placentale bloedingen in te schatten. Bij een reeds gesensibiliseerde moeder kan men het rhesusgenotype van de vader bepalen om te zien in welke mate het kind risico loopt. De foetale rhesus-D status kan men nagaan door een PCR-test (polymerase chain reaction test) te doen op het foetale DNA in het maternale bloed. Het bekijken van de MCA-PSV (middle cerebral artery-peak systolic velocity) met een Doppler is een techniek die matig erge tot ernstige foetale anemie in utero kan aantonen tussen 18 en 36 weken zwangerschap. In dergelijke gevallen vermindert de viscositeit waardoor de systolische pieksnelheid van bloed in de middelste cerebrale arterie toeneemt.

Ter behandeling wordt een bloedtransfusie in utero uitgevoerd of wordt de bevalling vroeger ingeleid om te vermijden dat het kind bezwijkt aan de hemolyse. Bij een bloedtransfusie loopt men onder andere risico op een miskraam. Plasma exchange en fotherapie postpartum behoren ook tot de behandelingsstrategie. Bij fotherapie neemt het bilirubine in de huid en subcutis fotonen op waardoor deze molecule wordt omgezet in wateroplosbare vormen die gemakkelijk geëxcreteerd worden in de urine en gal. Blauw licht (golflengte 460-490 nm) is het meest effectieve licht die kan gebruikt worden. Daarnaast kunnen ook gefilterde halogeenlampen of ledlampen gebruikt worden. De gebruikte dosering en efficaciteit hangen af van de golflengte van het licht, de afstand tussen het kind en de lichtbron en hoeveel huid er effectief wordt blootgesteld. Standaard dient men  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$  toe en bij ergere gevallen van icterus gebruikt men  $30 \mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{nm}$  (18-19).

Humaan A-O-antagonisme kan in ernstige gevallen evenzeer dit ziektebeeld geven. Ook als het kind drager is van een zeldzame bloedgroep zoals Kell of Duffy kan erythroblastosis fetalis zich voordoen. Er bestaan geen profylactische protocols voor niet-Rh bloedgroepen die deze aandoening veroorzaken.

## 2.5 Klinische symptomen en bloedparameters

Het veulen verkeert postpartum in een goede conditie maar de toestand van het veulen kan hyperacuut tot subacuut slechter worden binnen de paar uren tot dagen (figuur 2). De graad van ernst is afhankelijk van de hoeveelheid en de affiniteit van de opgenomen antistoffen. Bij de hyperacute vorm worden meestal geen symptomen waargenomen en sterft het veulen vrij snel. Shock en cardiovasculaire collaps kunnen zich evenwel voordoen. De acute vorm komt vaker voor: het veulen wordt na 2 tot 5 dagen suf, lethargisch en icterisch (1,6). Tegelijkertijd neemt ook de zuigreflex af waardoor anorexie en dehydratatie optreden (1). De aandoening kan zich ook subklinisch manifesteren: in dit geval is de kwantiteit en reactiviteit van de opgenomen antistoffen minimaal en/of kan het veulen de hemolytische anemie compenseren (6).



Het zuurstoftransport is gecompromitteerd door de hemolytische anemie waardoor ter compensatie tachypnee en tachycardie optreden. De snelheid waarmee de hemolytische anemie oprukt, bepaalt de graad waarvoor het veulen kan compenseren. Het gebrek aan zuurstof zorgt ervoor dat het metabolisme anaërober wordt waardoor de anion gap stijgt: in een onderzoek van Boyle et al. (2005) hadden 6 van de 14 veulens anion gap waarden die varieerden van 4 tot 30 (gemiddeld 19, referentiewaarde: 11-19) (6). Het lactaatgehalte geeft een indicatie in hoeverre het metabolisme anaëroob is (referentiewaarde: <2 mmol/L). De metabole acidose zorgt op zijn beurt ook weer voor

tachypnee. De hypoxie kan aangetoond worden door middel van het bepalen van de partiële zuurstofdruk in een arterieel bloedstaal (bijlage II). De partiële CO<sub>2</sub> druk is stabiel tot verhoogd (6,20). Hypoxie kan finaal leiden tot multiple organ failure. Koliek kan zich voordoen ten gevolge van het zuurstoftekort ter hoogte van het spijsverteringsapparaat. Convulsies ontstaan door hersenhypoxie en/of kernicterus. Er treedt prehepatische icterus op na 24-48 h: de slijmvliezen van de ogen en de mond kleuren geel door de afbraak van hemoglobine tot bilirubine. Voor dit stadium zijn de slijmvliezen eerder aan de bleke kant door de anemie. Hemoglobinurie en bilirubinurie worden in een urinestaal aangetoond: de urine kleurt in dat geval roodbruin aan door de aanwezigheid van hemoglobine en/of bilirubine (1,6,17). De massale aanwezigheid van afbraakproducten van de rode bloedcellen zorgt voor overbelasting van de nieren, zeker wanneer er sprake is van dehydratie (5). Bij dehydratie en/of een acute nierinsufficiëntie treden uremie en azotemie op. Hyperfosfatemie en hypocalcemie doen zich voor bij een acute nierinsufficiëntie. De referentiewaarden van Paradis et al. (2006), Boyle et al. (2005) en Reed et al. (2010) zijn te vinden in de bijlagen (bijlage II).

De rode bloedcelparameters zijn sterk gedaald bij de klinische manifestatie van neonatale isoerythrolyse: anemie is aanwezig (2,6,20). Aan het einde van de dracht zijn bij het veulen de maximale waarden van de hemoglobine concentratie, het packed cell volume (PCV) en de kwantiteit rode bloedcellen bereikt (21). Het PCV wijst op het volume rode bloedcellen ten opzichte van het volume plasma. Bij premature veulens worden lagere waarden van de voorgenoemde parameters waargenomen. Na de partus dalen het PCV, de hemoglobine concentratie en de mean corpuscular volume (MCV) (bijlage III). Het MCV geeft de gemiddelde grootte van de rode bloedcellen weer. De mean corpuscular hemoglobine concentratie (MCHC) blijft echter constant: deze parameter geeft de concentratie van hemoglobine in de rode bloedcellen weer. In een studie van Boyle et al. (2005) was de gemiddelde hematocriet  $17,7\% \pm 9,6\%$  bij 16 veulens die gemiddeld 7,5 h oud waren (referentiewaarde gebruikt in deze studie: 33,4-46,6%, leeftijd range 7,5-288 h) (6). Het PCV is bij neonatale isoerythrolyse over het algemeen  $<20\%$ . Bij de klinische uiting van neonatale isoerythrolyse duikt het PCV zelfs vaak  $<12\%$  (2). Een lage PCV kan eveneens veroorzaakt worden door een vroegtijdige ruptuur van de navelstreng. Een lage waarde van het PCV wordt gekoppeld aan leverfalen (3,6). Het PCV normaliseert in de eerstvolgende 1-4 weken (5). De veulens met een hematocriet  $\leq 11\%$  hadden een significant hogere sorbitol dehydrogenase (SDH) activiteit (gemiddeld  $143,7 \pm 202,2$  U/L, referentiewaarde: 0,2-3,8 U/L) in vergelijking met de veulens die een hematocriet  $>11\%$  hadden (gemiddeld  $8,5 \pm 6,5$  U/L). De gemiddelde concentratie hemoglobine was  $6,4 \pm 3,0$  g/dL, wat eveneens te laag is (referentiewaarde: 12,2-16,6 g/dL). De veulens hadden gemiddeld  $4,3 \pm 2,7 \times 10^{12}$  rode bloedcellen/L bloed (referentiewaarde:  $8,5-12,5 \times 10^{12}$  rode bloedcellen/L bloed) (6). Het mean corpuscular volume (MCV) begint halverwege de dracht te dalen en na 4 levensmaanden stijgt deze waarde gradueel tot een mature waarde binnen de referentiewaarden (10). Kalium komt vrij uit de kapotte rode bloedcellen wat kan leiden tot een levensgevaarlijke hyperkaliëmie (bijlage II). Hyperkaliëmie veroorzaakt paralyse en hartritmestoornissen.

Bij hemolyse is de totale eiwitconcentratie normaal, dit in tegenstelling tot een bloeding waarbij deze parameter gedaald is (22). In een studie van Boyle et al. (2005) was de gemiddelde eiwitconcentratie

5,5 ± 1,0 g/dL (referentiewaarde: 4,5-7,7 g/dL) (6). Tijdens de regeneratieve fase van anemie wordt het beenmerg gestimuleerd waardoor leukocytose en een linksverschuiving van neutrofielen optreedt. Het aantal staafkernige neutrofielen bedroeg in een onderzoek van Boyle et al. (2005) gemiddeld 561 staafkernigen/ $\mu$ L (referentiewaarde: <50 staafkernigen/ $\mu$ L) (6). Een hoge kwantiteit witte bloedcellen gecombineerd met een veel staafkernigen komt ook voor bij een systemische inflammatoire respons syndroom (SIRS) zoals sepsis.

Bloedonderzoek toont hyperbilirubinemie aan (referentiewaarde totaal bilirubine: 0-80  $\mu$ L) (2,6,23). Zowel de geconjugeerde (directe) als de ongeconjugeerde (indirecte) vorm van bilirubine is verhoogd maar de nadruk ligt op de ongeconjugeerde vorm (6,22). Hemolyse geeft hoofdzakelijk een gestegen indirect bilirubinegehalte. De directe hyperbilirubinemie ontstaat door secundaire leverschade. Deze hepatocellulaire schade ontstaat door hypoxie, door de ijzerintoxicatie ten gevolge van hemosiderose en door de overmaat aan bilirubine die in de hepatocyten wordt opgestapeld (6). Het geven van meerdere bloedtransfusies kan leiden tot een overload van ijzer die op zijn beurt leverschade veroorzaakt (3). Neonatale veulens zijn, zeker in vergelijking met andere diersoorten, bijzonder gevoelig aan een hoge concentratie ijzer. In een studie van Mullaney et al. (1988) was de dosering van 16,5 mg ijzerfumaaraat/kg lichaamsgewicht per os reeds in staat om sterfte te veroorzaken bij 5 neonatale veulens (n = 8) en leverletsels bij 8 neonati (24). Bij het toedienen van 2-3 L bloedproducten kan deze dosering reeds bereikt worden. Toch is er een grotere kwantiteit bloedproducten nodig om toxiciteit te veroorzaken vermits het ijzer niet gelijktijdig uit alle rode bloedcellen vrijkomt (24). Leverfalen kan worden gediagnosticeerd aan de hand van de gestegen activiteit van leverenzymen en een hogere plasmaconcentratie van galzuren en ammoniak. Leverenzymen zoals gammaglutamyltransferase (GGT), sorbitol dehydrogenase (SDH), alkalische fosfatase (AP), lactaat dehydrogenase (LDH), aspartaat-aminotransaminase (AST) kunnen stijgen. LDH, AST en AP zijn enzymen die niet leverspecifiek zijn. Histologisch onderzoek van de lever kan leverschade bevestigen. Voornamelijk de centrolobulaire regio van de lever vertoont degeneratie en necrose aangezien deze regio het laatst voorzien wordt van bloed (3).

Kernicterus is een encephalopathie veroorzaakt door een overmaat aan bilirubine waarbij op histologische coupes van de hersenen multifocale haarden van neuronale degeneratie te zien zijn ter hoogte van de hippocampus, cerebrale cortex en cerebellaire purkinjecellen. Zeker bij een hoge plasmaconcentratie en bij neonati is bilirubine in staat om door de bloed-hersenbarrière te geraken (23). In een studie van Polkes et al. (2008) hadden 10% van de aangetaste veulens leverfalen en 8% vertoonde kernicterus (3). Volgens dezelfde auteurs waren in deze studie de odds voor het ontwikkelen van kernicterus 17 keer hoger indien het veulen een totaal bilirubine gehalte heeft van  $\geq$  461,7  $\mu$ mol/L (bijlage II).

De rectale temperatuur is niet altijd betrouwbaar bij neonati. In het geval van hemolyse kan deze zowel verlaagd, normaal als verhoogd zijn (bijlage II) (9). Meestal treedt koorts op door de hemolyse of door septicemie.

De meest voorkomende complicaties die mogelijk optreden zijn hypoglycemie, leverfalen, kernicterus, bacteriële septicemie en polysynovitis. In een studie van Polkes et al. (2008) stierven neonati of werden ze geëuthanaseerd door het optreden van leverfalen (n = 7), kernicterus (n = 6) of bacteriële septicemie (n = 3) (3). Het overlevingspercentage in dit onderzoek bedroeg 75% (totaal aantal veulens met neonatale isoerythrolyse = 72). Hypoglycemie treedt op als het veulen anorexie vertoont. Neonati zijn sowieso gevoeliger dan volwassen dieren voor het optreden van hypoglycemie. Bij een zwak veulen met een slechte of afwezige zuigreflex kan aspiratiepneumonie ontstaan bij het per oraal toedienen van melk via een papfles.

## **2.6 Diagnose**

De diagnose van neonatale isoerythrolyse kan gesteld worden a.d.h.v. bloedgroeypering, screeningstesten en de Jaundiced Foal Agglutination test. Men kan ook kijken naar de klinische symptomen en de bloedparameters (zie 2.5). Een belangrijke opmerking is dat *in vitro* testen niet altijd perfect het *in vivo* gedrag van antistoffen reflecteren (2). De bruikbare methoden zijn in een tabel beschreven (bijlage IV). Testen die agglutinatie als resultaat hebben zoals de minor cross matching test zijn minder betrouwbaar vermits de anti-RBC antistoffen over het algemeen een meer hemolytisch karakter hebben.

### **2.6.1 Bloedgroeypering**

Bloedgroeypering kan bloedgroep incompatibiliteit aantonen. Hierbij test men met welke antilichamen het plasma van de merrie en/of de hengst reageert. Indien bijvoorbeeld het plasma van een merrie reageert met de anti-Ab antilichamen, wil dit zeggen dat zij de bloedgroep Ab draagt. Deze procedure wordt niet standaard toegepast in Europa maar wel in landen waar neonatale isoerythrolyse couranter voorkomt zoals in de Verenigde Staten. Dit kan ook aangewend worden voor het bewijzen van ouderschap, alhoewel tegenwoordig DNA analyse vaker wordt gehanteerd (12).

### **2.6.2 Screeningstesten**

Een accurate methode is om 1-2 weken prepartum de antistoffen tegen een bloedgroepfactor in het serum of het colostrum van de merrie aan te tonen door middel van een agglutinerende of hemolytische test. De hemolytische test is gevoeliger gezien de alloantistoffen zich meer lytisch dan agglutinerend gedragen (1,4). Bij deze screeningstest wordt het maternale serum of colostrum getest in een panel van rode bloedcellen van 11 paarden (met de bloedgroepen Aa, Ab, Ac, Ca, Ka, Pa, Pb, Qa, Qb, Qc en Ua) en eventueel een ezel. Dit wijst er niet definitief op dat neonatale isoerythrolyse zal optreden vermits het bloedgroeytype van het veulen nog niet gekend is. Een betere methode is om de rode bloedcellen van de hengst te gebruiken in het panel van deze test vermits het veulen mogelijk een of meerdere bloedgroeyantigenen heeft overgeërfd van zijn vader (1,16). Postpartum kunnen de alloantistoffen worden aangetoond door middel van een minor cross matching test waarbij het serum van de moeder wordt samengevoegd met rode bloedcellen van het veulen (vóór opname van het colostrum) of de hengst: indien er sprake is van incompatibiliteit treedt agglutinatie op (1). Als men complement toevoegt, treedt hemolyse op (bijlage V). Naast deze diagnostische test kan men de

directe Coombs test gebruiken die de immunoglobulines op de membraan van de rode bloedcellen aantoonst: het polyvalente Coombs reagens (anti-antilichamen) wordt geïncubeerd met de gewassen rode bloedcellen van het veulen. De cross matching test wordt verkozen boven de directe Coombs test omdat de laatstgenoemde vaak vals negatieve resultaten voortbrengt. Antistoffen aantonen in het colostrum blijkt minder betrouwbaar te zijn (1).

### 2.6.3 Jaundiced Foal Agglutination test

Uhner et al. (2012) beschouwden de 'Jaundiced Foal Agglutination test' (JFA test) als een mogelijk middel dat kan gebruikt worden ter preventie van neonatale isoerythrolyse (25, bijlage VI). Het kan eveneens aangewend worden voor het opvolgen van de antilichamentiter in de melk. Deze test wordt gebruikt om te kijken of er maternale antistoffen in het serum en/of colostrum aanwezig zijn die gericht zijn tegen de rode bloedcellen van het veulen. Agglutinatie van de rode bloedcellen wijst op de aanwezigheid van dergelijke antistoffen. Bij de JFA test wordt een verdunningsreeks gemaakt van het colostrum en serum van de merrie (bijvoorbeeld 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 en 1:32) waar een druppel veulenbloed (met EDTA) aan wordt toegevoegd (16,25). Het dient opgemerkt te worden dat het veulen niet mag drinken voor de bloedafname. Vals positieve reacties kunnen bekomen worden doordat het veulen colostrum heeft gedronken bij de merrie voor de bloedafname. Dit kan leiden tot auto-agglutinatie als de rode bloedcellen bedekt worden door de maternale antilichamen. Het is belangrijk om dus ook een controlestaal te gebruiken: hierbij voegt men het veulenbloed toe aan 1 mL 0,9% NaCl. Als agglutinatie wordt opgemerkt, wijst dit erop dat het veulen reeds antistoffen draagt op de rode bloedcellen. Indien het bloed van het nuchtere neonatale veulen niet beschikbaar is, kan men zich wenden tot het bloed van de vader (8). Een lage verdunning van colostrum doet soms rode bloedcellen klonteren door de hoge viscositeit. In dat geval kunnen de rode bloedcellen van de merrie gebruikt worden als controle in de test. In het onderzoek van Uhner et al. (2012) werd de eerste 2 dagen postpartum een sterke agglutinatiereactie opgemerkt vanaf de 1:16 verdunning indien het veulen 'at risk' was voor neonatale isoerythrolyse (25). Nadien nam de sterkte van deze reactie af: op dag 5 was de test negatief voor het colostrum en licht positief voor het serum. De JFA test is positief bij een muildiverueven 'at risk' vanaf een 1:64 verdunning (8). Het veulen mag drinken bij de merrie op voorwaarde dat er geen agglutinatie optreedt bij <1:16 verdunning van het colostrum. In het geval van een muildiverueven mag gedronken worden indien er geen agglutinatie is bij verdunning <1:64 (16).



Figuur 3. De linkerfoto toont een negatief resultaat: er is geen agglutinatie. De foto rechts toont een +4 score. (Uit Paradis et al., 2006).



#### **2.6.4 Differentiaal diagnose**

Niet enkel neonatale isoerythrolyse geeft aanleiding tot anemie, hemolyse en icterus. Anemie kan ook optreden door bloedverlies na trauma veroorzaakt door een gebeurtenis of handeling tijdens de partus, stollingsstoornissen, thrombocytopenie, hemolyse door infectie (bijvoorbeeld piroplasmose of equine infectieuze anemie), disseminated intravascular coagulation (DIC), ijzertekort, Fell pony syndrome, vitamine B12 tekort en immuungemedieerde hemolytische anemie (IMHA) (2). Bij een bloeding zou de totale eiwitconcentratie dalen (22). IMHA (met uitzondering van neonatale isoerythrolyse) is zeldzaam bij neonati (3). Een productiestoornis van rode bloedcellen ter hoogte van het beenmerg of van erythropoëetine in de nier is een mogelijke oorzaak, zij het minder waarschijnlijk bij een neonatus. Een ribfractuur ontstaan tijdens de partus kan leiden tot een hemothorax en/of hemopericardium bij het scheuren van een bloedvat en/of het hart.

Andere minder voorkomende oorzaken van hemolyse zijn de toediening van oxiderende agentia (ajuinen, fenothiazines,...), intraveneuze toediening van hypotone vloeistoffen of onvoldoende verdunde dimethylsulfoxide (DMSO) (3). De kans is klein dat de voorgaand genoemde agentia oorzaken zijn van hemolyse bij neonati. Disseminated intravascular coagulation (DIC) kan ontstaan ten gevolge van een incompatibele bloedtransfusie, bacteriële toxines of septicemie (2,22).

Icterus kan zich voordoen bij onder andere septicemie, bacteriële hepatitis, piroplasmose, meconiumobstipatie en leverfalen. Indien de icterus zou worden veroorzaakt door leverfalen of een septicemie zou er geen anemie aanwezig zijn (1). Hypoxisch-ischemische encephalopathie en EHV-1 kunnen de lever beschadigen en eveneens leiden tot icterus (26). Koliek kan een stijging van bilirubine teweeg brengen en kan dus ook het beeld van icterus geven.

### **2.7 Behandeling**

#### **2.7.1 Adequate kwantiteit antistoffen**

Bloedgroep incompatibiliteit tussen de merrie en het veulen vormt een spoedsituatie waarbij men zo snel mogelijk moet ingrijpen. Het veulen mag de eerste 24-36 levensuren niet meer drinken bij de merrie maar moet wel voldoende antistoffen krijgen: het veulen draagt bij voorkeur een muilkorf of kan van de moeder gescheiden worden (5). Het veulen mag eventueel vroeger bij de merrie drinken op voorwaarde dat de JFA test een veilige titer aantoont in de melk. Het voorzien van voldoende antistoffen wordt bewerkstelligd door het gebruiken van (vers of ingevroren) colostrum van goede kwaliteit of plasma. Colostrum geniet de voorkeur gezien diens unieke samenstelling: het veulen krijgt allerhande nuttige componenten binnen zoals lactoferrine, witte bloedcellen, immunoglobulines, cytokines en groeifactoren. Bovien colostrum kan eveneens aangewend worden maar de halfwaardetijd van boviene IgG en IgM in de bloedbaan is korter dan de equine equivalent (9-10). Een bijkomende complicerende factor is dat testen die equine IgG's detecteren niet gebruikt kunnen worden ter monitoring van de passieve transfer van boviene IgG's. Bovendien zijn de meeste van deze antistoffen gericht tegen typische boviene pathogenen (9). Volgens Sprayberry et al. (2003) zijn boviene antistoffen soms toch in staat om equine pathogenen te opsoniseren (9). Het colostrum van

de 'at risk' merrie wordt bij voorkeur niet gebruikt in een colostrumbank. De donormerrie is bij voorkeur een pluripare merrie tussen 4 en 15 jaar oud die op regelmatige basis gevaccineerd wordt en die geen veulens met neonatale isoerythrolyse heeft voortgebracht. Bloedgroeytyping van deze donormerrie is wenselijk en is nuttig indien ook de bloedgroepen van de ouderdieren van het veulen gekend zijn. Colostrum kan men na filtratie invriezen aan -4°C voor ongeveer een jaar (9). Tijdens de eerste 6-12 levensuren moet het veulen 200-250 mL colostrum per uur drinken (8). De toediening van 1 L colostrum van goede kwaliteit doet het serum IgG gehalte met 200-400 mg/dL toenemen (9). Later geeft men kunstmelk per oraal of via een slokdarmsonde: het veulen moet om de 2 h minstens 1% van zijn lichaamsgewicht in melk krijgen. Door melk met een papfles te geven loopt het veulen bij tegenstribbelen of door zwakte risico op aspiratiepneumonie. De merrie zelf moet minstens om de 2-4 h gemolken worden om mastitis en ongemak te vermijden (1). Tevens wordt de melkproductie door het melken onderhouden. Deze melk kan gebruikt worden om de JFA test op uit te voeren ter monitoring van het antistoffengehalte. De intraveneuze toediening van een alternatief zoals commerciële gelyofiliseerde equine IgG, vers plasma, ingevroren plasma of hyperimmuun plasma is >18 h postpartum aangewezen vermits de intestinale opname van macromoleculen afneemt (10).

Een ELISA zoals de SNAP ® foal IgG test (IDEXX Pharmaceuticals, Inc., Hoofddorp, Nederland) kan 18 h postpartum uitgevoerd worden op het serum van het veulen om te controleren of er voldoende equine IgG's in de bloedcirculatie aanwezig zijn. Indien de serum IgG concentratie <400 mg/dL is, is er sprake van 'failure of passive transfer' en moet een plasmatransfusie overwogen worden. Indien de uitkomst ≥800 mg/dL bedraagt, is er sprake van voldoende passieve transfer van antistoffen (1,8-9). Het dient opgemerkt te worden dat dit geen informatie geeft over de specificiteit van de antistoffen: er worden verschillende subisotypes van IgG gemaakt tegen diverse antigenen. Zo worden IgGa en IgGb aangemaakt tegen equine influenza. Hoeveel extra IgG's dat het veulen moet ontvangen, hangt onder andere af van de aanwezige kwantiteit van IgG's (9). Ongeveer de helft van de toegediende antistoffen treedt uit de bloedbaan. Bij septische veulens ligt dit gehalte hoger en bovendien worden antistoffen in een hogere mate gekataboliseerd door het lichaam (9). Andere (semi)kwantitatieve testen die gebruikt worden, zijn bijvoorbeeld de radiale immunodiffusie test, de gemodificeerde zinksulfaat turbiditeitstest en de glutaraaldehyde coagulatie test (8-9).

De merrie mag haar veulen zogen als de antistoffentiter in haar melk voldoende gezakt is of als de darm van het veulen impermeabel is geworden voor antistoffen (8). Volgens Blackmer et al. (2002) daalden antistoffentiters in de melk binnen de 6-8 h drastisch waardoor het veulen reeds na 24 h gezoogd mocht worden door de merrie (8). In een studie van MacLeay et al. (2001) reageerden de anti-Db antistoffen van de merrie 4 maanden na de partus *in vitro* nog steeds sterk hemolytisch desondanks de lage titer (2).

### **2.7.2 Ondersteunende therapie**

Het veulen moet een adequate ondersteunende therapie krijgen: warmte, rust en liefde. Veulens zijn gevoelig aan hypothermie door de immaturiteit van hun thermoregulatiesysteem, hun hoge oppervlakte/lichaamsgewicht ratio en beperkte vetreserves (10). Intranasale zuurstoftoediening aan 5-10 L/min kan de toestand van het veulen aanzienlijk verbeteren (1,5,23). Om pigment nefropathie,

azotemie, dehydratatie, elektrolyet onevenwicht en metabole acidose te corrigeren, wordt intraveneuze vloeistoftherapie toegepast met polyionische vloeistoffen zoals Ringer lactaat (Vetivex®, 4 mL/kg/h, I.V., Dechra Limited, North Yorkshire, Verenigd Koninkrijk) (1,5,22-23). Het volume geproduceerde urine moet hierbij in de gaten gehouden worden. Bij hypoglycemie moet het veulen per oraal of intraveneus extra glucose krijgen. Regelmatig een bloedonderzoek en bloedgasanalyse uitvoeren is zeker aangewezen ter monitoring van het veulen. Convulsies kunnen behandeld worden met bijvoorbeeld diazepam (Ziapam®, 5 mg/mL, 5-10 mg/kg, I.V., Laboratoire TVM, Lempdes, Frankrijk) of fenobarbital (Fenobarbital TEVA®, 50 mg/mL, 2-3 mg/kg I.V. bolus over 15 minuten, Teva Nederland B.V., Haarlem, Nederland) (9,22). Fenobarbital stimuleert de synthese van een hepatisch enzyme die zorgt voor de conjugatie van bilirubine. Supplementatie met vitamine E en selenium supplementen kunnen ook toegepast worden (23). Men moet beducht zijn voor het optreden van complicaties zoals septicemie, nierfalen, leverfalen en pneumonie (5). Fototherapie zoals beschreven in 2.4 kan experimenteel worden toegepast bij het veulen. Er is hier echter nog geen eenduidig protocol voor beschreven. In een onderzoek van Duran et al. (2009) werden 4 klinisch normale veulens in een apart gebouwd hokje in de stal blootgesteld aan blauw licht (40 W lampen) (27). Ze mochten om de 2 h uit het hokje om een halfuur te drinken bij de merrie. Elke 12 h werd een bloedstaal genomen. De veulens hadden in vergelijking met een controlegroep die geen fototherapie kreeg reeds na 48 h een lagere totale serum bilirubine concentratie. Na een week was de gemiddelde concentratie serum totaal bilirubine  $25.05 \pm 1.34 \mu\text{mol/L}$  bij de behandelde groepen en  $33.77 \pm 1.64 \mu\text{mol/L}$  in de controlegroep. De gemiddelde indirecte bilirubine concentratie was toen  $17.67 \pm 2.33 \mu\text{mol/L}$  en  $23.21 \pm 1.54 \mu\text{mol/L}$  respectievelijk voor de behandelde en onbehandelde groep.

### **2.7.3 Bloedtransfusie en bloedproducten**

Als het veulen er klinisch slecht aan toe is en slechte bloedwaarden heeft (zoals tachypnee, PCV <12%, lactaatgehalte >4 mmol/L en een anion gap waarde >19), kan men een bloedtransfusie van een geschikte donor of het toedienen van gewassen maternale rode bloedcellen overwegen. Een geschikte donor is een paard die geen antistoffen heeft tegen de bloedgroep van het veulen. Voor de transfusie voert men best een minor cross matching test uit. In de praktijk is de bloedgroep van een paard meestal niet gekend en gebruikt men het bloed van een oudere ruin van dezelfde stalling. Een minimumgehalte van 1200 mg/dL IgG in het plasma van de donor is gewenst. Het is heel moeilijk om te achterhalen hoeveel IgG's een ziek veulen exact nodig heeft: naast de IgG status van het veulen en de concentratie in het donorbloed is ook de toestand van het veulen belangrijk. Men kan het IgG gehalte bij een gezond veulen met 20% verhogen door middel van het toedienen van 1 L plasma van goede kwaliteit terwijl men slechts 10% verhoging ziet bij een ziek veulen. Men geeft 2-4 L bloed over een tijdsperiode van 2-4 h (5,9). De eerste 300 mL plasma moet traag gegeven worden aan over een tijdsperiode van 45 min. Het veulen moet grondig gemonitord worden: een transfusiereactie zoals een anafylactische reactie kan immers optreden. Indien het veulen dergelijke reactie niet vertoont, mag men het plasma aan een snelheid toedienen van 1 L/h (23). Een muildiver veulen mag geen bloed ontvangen van een merrie die reeds gefokt werd met een ezelhengst (1). Het normale bloedvolume bedraagt 151 mL/kg lichaamsgewicht (1). Er bestaat een formule die gebruikt kan worden om het totale volume bloed te berekenen die moet men toedienen (1, figuur 4).

$$\text{Volume} = \text{LG (kg)} \times \text{bloedvolume (mL/kg)} \times \frac{\text{PCV}_a - \text{PCV}_b}{\text{PCV}_c}$$

*Figuur 4: De formule om het totale volume bloed te berekenen die men moet toedienen bij een transfusie. PCVa is het PCV die men wil bekomen, PCVb is het huidige PCV en PCVc is het PCV van de donor (naar Reed et al., 2010).*

Men bekomt de gewassen rode bloedcellen van de merrie door middel van het centrifugeren van haar bloed aan 1000 g voor 1 min en het verwijderen van de plasmafractie. Het 'wassen' doet men door steriele isotone 0,9% NaCl oplossing toe te voegen aan de resterende pellet van rode bloedcellen. Dit geheel wordt gecentrifugeerd waarna de bovenstaande vloeistof wordt verwijderd. Daarna wordt opnieuw steriele fysiologische vloeistof toegevoegd en het proces wordt meerdere malen herhaald. Het eindresultaat is een mengsel van packed rode bloedcellen met een gelijk volume fysiologische oplossing: men dient 1-2 L toe over 2-4 h (1,22). Het toedienen van dergelijke packed rode bloedcellen voorkomt het optreden van volume overload die kan optreden in het geval van bloedtransfusie.

Een bloedtransfusie houdt sowieso tal van risico's in: hemolyse, koorts, hypothermie, volume overload, een korte overlevingsduur van de rode bloedcellen, infecties,... Bij het optreden van een transfusiëreactie ziet men onder andere tachycardie, tachypnee, trillen, urticaria, oedeem, hoesten en nervositeit bij de acceptor (9). Andere rassen en minder gerelateerde paarden geven een groter risico op een transfusiëreactie (7). Bij het zien van dergelijke transfusiëreactie moet de transfusie stopgezet worden en kan men medicatie toedienen. Antihistaminica zoals diphenhydramine (Benadryl®, 50 mg/mL, 0,5-1 mg/kg, traag I.V., Vemedica Manufacturing B.V., Diemen, Nederland) of corticosteroïden worden aangewend bij een anafylactische reactie. Adrenaline (Adrenaline Tartrate®, 1 mg/mL, 1 mL/45 kg, I.M./S.C., Laboratoria STEROP N.V., Brussel, België) en een corticosteroïd (Dexa-ject®, 0,06 mg/kg, 2 mg/mL, I.V., Dopharma Research B.V., Raamsdonksveer, Nederland) worden toegediend bij shock (9). Een volume overload kan aangepakt worden door het toedienen van diuretica zoals furosemide (Dimazon®, 50 mg/mL, 5-10 mL/patiënt, q6-8 h, I.V., MSD Animal Health BVBA, Brussel, België).

Getransfereerde rode bloedcellen hebben een veel kortere levensduur in vergelijking met de verwachte levensduur van gemiddeld 145 dagen. Bij volwassen paarden is dit minder dan 4 dagen. In een studie van Smith et al. (1992) zag men dat de rode bloedcellen van een ongerelateerde ruïn  $5,2 \pm 1,1$  dagen overleefden bij 5 veulens (28). Bij het toedienen van de rode bloedcellen van de moeder was de overlevingsduur  $5,5 \pm 1,0$  dagen. Het maakt in het kader van erythrocytaire overlevingsduur dus niet uit of de rode bloedcellen afkomstig zijn van de moeder of van een compatibele donor (3,28).

Plasmaferese kan toegepast worden ter preventie van kernicterus: in een studie van Broux et al. (2015) werd een daling van meer dan 50% van de totale bilirubineconcentratie vastgesteld (23). Het is een techniek die in de humane geneeskunde gebruikt wordt voor de behandeling van onder andere

hyperbilirubinemie, auto-immune aandoeningen en intoxicaties. Bij deze techniek wordt een plasmaferesetoestel en 3 L donorplasma gebruikt. Verschillende technieken kunnen toegepast worden maar in de studie van Broux et al. (2015) paste men 'discontinuous flow centrifugation' toe: dit is een methode waarbij men intermitterend tijdens 3 min 300 mL bloed van het veulen aftapt waarna dit gecentrifugeerd wordt na het toevoegen van een anticoagulans (23). Daarna krijgt het veulen de rode bloedcellen terug toegediend. Tegelijkertijd ontvangt het veulen 3 L plasma van een donoraard over een bepaalde tijdspanne. Bij risico op het optreden van cardiovasculaire complicaties kan een andere techniek gehanteerd worden: plasmafiltratie die slechts 50 mL plasma verwijdert per tijdseenheid. De filter houdt de rode bloedcellen tegen: deze worden samen met donorplasma toegediend aan het veulen. Een groot nadeel van deze techniek is dat het veulen hypocalcemie kan ontwikkelen door het toevoegen van de anticoagulans. Men voegt dit product toe gezien bloed de neiging heeft om klonters te vormen in het plasmaferesetoestel. Zo cheleert de anticoagulans citraat calcium die een belangrijke speler is in de stollingscascade waardoor (sub)klinische hypocalcemie kan ontstaan. Het is van uitermate belang om de calciumspiegel nauwlettend in de gaten te houden. Naast hypocalcemie kunnen hypotensie, klontervorming en immunosuppressie voorkomen (23).

Gepolymeriseerd boviene hemoglobine (Oxyglobine®, 10-30 mL/kg, I.V., 10 mL/kg/h, Biopure Netherlands B.V., Amsterdam, Nederland) is een alternatieve behandelingsmethode voor als een bloedtransfusie niet mogelijk is of als de PCV levensbedreigend laag is en men snel moet handelen (1,22). Deze behandeling wordt voornamelijk gebruikt om de periode te overbruggen waarin gewassen rode bloedcellen of een bloedtransfusie worden voorbereid. Gepolymeriseerd boviene hemoglobine is een zuurstofdragende molecule die de oncotische druk in de bloedbaan en de arteriële zuurstofconcentratie verhoogt. De molecule is weinig antigeen gezien de structuur van hemoglobine tussen diersoorten onderling vrij gelijkaardig is. In de retrospectieve studie van Polkes et al. (2008) werden de odds om te sterven 8,38 keer hoger bij elke bijkomende behandeling met bloedproducten (3). Dit is wellicht te wijten aan het feit dat de veulens die op dergelijke manier behandeld werden, reeds in een kritieke toestand waren bij aankomst in de kliniek. De clinici gaven waarschijnlijk gepolymeriseerd boviene hemoglobine in afwachting van de resultaten van de cross matching test voor bloedtransfusie of van gewassen maternale rode bloedcellen. Hun PCV verbeterde niet op significante wijze tussen de bloedproductbehandelingen door (3).

#### **2.7.4 Antibiotica**

Als de algemene toestand van het veulen slechter wordt, moet men beducht zijn voor het optreden van septicemie. Het is verstandig om profylactisch breed spectrum antibiotica toe te dienen bij ernstige gevallen van neonatale isoerythrolyse of indien complicaties zoals polysynovitis zich voordoen (1-2,23). In een studie van MayLeay et al. (2001) kreeg het veulen profylactisch penicilline G (Duphaphen®, 1 mL/30 kg LG, I.M., q24 h, Zoetis Belgium s.a., Louvain-La-Neuve, België) en trimethoprim-sulfamethoxazole (Borgal® 24%, 3 mL/50 kg LG, traag I.V., Virbac, Carros, Frankrijk) (2). Broux et al. (2015) daarentegen gebruikten cefquinome (Cobactan® 4%, 2 mg/kg, I.V./I.M., q12 h, MSD Animal Health BVBA, Brussel, België) (23).

## **2.8 Prognose**

De algemene prognose is gereserveerd tot goed (22-23). De prognose is slechter indien een ernstige metabole acidose en/of convulsies aanwezig zijn of indien de ziekte een peracut verloop kent. Veulens met peracute neonatale isoerythrolyse sterven meestal vooraleer een behandeling kan worden ingesteld.

## **2.9 Preventie**

Preventie is ongetwijfeld te verkiezen boven het curatief ingrijpen. Preventieve strategieën kunnen onderverdeeld worden in maatregelen die getroffen worden voor en na het fokken. Vooraleer men fokt met een bepaalde merrie kunnen de bloedgroepen van de merrie en de hengst getest worden. Bij merries die reeds een aangetast veulen hebben geproduceerd, moet men er op beducht zijn dat hun toekomstige veulens een hoger risico lopen op neonatale isoerythrolyse. De hengst die gebruikt wordt om de merrie te dekken moet negatief zijn voor de factoren van de bloedgroepen die de merrie niet heeft en waartegen ze eventueel reeds antistoffen heeft aangemaakt. Zo is het aangeraden om een Aa- merrie met een Aa- hengst te fokken. Een cross matching test waarbij de rode bloedcellen van de hengst worden samengevoegd met het serum van de merrie kan eveneens zo dicht mogelijk tegen de verwachte datum van de partus uitgevoerd worden. Het serum van de merrie kan gedurende de laatste maand prepartum getest worden op de aanwezigheid van problematische antistoffen waardoor men onmiddellijk postpartum kan ingrijpen. Indien de merrie wordt gefokt met een hengst wiens bloedgroepetype niet bekend is, kan het veulen preventief weerhouden worden om te drinken bij de moeder en moet men een alternatieve antistoffen- en melkbron voorzien (5). De uier wordt afgeplakt en het veulen draagt bij voorkeur een mondkapje. Er kan onmiddellijk ingegrepen worden indien men aanwezig is bij de geboorte of als men gebruik maakt van alarmsystemen die waarschuwen als de partus begint. Het kunstmatig induceren van de partus geeft meer controle over het proces maar dit houdt een aantal risico's in (8,29). Prematuriteit kan optreden als de partus te vroeg wordt geïnduceerd (<320 dagen) of indien het veulen onvoldoende prepartum maturatie kent. Prematuriteit houdt bijvoorbeeld onvoldoende longrijping, een zwakke zuigreflex en hypothermie in. Een overdosis oxytocine leidt tot een overgestimuleerde baarmoeder waardoor het risico op dystocie of een premature placentaloslatie groot is (29).

## REFERENTIELIJST

1. Reed S.M., Warwick M.B., Sellon D.C. (2010). 'Disorders of Specific Body Systems' & 'Disorders of Foals'. In: *Equine Internal Medicine*, 3rd edition, Saunders, St. Louis, p. 760, 1334-1337.
2. MacLeay J. (2001). Neonatal isoerythrolysis involving the Qc and Db antigens in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219, 79-81.
3. Polkes A.C., Giguère S., Lester G.D., Bain F.T. (2008). Factors Associated with Outcome in Foals with Neonatal Isoerythrolysis (72 cases, 1988-2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1216-1222.
4. De Graaf Roelfsema E., Boersma S., Van Haeringen H., Van Der Kolk J.H. (2007). Non-specific haemolytic alloantibody causing equine neonatal isoerythrolysis. *The Veterinary Record* 161, 202-204.
5. MacLeay J.M. (2001). Neonatal isoerythrolysis. *Journal of Equine Veterinary Science* 21, 106-109.
6. Boyle A.G., Magdesian K.G., Ruby R.E. (2005). Neonatal isoerythrolysis in horse foals and a mule foal: 18 cases (1988-2003). *Journal of American Veterinary Medical Association* 227, 1276-1283.
7. Bailey E., Albright D., Henney P. (1988). Equine neonatal isoerythrolysis: evidence for prevention by maternal antibodies to the Ca blood group antigen. *American Journal of Veterinary Research* 49, 1218-1222.
8. Blackmer J., Paccamonti D., Eilts B., Costa L., Koch C. (2002). Strategies for preventing neonatal isoerythrolysis. *Equine Compendium* 24, 562-569.
9. Sprayberry K.A. (2003). Neonatal transfusion medicine: the use of blood, plasma, oxygen-carrying solutions, and adjunctive therapies in foals. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2, 31-41.
10. Paradis M.R. (2006). *Equine Neonatal Medicine: A Case-Based approach*, 1st edition, Saunders, Philadelphia, p6-47.
11. Drogoul C., Clément F., Ventorp M., Curadi M., Orlandi M. (2008). Equine passive immune transfer through colostrum. In: *Proceedings of the 4th European Equine nutrition & Health Congress*, p. 23-27.
12. Bowling T., Ruvinsky A. (2007). *The genetics of the horse*, 1st edition, CABI publishing, New York, p. 86-89.
13. Vandeplassche M., Podliachouk L., Beaud R. (1970). Some Aspects of Twin-gestation in the Mare. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 34, 218-226
14. Padula A.M. (2005). The freemartin syndrome: an update. *Animal Reproduction Science* 87, 93-109.
15. Juras R., Raudsepp T., Das P.J., Conant E., Corthran E.G. (2010). XX/XY Blood Lymphocyte Chimerism in Heterosexual Dizygotic Twins from an American Bashkir Curly Horse. Case Report. *Journal of Equine Veterinary Science* 30, 575-580.

16. McClure J. (2010). Strategies for prevention of neonatal isoerythrolysis in horses and mules. *Equine Veterinary Education* 9, 118-122.
17. Bailey E. (1987). Prevalence of anti-red blood cell antibodies in the serum and colostrum of mares and its relationship to neonatal isoerythrolysis. *American Journal of Veterinary Research* 43, 1917-1921.
18. Egbor M., Knott P., Bhide A. (2012). Red-cell and platelet alloimmunisation in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 26, 119-132.
19. Maisels JM., McDonagh A.F. (2008). Phototherapy for Neonatal Jaundice. *The New England Journal of Medicine* 358, 920-928.
20. Stopyra A., Snarska A. (2014). Selected arterial blood gasometry parameters as indicators of blood transfusion effectiveness in foals with haemolytic disease. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 467-471.
21. Axon J., Palmer J. (2008). Clinical Pathology of the Foal. *Veterinary Clinics Equine Practice* 24, 357-385.
22. Vaala W. (2003). How to Evaluate the Icteric Foal: Differential Diagnosis and Management Strategies. In: 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. Internetreferentie: [www.ivis.org](http://www.ivis.org), documentnummer P0623.1103.
23. Broux B., Lefère L., Deprez P., Van Loon G. (2015). Plasma Exchange as a Treatment for Hyperbilirubinemia in 2 foals with Neonatal Isoerythrolysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 29, 736-738.
24. Mullaney T.P., Brown C.M. (1988). Iron toxicity in neonatal foals. *Equine Veterinary Journal* 20, 119-124.
25. Uhner A.G., Kaya G., Oltu A. (2012). Prevention of predicted neonatal isoerythrolysis with jaundice foal agglutination test in a newborn foal. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 36, 734-736.
26. Cash R. (1999). Colostral quality determined by refractometry. *Equine Veterinary Education* 11, 36-38.
27. Duran M.C., Ramirez H., Parraguez V.H. (2017). Effect of phototherapy on the plasma bilirubin concentration of newborn foals. *Veterinary Record* 164, 503-504.
28. Smith J.E., Dever M., Smith J., DeBowes R.M. (1992). Post-Transfusion Survival of 50Cr-Labeled Erythrocytes in Neonatal Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6, 183-185.
29. Silver M. (1992). Parturition: spontaneous or induced preterm labour and its consequences for the neonate. *Animal Reproduction Science* 28, 441-449.



## BIJLAGEN

### BIJLAGE I: BLOEDGROEPTYPING VAN DE MERRIE EN HAAR VEULEN

De typering van de bloedgroepen van de merrie en het veulen werd uitgevoerd door het klinisch diagnostisch laboratorium van de University of California te Davis. Het bovenste kader vermeldt het resultaat van de merrie en het onderste kader dat van het veulen ('filly').

**BLOOD TYPE**

Horse ID	A	C	K	P	Q	U
[REDACTED]	-	a	a	-	-	-

Blood type factors are positive or negative as indicated.  
Blood Type: Ca Ka

**BLOOD TYPE**

Horse ID	A	C	K	P	Q	U
Foal of [REDACTED] (filly)	-	a	-	-	-	-

Blood type factors are positive or negative as indicated.  
Blood Type: Ca

### BIJLAGE II: REFERENTIEWAARDEN VAN HET NEONATALE VEULEN

In de onderstaande tabellen zijn de referentiewaarden van diverse moleculen en fysiologische parameters van het neonatale veulen te vinden. Referentiewaarden kunnen variëren naargelang ras, laboratorium en dergelijke. Referentiewaarden uit: a) Paradis et al. (2006), b) Boyle et al. (2005) en c) Reed et al. (2010).

Parameter	Waarde
RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)	6,9-11,8 <sup>a</sup>
PCV	24-44 <sup>a</sup>
Hb (g/dL)	10,2-15,4 <sup>a</sup>
McV (fl)	31,7-40,0 <sup>a</sup>
MCHC (g/dL)	31,7-39,4 <sup>a</sup>
MCH (pg)	11,2-16,4 <sup>a</sup>
WBC (x 10 <sup>9</sup> /L)	6,0-15,0 <sup>a</sup>
Bands (%)	0 <sup>a</sup>
Segmentkernigen (%)	60-85 <sup>a</sup>
Segmentkernigen (x 10 <sup>9</sup> /L)	4,1-9,5 <sup>a</sup>
Lymfocyten (%)	14-37 <sup>a</sup>
Lymfocyten (x 10 <sup>9</sup> /L)	1,0-3,1 <sup>a</sup>
Monocyten (%)	0,5-5,0 <sup>a</sup>
Monocyten (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,1-0,5 <sup>a</sup>
Eosinofielen (%)	1-2 <sup>a</sup>
Eosinofielen (x 10 <sup>9</sup> /L)	0,1-0,2 <sup>a</sup>
Thrombocyten (x 10 <sup>9</sup> /L)	140-315 <sup>a</sup>
Totaal eiwit (mg/dL)	4,0-6,6 <sup>a</sup>

Albumine (mg/dL)	2,5-3,5 <sup>a</sup>
Globuline	1,5-3,6 <sup>a</sup>
Plasma fibrinogeen (mg/dL)	50-390 <sup>a</sup>
IgG (mg/dL)	> 800 <sup>a</sup>
Ureum (mg/dL)	18-22 <sup>a</sup>
Creatinine (mg/dL)	1,5-2,9 <sup>a</sup>
AST (IU/L)	111-206 <sup>a</sup>
CK (IU/L)	165-300 <sup>a</sup>
LD (IU/L)	615-800 <sup>a</sup>
GGT (IU/L)	10-32 <sup>a</sup>
SDH (IU/L)	0,2-4,8 <sup>a</sup>
Natrium (mEq/L)	130-140 <sup>a</sup>
Chloor (mEq/L)	95-105 <sup>a</sup>
Calcium (mEq/L)	10,0-13,8 <sup>a</sup>
Fosfor (mEq/L)	4,20-5,85 <sup>a</sup>
Kalium (mEq/L)	3,8-4,5 <sup>a</sup>
Magnesium (mEq/L)	2,0-2,5 <sup>a</sup>
Glucose (mg/dL)	96-175 <sup>a</sup>
Totaal bilirubine (µmol/L)	0-80 <sup>b</sup>
PaCO <sub>2</sub> (mmHg) op verschillende leeftijden	2 min: 54,1±2,0 <sup>c</sup> 24 h: 45,5±1,5 <sup>c</sup> 4 dagen: 45,8±1,1 <sup>c</sup>
PaO <sub>2</sub> (mmHg) op verschillende leeftijden	2 min: 56,4±2,3 <sup>c</sup> 24 h: 67,6±4,4 <sup>c</sup> 4 dagen: 81,2±3,1 <sup>c</sup>

Leeftijd	Hartfrequentie (aantal slagen/minuut)	Ademhalingsfrequentie (aantal ademteugen/minuut)	Temperatuur (°C)
Geboorte	60-80	Happen naar adem	37-39
0-2 h	120-150	40-60	37-39
24 h	80-100	30-35	37-39

### BIJLAGE III: POSTNATALE VERANDERINGEN IN HEMATOLOGISCHE PARAMETERS

De postnatale veranderingen in diverse hematologische parameters van het veulen (Naar Axon et al., 2008).

Parameter	Waarde			
	<1 h	< 12 h	24 h	7 dagen
RBC (x 10 <sup>12</sup> /L)	9,3-12,9	9,0-12,0	8,2-11,0	7,4-10,6
PCV (%)	40-52	37-49	32-46	28-43
Hb (g/L)	134-199	126-174	120-166	107-158
MCV (fL)	37-45	36-45	36-46	35-44
MCHC	330-390	320-400	320-400	350-400

#### BIJLAGE IV: DE VOOR-EN NADELEN VAN DE DIAGNOSTISCHE METHODES

De voor-en nadelen van de diverse methoden die aangewend kunnen worden om (het risico op) neonatale isoerythrolyse te diagnosticeren.

Prepartum methode	Matrix	Positief resultaat
Bloedgroeypering	Plasma hengst en merrie	Bloedgroep
Screeningstest	Serum merrie, colostrum + panel rode bloedcellen	Hemolyse of agglutinatie
Minor cross matching test	Serum merrie + RBC hengst	Hemolyse
Postpartum methode	Matrix	Positief resultaat
JFA test	Serum en/of colostrum merrie + RBC veulen	Agglutinatie ( $\geq 1:16$ dilutie)
Minor cross matching test	Serum merrie + RBC veulen	Agglutinatie
Hemolytische cross matching test	Serum merrie + RBC veulen + complement	Hemolyse ( $\geq 1:16$ dilutie)
Directe Coombs test	RBC veulen, serum merrie	Agglutinatie

#### BIJLAGE V: PROTOCOL VAN DE MINOR CROSS MATCHING TEST

Het protocol en mogelijke resultaten van de minor cross matching hemolytische test.

Benodigheden:
<ul style="list-style-type: none"><li>• Serum van de moeder</li><li>• Plasma (op EDTA) en serum van het veulen of de hengst (zo dicht mogelijk tegen de partus genomen)</li><li>• Complement</li><li>• Centrifuge, incubator, microscoop, pipet</li><li>• Fysiologische oplossing (0.9 % NaCl oplossing)</li></ul>
Techniek
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Men centrifugeert het plasma van het veulen/de hengst voor 1 minuut aan 1000 g om een pellet rode bloedcellen te bekomen. Het supernatans wordt verwijderd en de pellet wordt minstens 4 maal gewassen met fysiologische oplossing.</li><li>2. Een 3-5 % oplossing wordt gemaakt door de rode bloedcellen van het veulen/de hengst samen te voegen met fysiologische oplossing.</li><li>3. Men brengt 2 druppels rode bloedcellen van het veulen/de hengst samen met 2 druppels complement en 2 druppels van het serum van de merrie. Een controlestaal kan gemaakt worden door 2 druppels rode bloedcellen en 2 druppels serum van de het veulen samen te voegen.</li><li>4. De stalen worden in een incubator geplaatst aan 37°C voor 90 minuten.</li><li>5. Vervolgens worden de stalen gecentrifugeerd voor 1 minuut aan 1000 g.</li><li>6. De stalen worden macroscopisch en microscopisch bekeken. Macroscopisch vergelijkt men de kleur van het supernatans tussen het controlestaal en het staal.</li></ol>
Resultaat
<ul style="list-style-type: none"><li>• Negatief: supernatans is helder. Er is geen hemolyse.</li><li>• Positief: supernatans is rood. Er is sprake van hemolyse.</li></ul>

## BIJLAGE VI: HET PROTOCOL VAN DE JAUNDICED FOAL AGGLUTINATION TEST

Het protocol, mogelijke resultaten en implicaties van de Jaundiced Foal Agglutination test.

### Benodigheden

- Plasma van het veulen (op EDTA) voor de opname van colostrum
- Colostrum en/of plasma (op EDTA) van de merrie
- Fysiologische oplossing (0,9% NaCl oplossing)
- Reageerbuisjes
- Centrifuge, pipet
- Bloed van de vader (op EDTA) indien het veulen reeds gedronken heeft

### Protocol

1. Label de reageerbuisjes naargelang de gebruikte verdunningsreeks.
2. Voeg aan elk reageerbuisje 1 mL 0,9% NaCl toe.
3. De verdunningsreeks wordt gemaakt door 1 mL colostrum of maternaal serum aan de '1:2' tube toe te voegen. Vervolgens wordt 1 mL van de eerste tube overgebracht naar de tweede tube (verdunding 1:4). Dergelijke strategie wordt gehanteerd tot bijvoorbeeld verdunding 1:128. Een controlestaal wordt gemaakt door aan een tube met 1 mL 0,9% NaCl een druppel veulenbloed toe te voegen. Eventueel kan men het bloed van de merrie ook gebruiken als negatieve controle bij het testen van colostrum om zeker te zijn dat de agglutinatie niet het resultaat is van de viscositeit van het colostrumstaal.
4. Aan elke reageerbuis wordt een druppel bloed van het veulen toegevoegd en gemengd.
5. De tubes worden 2-3 minuten gecentrifugeerd aan 300-500 g.
6. De pellets op de bodem van de tubes worden bekeken en geëvalueerd.

### Resultaat

- +1 tot +2: Een zwakke agglutinatiereactie waarbij kleine klontertjes te zien zijn.
- +3 tot +4: Een sterke agglutinatiereactie met vorming van grote klonters.
- Negatief (-) : Afwezigheid van antistoffen gericht tegen de bloedgroepantigenen van het veulen.
- Agglutinatie in controlestaal: Dit wijst op de aanwezigheid van antistoffen op de membraan van de rode bloedcellen van het veulen.

### Praktische implicaties

- Geen agglutinatie <1:16: Veulen mag drinken bij de moeder.
- Geen agglutinatie <1:64: Muildiveulen mag drinken bij de moeder.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2016 – 2017

**INVLOED VAN DE BEWAARCONDITIES OP EPIDIDYMALE SPERMATOZOA**

Door

Anne-Sofie VERMEERSCH

Promotoren: M. Sc. Ververs

Dr. Govaere

Klinische casusbespreking in het kader

van de Masterproef



*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.*

*Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.*

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2016 – 2017

**INVLOED VAN DE BEWAARCONDITIES OP EPIDIDYMALE SPERMATOZOA**

Door

Anne-Sofie VERMEERSCH

Promotoren: M. Sc. Ververs

Dr. Govaere

Klinische casusbespreking in het kader

van de Masterproef



## **VOORWOORD**

Deze casuïstiek combineert mijn passie voor de voortplanting en verloskunde met mijn interesse in onderzoek. Naast het vele lees-en schrijfwerk, heb ik enkele praktische vaardigheden geleerd. Mijn dank gaat uit naar mijn promotor Cyriel Ververs en copromotor Jan Govaere. Mijn ouders en vrienden zijn eveneens bedankt voor het nalezen van mijn masterproef.

## INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING .....	1
INLEIDING .....	2
MATERIAAL EN METHODEN.....	3
1 Patiënten.....	3
2 Castratie .....	3
2.1 Open castratie met lokale anesthesie .....	3
3 Collectie van epididymale spermatozoa.....	4
4 Koelen, invriezen en ontdooien .....	4
5 Analyse van de stalen .....	5
5.1 Motiliteit en concentratie.....	5
5.2 Morfologie en viabiliteit .....	5
RESULTATEN.....	6
1 Morfologie.....	6
2 Motiliteit.....	7
3 Het effect van procaine .....	7
CONCLUSIE.....	8
BESPREKING .....	9
1 Anatomie.....	9
2 Het gebruik van epididymale spermatozoa .....	10
3 De kenmerken van epididymale spermatozoa .....	10
3.1 De invloed van seminaal plasma.....	11
3.2 De invloed van koliek en euthanasie .....	12
3.3 De invloed van anesthetica .....	13
4 Het collecteren en verwerken van epididymale spermatozoa .....	13
4.1 Collectietechnieken .....	13
4.1.1 Orchiëctomie.....	13
4.1.2 Elektro-ejaculatie .....	14
4.1.3 Epididymale sperma aspiratie .....	14
4.2 Verdere verwerking na orchiëctomie .....	14
4.2.1 Retrograde flushing methode .....	15
4.2.2 Flotatie methode .....	16
5 De beoordeling van de kwaliteit .....	16
5.1 De motiliteit .....	16
5.2 De morfologie en viabiliteit .....	17
5.2.1 Het maken van een morfologisch preparaat .....	17
5.2.2 De beoordeling van het preparaat.....	17
5.3 De concentratie .....	19

6 De gekoelde bewaring.....	19
6.1 Het laden van de rietjes.....	21
7 Het invriezen van spermatozoa.....	22
7.1 Spermaverdunners met cryoprotectantia.....	23
7.2 Cryoprotectantia.....	24
7.3 De invloed op kwaliteitsparameters.....	25
8 Het ontdooiproces.....	26
9 De inseminatie en drachtresultaten.....	27
BRONNEN.....	28
BIJLAGEN.....	31
BIJLAGE I.....	31
BIJLAGE II.....	41
BIJLAGE III.....	42
BIJLAGE IV.....	43

## **SAMENVATTING**

Het doel van deze casuïstiek was om de invloed van de bewaarduur op epididymale spermatozoa te bekijken. Het effect van het toedienen van procaïne als lokaal anestheticum werd eveneens onderzocht. Onmiddellijk na castratie of na een bepaald bewaartermijn in de koelkast op 5°C (24 h of 48 h) werden de ductus deferens en epididymis via een katheter geflushed met spermaverdunner om spermatozoa te bekomen. De morfologie, motiliteit en vitaliteit van deze spermatozoa werden onmiddellijk, na 24 of 48 h of na het ontdooien onderzocht. De meeste spermatozoa waren statisch en het percentage (progressieve en niet-progressieve) motiliteit was uitermate laag. Gemiddeld waren >90% van de spermatozoa levend. De meest voorkomende morfologische afwijkingen waren abnormale staarten (range 14,7-44,5%, gemiddeld 22,5%) en proximale protoplasma druppels (range 5,7-22,0%, gemiddeld 10,3%).

De steekproefgrootte was niet representatief en er waren geen groepen testikels die 72 h en 96 h bewaard werden. Daarenboven was er sprake van een grote variabiliteit in de resultaten. Dit maakt dat er geen significante uitspraken ter conclusie gemaakt kunnen worden.

**Sleutelwoorden: bewaartermijn, castratie, epididymis, inseminatie, spermatozoa**

## **INLEIDING**

Het collecteren van epididymale spermatozoa wordt nog niet routinematig ingezet in de voortplanting bij paarden. Het biedt nochtans uitstekende kansen in bepaalde situaties zoals na acute sterfte van de hengst, indien euthanasie overwogen wordt of als de hengst onvermijdelijk gecastreerd moet worden. In dergelijke gevallen wordt het waardevolle genetisch materiaal van een bepaalde hengst bewaard. Artificiële voortplantingstechnieken zoals kunstmatige inseminatie (KI) en ovum pick-up (OPU) in combinatie met intracytoplasmatische sperma-injectie (ICSI) vinden hier ongetwijfeld hun toepassing. Het zou dan ook interessant zijn om het effect van variabele parameters zoals anesthetisch protocol, bewaarduur, invriezen, additie van seminaal plasma en dergelijke te onderzoeken om een geoptimaliseerd protocol op te stellen voor het collecteren, verwerken en gebruiken van spermatozoa afkomstig van de epididymis.

In dit onderzoek werd het effect van een verschillende bewaarduur (24 h en 48 h) en lokale anesthesie op de motiliteit, vitaliteit en morfologie van epididymale spermatozoa verzameld via de retrograde flushing methode bekeken. In deze studie werden 7 van de 9 hengsten gecastreerd met lokale intratesticulaire verdoving.

## MATERIAAL EN METHODEN

### 1 Patiënten

De hengsten die in deze studie besproken worden, waren allemaal patiënten van de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent te Merelbeke. In totaal werden 5 warmbloeden, een trekpaard en 3 pony's gecastreerd waarna de epididymale spermatozoa geanalyseerd werden. De leeftijdsrange liep van 21 maanden tot 12 jaar en 11 maanden. De gemiddelde leeftijd was 5 jaar en 6 maanden. In de recoverybox van de afdeling 'Heelkunde en Anesthesie van de Grote Huisdieren' werden 7 hengsten via de open methode gecastreerd. Op de operatietafel onderging 1 hengst een open en een andere hengst een gesloten castratie. De specifieke karakteristieken van de epididymale spermatozoa van elke hengst zijn in bijlage I terug te vinden.

### 2 Castratie

Verschillende castratietechnieken werden gebruikt in dit onderzoek. Vermits de meeste hengsten in dit onderzoek met de open methode gecastreerd werden, wordt deze techniek nader besproken. De nazorg en post-operatieve complicaties worden in dit werk niet besproken.

#### 2.1 Open castratie met lokale anesthesie

Bij deze methode wordt de castratie in zijlig uitgevoerd in de recoverybox van de operatiezaal. Het verschil met andere castratiemethodes is dat hier lokale anesthesie intratesticulaire werd ingespoten. In bijlage II is het castratieprotocol en de toegediende medicatie te vinden. Deze ingreep gebeurt via de 'open methode' wat betekent dat de castratiewonde niet gehecht wordt. Het voordeel hieraan is dat open drainage mogelijk is mits de incisie in de huid en subcutis voldoende groot is. De castratie zelf verloopt halfbedekt: men snijdt de tunica vaginalis craniaal in en oefent druk uit op de inhoud waardoor de testis en epididymis onthuld worden. Het kneuzen vindt plaats op de bedekte zaadstreng. Het openen van de tunica biedt de mogelijkheid om te controleren op de inhoud: zo kan men een indirecte scrotale hernia ontdekken.



*Figuur 1: De hengst ligt in zijlig in de recoverybox. De onderliggende benen worden samengebonden met boeien. Het bovenliggende been wordt met een stevig touw tussen de voorbenen en onder de hals door vastgebonden.*

Open castratie kan men eveneens op de operatietafel onder gasanesthesie uitvoeren. Hierbij wordt de triple drip vervangen door isofluraan (IsoFlo 100%®, Zoetis Belgium SA, Louvain-la-Neuve, België, inductie 3-5%, instandhouding 1,5-2,5%).

Bij een gesloten castratie wordt de incisie axiaal van de uitwendige liesring gemaakt en wordt de tunica vaginalis niet ingesneden (bedekte castratie). De huid en onderhuid worden apart gesloten met Vicryl® 2/0 (Ethicon®, Norderstedt, Duitsland).

### 3 Collectie van epididymale spermatozoa

Na de castratie werden de testikels afgespoeld met 0,9% NaCl fysiologische oplossing, afgedroogd met papier en naar het laboratorium van de dienst 'Verloskunde van de Grote Huisdieren' gebracht. De fascia die de testis, epididymis en vas deferens omgaf, werd verwijderd met een bistourimes n°24 (Swann-Morton®, Sheffield, Verenigd Koninkrijk). Vervolgens werd een 18G katheter (Venocan™ Plus IV Catheter, Kruuse A/S, Langeskov, Denemarken) in het proximale uiteinde van de ductus deferens gebracht en gefixeerd met een Kocher klem. Een 20 mL spuit gevuld met verwarmde (37°C) Gent Extender spermaverdunner met glycerol (Verloskunde van de Grote Huisdieren, UGent, Gent, België) werd gekoppeld aan de katheter. Vóór de ingebruikname van de verdunner, werd deze gefilterd door middel van een gaasje. Een incisie van 2 cm werd ter hoogte van de cauda epididymidis gemaakt. De volgende stap was om de ductus deferens en de epididymis retrograad te flushen in een petriplaatje: een zekere tegendruk werd ondervonden door de sterk gekronkelde structuur van de epididymis.

### 4 Koelen, invriezen en ontdooien

Na castratie werd 1 testikel onmiddellijk gedissecteed en geanalyseerd. De andere testikel werd voor een bepaalde tijd (24 h of 48 h) bewaard in een rectale handschoen in de koelkast op 5°C. Bepaalde stalen werden herbekeken na 24-48 h gekoelde bewaring op een roller bank (Rock 'N Roller, Snijders Labs, Tilburg, Nederland) in de koelkast. Er werden in totaal 7 epididymale stalen ingevroren volgens het protocol beschreven in bijlage III. De stalen werden ontdooid door 30 s in een warmwaterbad op 37°C (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Duitsland) te verblijven. Na het ontdooien werd een rietje open geknipt, werd de inhoud gedeponereerd in een epje en werd het staal geanalyseerd.

*Tabel 1: Aantal testikels gebruikt per groep. Per paar testikels werd 1 testikel op 0 h geanalyseerd. Hierbij werden de epididymale spermatozoa zo snel mogelijk na de castratie gecollecteerd. Ze ondergingen dus niet eerst een koel-of invriesprocedure.*

Bewaartermijn	Aantal testikels
Collectie op 0 h	9
Collectie op 0 h en 24 h later opnieuw bekeken met de CASA	5
Collectie op 0 h en 48 h later opnieuw bekeken met de CASA	1
Collectie op 0 h en ingevroren	3
Collectie op 0 h en ingevroren na 24 h koeling op 5°C	2
Collectie op 24 h	3
Collectie op 48 h	6
Collectie op 48 h en ingevroren	2

## **5 Analyse van de stalen**

### **5.1 Motiliteit en concentratie**

Na collectie werd 100  $\mu\text{L}$  van het bekomen staal gemengd met 1000  $\mu\text{L}$  verwarmde 'Gent extender' spermaverdunner (met glycerol) waardoor een 1:10 verdunning werd bekomen. De meeste ingevroren stalen ( $n=5$ ) werden na het ontdooien verdund met Gent Extender zonder glycerol (Verloskunde van de Grote Huisdieren, UGent, Gent, België). Een aantal ingevroren stalen ( $n=2$ ) werden verdund met INRA 96 (IMV Technologies©, Leeuwarden, Nederland). Vervolgens werd 10  $\mu\text{L}$  van dit verdund staal gepipetteerd op een verwarmd draagglasje. Dit werd bekeken op een 38°C verwarmde kruistafel (ISAS CF03 Heater Controller Unit, Projectes i Serveis R+D S.L., Paterna, Spanje) op 100x vergroting onder de lichtmicroscop (ISAS microscoop model UB 200i Series, Projectes i Serveis R+D S.L., Paterna, Spanje) met behulp van de 'Computer Assisted Sperm Analysis' (CASA, Projectes i Serveis R+D S.L., Paterna, Spanje). In bijlage I zijn de analyses van de gecasteerde hengsten terug te vinden.

### **5.2 Morfologie en viabiliteit**

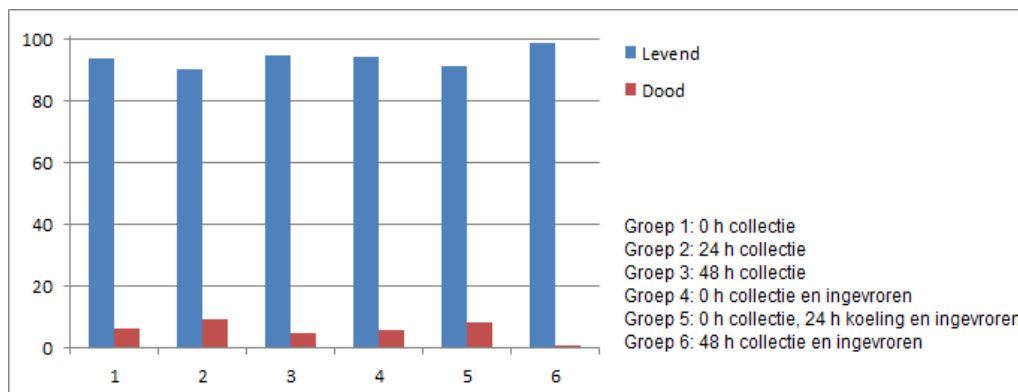
De morfologie en viabiliteit werden beoordeeld aan de hand van een 1% eosine – 5% nigrosine kleuring, ook wel de supravitaalkleuring genoemd, op een 1000x vergroting onder een lichtmicroscop (Olympus U-TVO-63XC, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Een druppel epididymaal staal werd gemengd met een druppel kleurstof van gelijkaardige hoeveelheid. Een uitstrijkje werd gemaakt door een draagglasje over het mengsel te laten glijden en vervolgens op een ander proper voorverwarmd draagglasje uit te smeren in een hoek van  $\pm 30^\circ$ . Een druppel immersieolie dient aangebracht te worden op het gedroogde preparaat om deze te bekijken onder de 1000x vergroting. Onder de microscoop werden eerst het aantal levende en dode spermatozoa geteld tot een totaal aantal van 100 zaadcellen. Eosine kleurt de dode en beschadigde zaadcellen rozerood aan gezien de membraanintegriteit verminderd is. Nigrosine kleurt de achtergrond paars. Levende zaadcellen zien er wit uit aangezien ze noch eosine, noch nigrosine hebben opgenomen dankzij een intacte plasmamembraan. Daarna werd het aantal morfologische defecten op 100 levende spermatozoa geteld: er werd gekeken naar abnormale koppen en staarten, proximale en distale protoplasmadruppels en ook naar het aantal normale zaadcellen. De resultaten zijn in bijlage I vermeld.



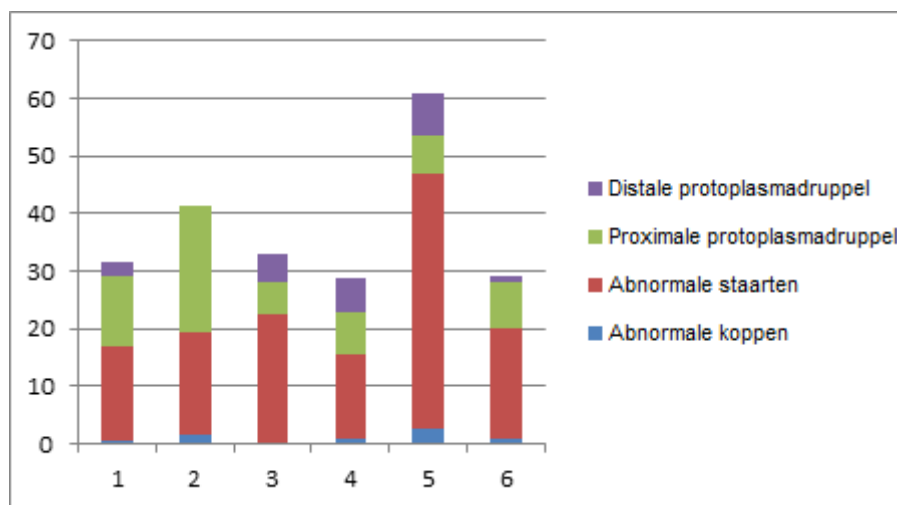
# RESULTATEN

## 1 Morfologie

In dit onderzoek waren gemiddeld 94,0 % spermatozoa levend op de gekleurde preparaten (fig 2). Wat morfologische defecten betreft, werden in veruit de meeste groepen hoofdzakelijk abnormale staarten en als tweede meest voorkomende defect proximale protoplasma druppels gezien (fig 3). In de groep waarbij spermatozoa op 0 h gecollecteerd werden, bewaard werden voor 24 h op 5°C, ingevroren en ontdooid werden, kwamen de distale protoplasma druppels op de tweede plaats (7,5%). Een teruggeslagen staart was het meest voorkomende staartdefect op alle preparaten. Een opgewonden staart werd 2 maal gezien op het preparaat van hengst 6 (gecollecteerd na 48 h koeling). Defecten ter hoogte van de kopregio werden zelden waargenomen (gemiddeld 0,7%): microcephalie (tapered of pyriform) en macrocephalie kwamen het vaakst voor. Dit werd onder andere waargenomen bij hengst 7 (1 tapered hoofd en 1 macrocephalus). Het morfologisch preparaat op 0 h van hengst 5 kon niet gebruikt worden voor morfologische analyse wegens te weinig spermatozoa op het preparaat. De gegevens per hengst zijn terug te vinden in de bijlagen (bijlage I).



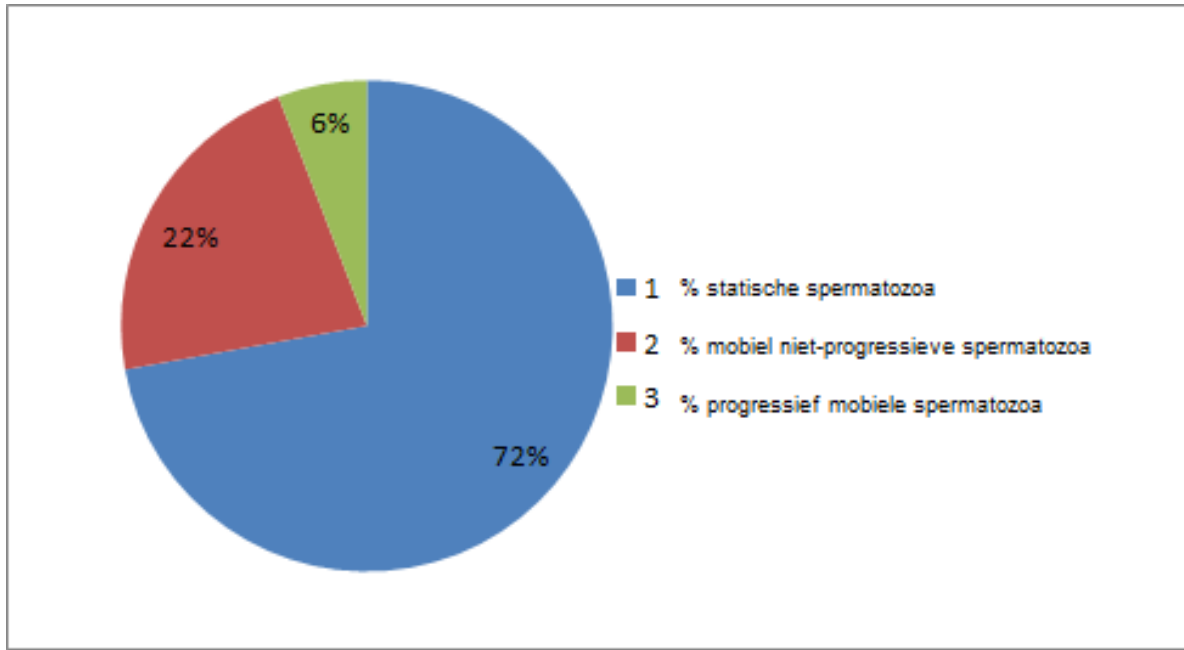
Figuur 2: Het gemiddeld aantal levende en dode spermatozoa van elke groep.



Figuur 3: Het gemiddeld aantal morfologische defecten per groep (groepen zoals op figuur 2 vermeld).

## 2 Motiliteit

Het aantal statische spermacellen lag over het algemeen hoog (bijlage I). Vaak werden vreemde partikels door de CASA meegeteld als zijnde statische spermatozoa. Dit geeft een vertekend beeld van de totale concentratie en het percentage statistische spermacellen. Er werd een vrij laag percentage totale motiliteit (TM) en progressieve motiliteit (PM) gezien (bijlage I).



*Figuur 4: Het gemiddeld percentage statische, mobiel niet-progressieve en progressief mobiele spermatozoa in groep 1.*

## 3 Het effect van procaïne

Er kan geen vergelijking getroffen worden tussen de groepen met en zonder procaïne vermits er slechts 2 hengsten geen lokale anesthesie hebben gekregen. De steekproefgrootte is dermate klein dat er geen uitspraak gemaakt kan worden.

## CONCLUSIE

De meerderheid van de hengsten met normaal ingedaalde testes wordt ten velde gecastreerd door een dierenarts. Dit maakt dat het aantal electieve castraties op de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent te Merelbeke vrij laag is en veelal specifiek gericht op gecompliceerde gevallen zoals cryptorche hengsten. Cryptorchidie leidt tot slechts 1 bruikbare testikel, wat niet interessant was in het kader van dit onderzoek. Het was de bedoeling om de inhoud van de eerste testikel onmiddellijk te analyseren en de andere testikel onder te brengen in een bepaalde bewaartermijngroep. Het is niet wenselijk om met cryptorchen te fokken gezien het erfelijke karakter van de aandoening. Bij de meeste jonge hengsten (<2 jaar oud) die aangeboden werden ter castratie, werden geen spermatozoa bekomen met de retrograde flushing methode.

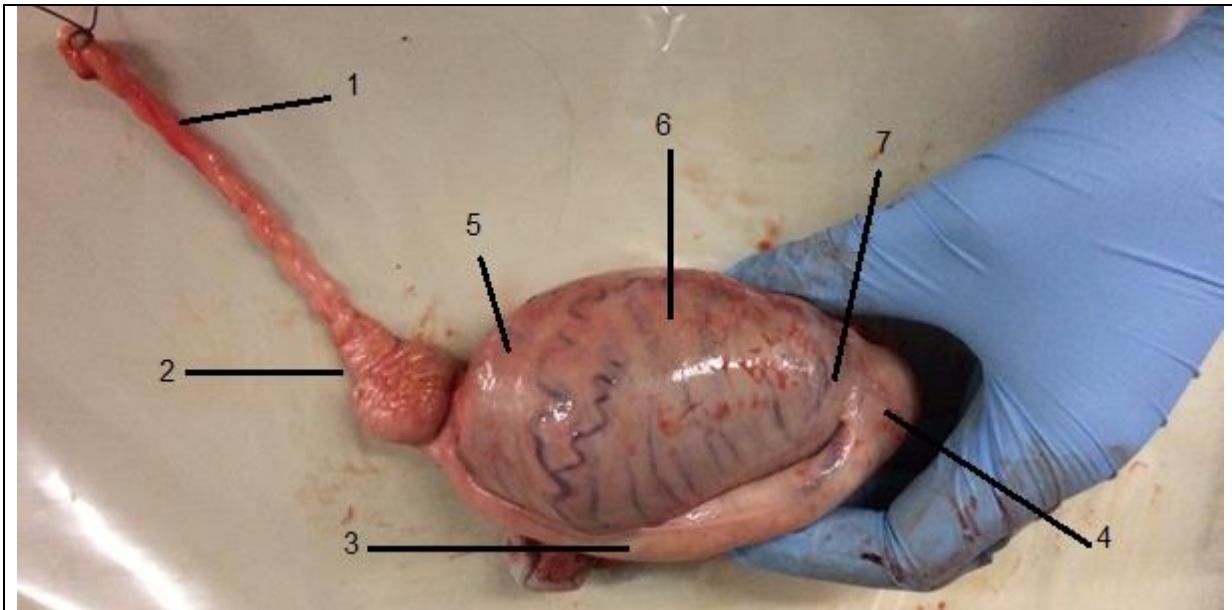
De steekproefgrootte was klein (n=9) en bovendien waren de groepen onevenredig verdeeld. De groepen waren zo verdeeld aangezien het niet altijd haalbaar was om de tweede testikel van een paar in een bepaalde bewaartermijngroep (24 h of 48 h) te plaatsen. Op voorhand werd een groep testikels voorzien die 72 h en 96 h gekoeld zou worden maar dit werd niet bereikt door een te laag aantal mature testikelparen. Bij slechts 2 hengsten werd geen lokale anesthesie gebruikt waardoor geen significante uitspraak gemaakt kan worden over het effect van procaïne op de spermatozoa. Bovendien is er een sterke variabiliteit in de waarden van de kwaliteitsparameters (TM, PM, VAP,...), wat onder meer te wijten is aan de intrinsieke variatie van de hengsten. Het zou interessant zijn om in een toekomstig onderzoek meer groepen met een verschillend bewaartermijn (0, 24, 48, 72 en 96 h) en met voldoende testikels per groep te hebben. Dit zou op significante wijze inzicht geven over de invloed van de bewaartermijn op de epididymale spermakwaliteit. Tevens moet het onderscheid gemaakt worden tussen testikels bekomen via castratie met en zonder lokale anesthesie.

## BESPREKING

### 1 Anatomie

Dorsolateraal van de testis ligt de epididymis of bijbal (fig 5). De epididymis bestaat globaal gezien uit 3 grote onderdelen die elk een eigen micromilieu hebben: de caput, corpus en cauda epididymidis (1). De ductus epididymidis wordt gevormd door het samensmelten van 13 tot 15 ductuli efferentes die afkomstig zijn uit de testis. Deze ductus wordt de 'ductus deferens' genoemd bij het verlaten van de cauda epididymidis. Het lumen van de ductus epididymidis verwijdt naar caudaal toe (2). In de tubuli seminiferes van de testes geschiedt de spermatogenese waarbij de kiemcellen vermeerderen en differentiëren. Het maturatieproces dat de zaadcellen motiel maakt, vindt plaats in de epididymis (1-3). Tijdens dit proces gebeuren diverse morfologische veranderingen: de cytoplasmadruppel migreert naar distaal en wordt finaal afgestoten (4). Daarbij wordt het middenstuk gestabiliseerd, neemt de acrosomale grootte af en condenseert het chromatine in de nucleus (5). Daarenboven worden de spermatozoa in de caput en corpus epididymidis metabool en biochemisch gewijzigd. Op het traject van de caput naar de cauda epididymidis stijgen de intracellulaire pH, de calcium concentratie en het cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) gehalte.

Het extragonadale spermareservoir wordt gevormd door de cauda epididymidis en de ductus deferens. De cauda bevat ongeveer 62% van de opgeslagen spermatozoa terwijl de ductus deferens 7% bevat (2,6). De spermatozoa worden gedurende enkele weken bewaard waardoor voldoende zaadcellen aanwezig zijn ten tijde van de ejaculatie. Vermoedelijk is de opgeslagen hoeveelheid genoeg voor 10 ejaculaties (7). Spermacellen in het ejaculaat zijn reeds 66 tot 71 dagen oud (8). Ter hoogte van de cauda epididymidis zijn de spermatozoa reeds vruchtbaar maar hun metabolisme is vrij laag aangezien de zuurstofspanning in de bijbal lager is en er minder energierijke moleculen aanwezig zijn: dit resulteert in spermatozoa die nog inactief zijn (3,7). Lokale stoffen zoals immobiline verhinderen de inductie van motiliteit en maken de epididymale vloeistof visceuzer (9). Verdunning van de epididymale spermatozoa zorgt ervoor dat het metabolisme en de motiliteit geactiveerd worden (9-10). De motiliteit wordt bewerkstelligd door de energie die vrijkomt door oxidatieve fosforylatie (11). Guimaraes et al. (2012) toonden aan dat er geen correlatie is tussen het gewicht van de testis ( $170,5 \text{ g} \pm 14,74 \text{ g}$ ) en de cauda epididymidis ( $14,14 \text{ g} \pm 0,79 \text{ g}$ ) (7). Er kunnen per hengst gemiddeld 15-25 miljard epididymale zaadcellen gecollecteerd worden (4,6). De kwantiteit per cauda epididymidis ( $8,52 \times 10^9 \pm 1,056 \times 10^9$  spermatozoa) ligt hoger dan de hoeveelheid zaadcellen die bekomen wordt door middel van ejaculatie met het gebruik van een artificiële vagina ( $6,597 \times 10^9 \pm 1,125 \times 10^9$  spermatozoa) (5,7,10). Het ejaculaat bevat voornamelijk spermatozoa die uit de ampulla ductus deferentis ( $2 \times 10^9$  spermatozoa) en het resterende gedeelte van de ductus deferens ( $2 \times 10^9$  spermatozoa) komen (4).



*Figuur 5: De testis, epididymis en ductus deferens. De ductus deferens werd na de castratie afgebonden met een ligatuur ter preventie van het verlies van opgeslagen spermatozoa. De bijbal ligt dorsolateraal op de testis.*

1 = Ductus deferens

2 = Cauda epididymidis

3 = Corpus epididymidis

4 = Caput epididymidis

5 = Extremitas caudata (testis)

6 = Corpus testis

7 = Extremitas capitata (testis)

## 2 Het gebruik van epididymale spermatozoa

Epididymaal sperma kan gepreserveerd worden om het genetische materiaal van een waardevol individu of species te bewaren en/of om te gebruiken voor artificiële voortplanting. Dit type sperma wordt over het algemeen geïncubeerd in het geval van electieve castratie, plotse sterfte of euthanasie van mannelijke dieren. Na sterfte neemt de spermakwaliteit onverwijld af door postmortem verval van het lichaam (12). Epididymaal sperma kan tevens een belangrijke rol spelen in het behoud van bedreigde diersoorten. Bovendien werd het in verse of bevroren toestand reeds succesvol gebruikt voor geassisteerde reproductie bij talloze diersoorten zoals de geit, de hond en de mens (1-2). In de paardenfokkerij wordt hoofdzakelijk naar fenotypische karakteristieken zoals sportprestaties en afstamming gekeken. De voortplantingscapaciteit komt dus pas op de tweede plaats. Het gedomesticeerde paard kan gebruikt worden als model voor wilde Equidae (13).

## 3 De kenmerken van epididymale spermatozoa

De leefbaarheid, morfologie en motiliteit van de spermatozoa zijn essentiële eigenschappen die de vruchtbaarheid van de hengst en dus het drachtpercentage bepalen (4). Zaadcellen die afkomstig zijn uit het meest caudale segment van de cauda epididymidis worden het meest beïnvloed door veranderingen in het lokale micromilieu. Uit het craniaal gedeelte wordt een hoger gehalte spermatozoa met een beschadigde membraan en losse koppen geïsoleerd. Dit kan te wijten zijn aan een hogere permeabiliteit van de plasmamembraan en het gebruik van de flotatiemethode (13). Losse koppen zijn het resultaat van een langdurig verblijf in het spermareservoir of ontstaan ten gevolge van

een dysfunctionerende spermiogenese (14). Het micromilieu waarin de zaadcellen gedijen heeft een belangrijke invloed op de motiliteit. De pH en osmolariteit nemen gradueel toe na sterfte waardoor de buffercapaciteit in het gedrang komt. Zo nam in een studie van Martinez-Pastor (2005) bij de ree en het edelhert voornamelijk de motiliteit en in mindere mate de integriteit van de plasmamembraan (PMI) en acrosomale integriteit af (12). Afhankelijk van de lokalisatie van de spermatozoa hebben stoffen zoals spermaverdunners en seminaal plasma (SP) een verschillend effect op de motiliteit (1).

De hoeveelheid epididymale spermatozoa die gepreleveerd worden uit de bijballen hangt onder andere af van de seksuele maturiteit, het seizoen en het testiculaire gewicht (3). Over het seizoenseffect op morfologische afwijkingen spreken studies elkaar tegen (8). Er zou sprake zijn van een raseffect op de seizoensgebonden morfologische abnormaliteiten doch speelt interindividuele variabiliteit een grotere rol. Na de puberteit verbetert de spermakwaliteit door een hogere graad van spermatogenese maar dit effect neemt terug af op gevorderde leeftijd wegens testiculaire degeneratie (14). Er is geen correlatie tussen het gewicht van de cauda epididymides en de lokale kwantiteit zaadcellen (7).

### **3.1 De invloed van seminaal plasma**

Seminaal plasma (SP) bereidt de zaadcel voor om de eicel te bevruchten door middel van het aanbrengen van wijzigingen in de plasmamembraan. Deze vloeistof beschermt de zaadcellen tegen fagocytose in het vrouwelijke geslachtsstelsel door middel van immunosuppressie. Daarnaast heeft SP initieel een positieve invloed op de motiliteit (1,15). De capacitatie en acrosomale reactie worden eveneens in de hand gewerkt door SP. Verder is SP bactericid, inhibeert het acrosine en fungeert tevens als voedingsbron voor de spermatozoa (15). De talloze functies van SP zijn nog niet allemaal opgehelderd (16). Seminaal plasma wordt gesecreteerd door de testes, epididymides en accessoire geslachtsklieren en bestaat uit eiwitten, enzymen, hormonen, macro-elementen en micro-elementen zoals zink. De samenstelling varieert tussen de verschillende diersoorten en verschilt van hengst tot hengst. Bovendien is het SP in elk ejaculaat, zelfs tussen de diverse fracties, anders samengesteld (17). Wellicht is de interactie van geëjaculeerde en epididymale spermatozoa met SP verschillend maar dit dient met verder onderzoek aangetoond te worden. Daarbij lijkt het ejaculaat van verschillende hengsten anders te reageren op SP (17). De hoge concentratie natrium in het SP van het paard kan peroxidatie van de membraanlipiden veroorzaken (18). Ook chloorionen hebben een ongunstig effect op de levensvatbaarheid van de spermatozoa.

Over de invloed van SP op de motiliteit na het ontdooien van epididymale spermatozoa bestaan controversiële resultaten. Gepooled SP had in een studie van Heise et al. (2011) een positief effect op de progressieve motiliteit (PM) van een vers epididymaal spermastaal maar er werd geen significant verschillend effect gezien op de PM van een ontdooid staal waarbij het SP voor het invriezen werd toegevoegd (4). In een onderzoek van Cary et al. (2004) konden geen significant positief of negatief effect aantonen (19). Daarentegen zag men in een studie van Volkmann et al. (2001) duidelijk een negatief effect (20). De tegenstrijdigheid in desbetreffende studies kan verklaard worden door verschilpunten in het aangewende protocol, materiaal en de invloed van de intrinsieke vruchtbaarheid van de hengsten. Seminaal plasma van de hengst zelf (autoloog), van een andere hengst (homoloog) of een gepooled staal werden in deze studies gebruikt. Indien de hengst plots sterft of niet meer in staat is om te ejaculeren, kan autoloog seminaal plasma uiteraard niet meer bekomen worden.

In een studie van Neuhauser et al. (2013) beschreef men dat SP een beschermende rol speelt tijdens de verwerking van zaadcellen: incubatie met SP gaf een betere levensvatbaarheid van de epididymale

zaadcellen (1). Normalerweise komen epididymale spermatozoa niet in contact met SP. Wegens de mogelijke positieve invloed op de motiliteit van verse spermatozoa wordt voorgesteld om het SP net voor de inseminatie toe te voegen (1,17). Indien men het SP reeds toevoegt voor het invriesproces, verbetert de motiliteit na het ontdooien echter niet bij alle hengsten (1,4). Er wordt gesuggereerd dat bepaalde eiwitten en elektrolyten in SP interfereren met de membraanpermeabiliteit waardoor op termijn de motiliteit afneemt en meer staartdefecten worden waargenomen. De hogere permeabiliteit leidt tevens tot een hogere kans op schade bij het vriesproces en logischerwijze een gedaalde fertiliteit (9,13,18). Echter, Tiplady et al. (2002) beweerden dat het gehalte en de soort lipiden en eiwitten in de plasmamembraan een grotere rol spelen bij de bescherming tegen vriesschade (21).

Een dosis van 0,5 mL SP voor  $1,6 \times 10^9$  spermatozoa wordt over het algemeen gehanteerd (6). De motiliteit (VAP, BCF, DSL, DCL en DAP) van epididymale spermatozoa nam in een aantal studies toe indien men SP in een concentratie van 20% of 50% toevoegde (bijlage IV,15-17). Het toevoegen van 80% SP gaf een daling van de voorgenoemde parameters (17). De VCL, VSL en ALH werden beter naarmate men meer SP toevoegde aan het staal. De LIN, STR en WOB daalden wanneer het percentage SP steeg. Een concentratie van 5% SP leek geen invloed te hebben op de TM. Door het toevoegen van 5-20% SP wordt een positief effect op de motiliteit tot 96 h na collectie waargenomen (16). Het effect is direct maar niet permanent: zo was in een onderzoek van Tiplady et al. (2002) aanvankelijk de PM beter maar dit effect was na 6 h niet meer significant aanwezig (21).

In een onderzoek van Pesch et al. (2006) werd een link tussen  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) in het SP en de motiliteit (TM en PM) van spermatozoa gevonden (15). Lactaat dehydrogenase (LDH) bleek positief gecorreleerd te zijn met de TM, PM en het aantal levende zaadcellen. Een negatieve correlatie tussen LDH en pathomorfologische afwijkingen werd gezien. Er werd sperma van 72 hengsten afgenomen via een artificiële vagina. De waarden voor GGT, LDH, AST (aspartaat transaminase), AIP (alkalische fosfatase) en AcP (acidische fosfatase) in het SP bleken heel variabel te zijn. De concentraties van ijzer, zink en fosfaat zijn gecorreleerd aan de spermatozoale concentratie in het ejaculaat. Zo is in de humane geneeskunde gekend dat abnormale gehalten calcium, magnesium, zink en koper gelinkt worden aan onvruchtbaarheid. Statische spermatozoa worden bij de hengst gecorreleerd aan een lager gehalte AST wat de ATP productie tegenhoudt. In het SP van de hengst is 60-75% van het calcium geïoniseerd. Dit staat in schril contrast met de mens, waar slechts 4% geïoniseerd is. Een acrosomale reactie kan mogelijk uitgelokt worden door geïoniseerd calcium. Het prematuur optreden van dit fenomeen wordt tegengehouden door de interactie met zink. Zink speelt tevens een belangrijke rol in het maturatieproces van de zaadcel (15).

### **3.2 De invloed van koliek en euthanasie**

Spermatozoa van hengsten die gestorven zijn aan koliek hebben een minder goede kwaliteit en mitochondriale activiteit in vergelijking met sperma van gezonde soortgenoten. Het is mogelijk dat endotoxines gevormd tijdens een zware koliekepisode en de ingestelde therapie een invloed hebben op de spermakwaliteit. Zo heeft dimethylsulfoxide (DMSO) een negatief effect op de motiliteit (22). De kwaliteit verbeterde in een studie van Gloria et al. (2016) echter na het wassen, koelen en invriezen (22). Na het verdunnen van de stalen met een verdunnervloeistof inclusief cryoprotectans, waren de parameters schijnbaar hetzelfde voor de gezonde groep en de groep hengsten die gestorven waren aan koliek. De bekomen kwantiteit spermatozoa was bovendien gelijkaardig: de stalen van de gestorven hengsten bevatten gemiddeld  $26,5 \pm 3,3 \times 10^9$  spermatozoa terwijl die van de gezonde hengsten  $29,7 \pm 4,2 \times 10^9$  spermatozoa bevatten (22). De PMI nam min of meer dezelfde waarden

aan bij gezonde en dode hengsten. Sommige studies tonen aan dat een hogere hoeveelheid zaadcellen wordt verkregen via het gebruik van epididymale collectiemethoden (23). Indien men te lang wacht om de orchiëctomie uit te voeren na sterfte van de hengst, gaat de spermakwaliteit zienderogen achteruit (24). Testiculaire degeneratie, hoe mild dan ook, geeft meer abnormaliteiten in de zaadcelpopulatie. De cellen die het meest gevoelig zijn aan een abnormale temperatuur en endocriene veranderingen zijn de spermatides en spermatocyten. Een verhoogde scrotale temperatuur wordt gezien bij koorts, lokaal trauma, lokale ontsteking (orchitis, periorchitis, epididymitis,...), hydrocoele, scrotale en inguinale hernia enzovoort. Door ziekte en stress wordt cortisol geproduceerd, wat gonadotropine-releasing hormone (GnRH), luteïniserend hormoon (LH) en testosteron inhibeert en dus een negatieve impact heeft op de spermatogenese (14).

De euthanasie dient plaats te vinden na de castratie gezien het effect van euthanasiemiddelen op de spermakwaliteit nog niet goed gekend is (6).

### **3.3 De invloed van anesthetica**

Het gebruik van het volatiele halothaan als algemeen anestheticum heeft schijnbaar een reversibel negatief effect op de motiliteit (25): wellicht zijn de mitochondriën en/of de flagel de potentiële aangrijpingspunten. Tevens neemt de intracellulaire calcium concentratie af. Het gehalte spermatozoa met een afwijkende beweging neemt toe na de inductie van de anesthesie. Het gemiddelde percentage levende spermatozoa en progressief motiele spermatozoa verschilt niet significant tussen epididymaal sperma geïsoleerd na inductie van de anesthesie en na het gebruik van een volatiel algemeen anestheticum als onderhoudsanesthesie (25). Het effect op de zaadcelkwaliteit van lokale anesthesie in de zaadstreng of de testes is nog niet opgehelderd maar dergelijke stoffen hebben presumptief een negatief effect (26). Volgens Falomo et al. (2016) heeft lokale anesthesie vermoedelijk een spermicide effect (27). In een studie van Guimaraes et al. (2012) had lidocaïne schijnbaar geen effect op de kwaliteitsparameters (7).

## **4 Het collecteren en verwerken van epididymale spermatozoa**

Elke stap van het proces heeft mogelijk een invloed op de kwaliteit van het epididymaal staal (13). Ervaring zorgt ervoor dat alles op een adequate en vlotte manier verloopt zodanig dat de kwaliteit en de reproduceerbaarheid van het collecteren verbetert.

### **4.1 Collectietechnieken**

Epididymale spermatozoa kunnen via diverse wegen bekomen worden: orchiëctomie, elektro-ejaculatie en sperma aspiratie behoren tot de verschillende mogelijkheden.

#### **4.1.1 Orchiëctomie**

De hengsten worden via een bepaalde castratiemethode zoals beschreven in 'materiaal & methoden' georchiëctomiseerd. Het proximale deel van de ductus deferens dient geligeerd te worden tijdens of na de ingreep zodat zo veel mogelijk zaadcellen gewonnen worden (24,27). De testes en epididymides worden na de ingreep gewassen met een steriele 0,9% NaCl fysiologische oplossing om



het niveau van contaminatie te verlagen, afgedroogd en ingepakt in bijvoorbeeld een plastieke rectale handschoen.

#### **4.1.2 Elektro-ejaculatie**

Elektro-ejaculatie is een weinig frequent gebruikte techniek om sperma te bekomen bij de hengst. Deze methode houdt dan ook talloze nadelen in zoals retrograde ejaculatie en urinelozing in het ejaculaat. In een studie van Cary et al. (2004) werd elektro ejaculatie onder algemene anesthesie toegepast (19): bij slechts 3 van de 7 pony's werd een ejaculaat bekomen dat bovendien een klein volume had. Bij 4 van de 7 pony's werd sperma aangetroffen in de blaas, wat wijst op retrograde ejaculatie. De motiliteit van de spermatozoa was over het algemeen heel zwak tot afwezig.

#### **4.1.3 Epididymale sperma aspiratie**

Percutane en microchirurgische epididymale sperma aspiratie (respectievelijk PESA en MESA) zijn minimaal invasieve methoden die hoofdzakelijk in de humane geneeskunde worden ingezet bij subfertiele mannen. Deze technieken worden in rugligging onder algemene anesthesie uitgevoerd (6,19). Bij MESA wordt een incisie gemaakt in het scrotum. De cauda epididymidis wordt doorheen de tunica vaginalis voorzichtig gefixeerd met een forceps en gepuncteerd met een spuit die met een naald of katheter verbonden is. Vervolgens creëert men negatieve druk door de stamper omhoog te trekken zodat epididymale vloeistof met spermatozoa geaspireerd wordt. De spuit wordt geleidigd in een petrischaaltje en verder verwerkt zoals beschreven wordt in paragraaf "4.2: Verdere verwerking na orchiëctomie". Bij PESA wordt niets ingesneden: men fixeert en puncteert de cauda epididymidis doorheen de huid. Met deze methode wordt in vergelijking met de andere technieken een lager aantal spermatozoa bekomen. De kwaliteit van het spermastaal is echter uitstekend. Er zijn nadien ogenschijnlijk geen histopathologische veranderingen in de epididymis doch raadt men een zekere wachtperiode aan na de aspiratie (28).

#### **4.2 Verdere verwerking na orchiëctomie**

De testes worden verwijderd zodat enkel de vas deferens en epididymis overblijven (5). Daarna wordt de fascie rond de cauda epididymidis en ductus deferens vrij gedissecteed. De zaadcellen uit deze extragonadale reservoirs kunnen via verschillende methoden gecollecteerd worden: de retrograde flushing methode en de flotatiemethode behoren tot de meest gebruikte mogelijkheden. Volgens Cary et al. (2004) waren de epididymale sperma kwaliteitsparameters gelijkaardig tussen de verschillende collectie methodes (9). Cryoprotectans wordt toegevoegd aan de spermaverdunnervloeistof die gebruikt wordt voor het verzamelen van de zaadcellen indien men het staal wenst in te vriezen. Welke spermaverdunnervloeistof als eerste keuze gebruikt wordt, verschilt van hengst tot hengst.

Na het verzamelen van de spermatozoa, worden de bekomen stalen een aantal keer gewassen en gecentrifugeerd aan 1000 g voor 20 minuten om zo een geconcentreerde oplossing te bekomen (22). De benodigde hoeveelheid verdunnervloeistof kan men pas berekenen nadat men de concentratie van de zaadcellen in het staal kent. Het centrifugeren en verdunnen verbeteren op zich de motiliteit, tot het motiliteitsniveau vergelijkbaar is met geëjaculeerde spermatozoa (10,21). Vervolgens kunnen de zaadcellen gekoeld en ingevroren worden.

In een studie van Papa et al. (2008) werd het effect bekeken van de incubatie (5°C, 15 min, 1:1 verdunning) van het spermastaal met diverse capacitiemediën en SP voor het invriezen (5). Spermastalen geïncubeerd met Sperm Talp scoorden beter voor de motiliteit (PM, TM, VSL, VCL, RAP) na het ontdooien dan Talp+P4, Fert Talp en SP. Sperm Talp kan wegens zijn superieure effect op de motiliteit en leefbaarheid ingezet worden om de vruchtbaarheidsresultaten van ontdooid epididymaal sperma te verbeteren. Wellicht zorgen bepaalde moleculen in Sperm Talp voor een betere PMI en/of een stijging in cAMP, wat uiteindelijk leidt tot een betere motiliteit en een beter capacitatievermogen. De PMI en mitochondriale potentieel bleven in deze studie echter ongewijzigd. De TM, PM, VSL, VCL, RAP verbeterden onmiddellijk en na 15 min incubatie (37°C) indien men de epididymides spoelde met 40 mL spermaverdunner gebaseerd op afgeroomde melk die 7,18 mM pentoxifylline bevatte (29, tabel 2). De motiliteit na het ontdooien en de PMI werden in een studie van Guasti et al. (2013) echter niet beïnvloed, al werd dit in andere onderzoeken zowel *in vivo* als *in vitro* beschreven (29, tabel 2). Pentoxifylline werd reeds succesvol gebruikt bij de mens en het schaap. Deze stof zorgt voor een hogere cAMP concentratie en een verhoogde tyrosine fosforylatie door het blokkeren van fosfodiesterase.

Tabel 2: De verschillende waarden met betrekking tot de motiliteit. De '-/+ PTX' staat voor de aan- of afwezigheid van pentoxifylline. Naar: Guasti et al., 2013.

-/+ PTX	TM	PM	VSL	VCL	BCF	RAP
<b>Onmiddellijk na castratie</b>						
- PTX	17,1 ± 14,0	5,5 ± 6,0	60,3 ± 11,3	150,5 ± 25,0	26,2 ± 5,8	9,4 ± 8,9
+ PTX	53,3 ± 21,9	20,6 ± 11,3	77,0 ± 11,4	194,9 ± 30,2	28,8 ± 3,2	43,9 ± 22,2
<b>Na ontdooien</b>						
- PTX	61,3 ± 14,9	27,0 ± 12,8	68,6 ± 9,5	158,3 ± 20,7	34,8 ± 4,2	41,9 ± 19,3
+ PTX	69,7 ± 14,0	30,4 ± 11,9	70,3 ± 8,4	160,6 ± 20,4	35,9 ± 3,9	48,2 ± 18,9

#### 4.2.1 Retrograde flushing methode

Een spuit met 15-20 mL verwarmde vloeistof of met lucht wordt aangesloten op een katheter met een stompe 14-18G naald, een tepelsonde of een pipettip (3). Deze wordt vervolgens in het proximale gedeelte van de zaadleider geschoven. Tussen de corpus en cauda epididymidis wordt een incisie gemaakt (5). De vloeistof of lucht wordt ingespoten en de zaadcellen worden opgevangen in een recipiënt zoals een petrischaaltje of een Falcon tube (2-3). Vloeistoffen die gebruikt worden zijn een (al dan niet cryopreserverende) spermaverdunner of fosfaat gebufferde fysiologische oplossing (PBS). Het gebruik van lucht in plaats van vloeistof heeft als voordeel dat er niet gewacht moet worden tot de spermaverdunnervloeistof de correcte temperatuur en pH heeft. Er moet tevens niet gecentrifugeerd worden voor het invriezen waardoor er minder kans is op het beschadigen van de zaadcellen (3,24). De retrograde flushing methode genereerde in een studie van Bruemmer et al. (2006) een hogere kwantiteit zaadcellen (15-20 x 10<sup>9</sup>) in vergelijking met de flotatiemethode (4-5 x 10<sup>9</sup>) (6). Volgens sommige auteurs bekomt men via deze methode meer spermatozoa dan via het ejaculaat: de epididymis slaat immers een hoge kwantiteit zaadcellen op (6). In een onderzoek van Vieira et al. (2013) daarentegen werden 6,5 ± 0,4 x 10<sup>9</sup> zaadcellen/mL aangetroffen in een gemiddeld volume epididymale vloeistof (720 ± 159 µL) (3). Het flushen kan mogelijk een traumatisch effect hebben op de zaadcellen (19). Er worden geen andere celtypen naast zaadcellen geïsoleerd (5).

#### 4.2.2 Flotatie methode

Bij de flotatiemethode worden 12-15 incisies gemaakt met 2 mm tussen elke incisie in de cauda epididymidis en ductus deferens (2,27). Na het maken van deze incisies werden in een onderzoek van Falomo et al. (2016) deze structuren in een petrischaaltje gelegd met 10 mL op 37°C verwarmde spermaverdunner voor ongeveer 10 min (27). Dan worden de bijbal en zaadleider verwijderd. De vloeistof in het petrischaaltje bevat de epididymale spermatozoa en wordt gefilterd om debris te verwijderen uit het staal (24). Deze techniek kan op zichzelf of na een retrograde flushing uitgevoerd worden om zoveel mogelijk spermatozoa te verzamelen.

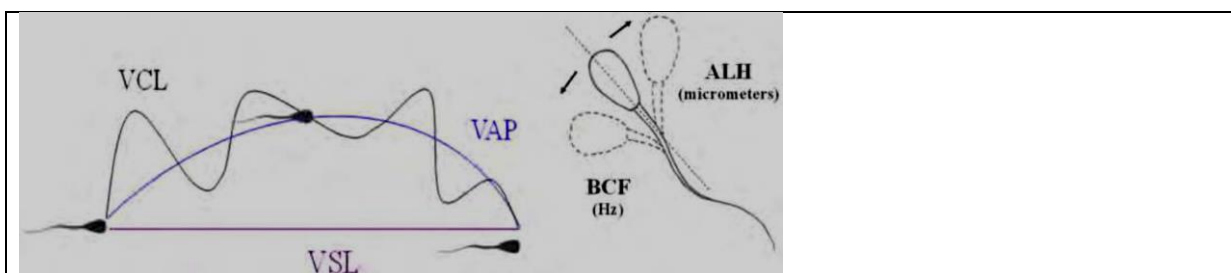
Het voordeel van de flotatiemethode is dat deze gemakkelijk uit te voeren is. Het is mogelijk dat door deze techniek de meer motiele spermatozoa die uit de bijbal kunnen zwemmen worden geselecteerd. Door de incisies komt bloed vrij: voorheen werd dit als spermatotoxisch beschouwd maar dit werd door Cary et al. (2004) weerlegd (19).

### 5 De beoordeling van de kwaliteit

#### 5.1 De motiliteit

Het bekijken van de motiliteit behoort tot het standaard onderzoek van spermatozoa. De beweging van de spermatozoa kunnen we onderverdelen in totale motiliteit (TM) en progressieve motiliteit (PM) (bijlage IV). De TM geeft het percentage spermatozoa weer die beweegt doch wordt er geen rekening gehouden met de karakteristieken van deze beweging. De PM daarentegen geeft het percentage spermatozoa weer die rechtlijnig beweegt: deze beweging moet  $\geq 75\%$  rechtlijnig (STR) zijn eer besloten wordt dat de zaadcel zich op een progressieve manier voortbeweegt. Het gehalte rechtlijnigheid kan bekomen worden door middel van de onderstaande formule. Er bestaan geen objectieve referentiewaarden voor de VAP, WOB, ALH, BCF, VCL, VSL, RAP en LIN (fig 6, bijlage IV).

$$\text{STR} = \frac{\text{VSL}}{\text{VAP}} \times 100$$



*Figuur 6: De beweging van de spermatozoa ten opzichte van de 'velocity average path' (VAP) en de 'velocity straight line' (VSL). De 'beat cross frequency' (BCF) en 'Amplitude of lateral head displacement' (ALH) worden verduidelijkt op de figuur aan de rechterkant. Uit: Partyka et al., 2012.*

De motiliteit kan op subjectieve wijze beoordeeld worden met een verwarmde fasecontrastmicroscop. Er kan tevens gebruik gemaakt worden van de computer-assisted semen analysis (CASA) om op objectieve wijze een idee te krijgen van de motiliteit (30). De grootste verandering in de beweging van zaadcellen wordt gezien bij het invriezen en ontdooien (1).

De PM van epididymaal sperma was in een studie van Guimaraes et al. (2012) lager in vergelijking met vers ejaculaat (7). Dit is wellicht te wijten aan de aanwezigheid van stoffen die de motiliteit inhiberen in de bijbal. Deze parameter werd echter beter na verwerking en na het ontdooien (7,9). Volgens Neuhauser et al. (2013) en Falomo et al. (2016) waren de TM en PM van verse epididymale zaadcellen beter dan die van de ontdooid stalen (1,27). De PM van ontdooid epididymaal sperma was lager in vergelijking met ontdooid ejaculaat (4). De waarde van de motiliteit van de geëjaculeerde spermatozoa kan men amper tot niet gebruiken om de motiliteit van spermatozoa afkomstig uit de epididymis in schatten (1,4,7). De motiliteit is volgens sommige auteurs tevens zwak tot zelfs niet gecorreleerd met de vruchtbaarheid (1,10). Daarentegen stelt Brito et al. (2007) dat de motiliteit en fertiliteit wel degelijk gelinkt zijn aan elkaar (14). In een studie van Neuhauser et al. (2013) werd geen correlatie gezien tussen de motiliteit en de leefbaarheid (1).

Tabel 3: De referentiewaarden voor geëjaculeerde spermatozoa.

Naar: Brito et al., 2007 en Knottenbelt et al., 2003.

Parameter	Referentiewaarde
Totale motiliteit	>60%
Progressieve motiliteit	>50%
Morfologisch normale spermatozoa	>60%
Proximale cytoplasmadruppels	<25%
Abnormale koppen	<30%

## 5.2 De morfologie en viabiliteit

### 5.2.1 Het maken van een morfologisch preparaat

De morfologie werd in dit onderzoek beoordeeld met behulp van een eosine-nigrosine kleuring onder een lichtmicroscop zoals beschreven in 'materiaal en methoden'. Een andere methode om de membraanintegriteit te beoordelen maakt gebruik van carboxyfluoresceïne diacetaat (0,46 mg/mL) en propidium iodide (200 mg/mL). Vervolgens worden ten minste 200 zaadcellen beoordeeld met behulp van een microscoop met epi-fluorescentie op 1000x vergroting. De zaadcellen die groene fluorescentie vertonen, zijn intact (opname carboxyfluoresceïne). Een verminderde PMI wordt zichtbaar door de aanwezigheid van rode fluorescentie (opname propidium iodide).

Andere kleurstoffen die gebruikt worden, zijn eosine-anilineblauw, Indische inkt, Giemsa, nieuw methyleenblauw of Spermac. Spermatozoa uit het caudale segment van de cauda epididymidis laten zich na collectie gemakkelijker kleuren door bromofenolblauw (13). Sommige CASA toestellen zijn in staat om een morfologische analyse te maken (30). Ook kan een fasecontrastmicroscop gebruikt worden op 1000x vergroting, waarbij het preparaat gefixeerd dient te worden in 1:4 ratio van gebufferde formol- fysiologische zoutoplossing (14). Het aantal artefacten dat ontstaat bij de laatstgenoemde methode is minimaal vermits er niet gekleurd wordt. Het gehalte acrosomale defecten wordt onderschat wanneer men een lichtmicroscop gebruikt (14).

### 5.2.2 De beoordeling van het preparaat

Morfologische afwijkingen komen tot stand door zaken die de spermatogenese, transport en maturatie beïnvloeden (30, tabel 4). De hengst produceert anisosperme spermatozoa: de morfologie van de zaadcellen kan vrij variabel tot zelfs afwijkend zijn maar toch een normaal vruchtbaarheidsvermogen

bezitten. Bij geëjaculeerd sperma hoort 50% van de zaadcellen een normale morfologie te hebben. Indien de morfologie van de meeste zaadcellen afwijkend is, kan gesteld worden dat de vruchtbaarheid van de hengst waarschijnlijk niet zo goed is. We kunnen echter niet stellen dat de vruchtbaarheid uitstekend is indien weinig tot geen morfologische defecten te zien zijn op het uitstrijkje (8). De verschillende defecten kennen elk een eigen graad van belang voor de fertiliteit (14). Zo zijn distale cytoplasmadruppels van ondergeschikt belang. Van sommige defecten is niet bekend hoe ze juist ontstaan. Witte en rode bloedcellen, kiemcellen of andere cellen op het uitstrijkje dienen onderkend te worden. Kiemcellen neemt men waar rond de puberteit of in het geval van testiculaire degeneratie: bij een kwantitatieve stijging van 1% nemen de drachtresultaten per cyclus af met 21% (14).

*Tabel 4: Morfologische defecten kunnen onderverdeeld worden in primaire, secundaire en tertiaire afwijkingen, die een verschillende oorsprong hebben.*

Defect	Oorsprong	Voorbeelden
<b>Primair</b>	Testis	*Abnormale koppen: microcephalie, acrosomale defecten, pyriform, tapered, kernvacuoles en multipale koppen. *Abnormale staarten: staartstomp, multiple staarten
<b>Secundair</b>	Epididymis	*Proximale en distale protoplasmadruppels *Abnormale koppen: losse koppen *Abnormale staarten: omgeslagen staart, opgerolde staart
<b>Tertiair</b>	Verwerking	*Gebroken staarten, rood gekleurde cellen

Epididymaal sperma had in een studie van Vieira et al. (2013) een viabiliteit van  $86,5\% \pm 1,3\%$  wanneer dit onmiddellijk na de castratie werd verwerkt (3). De viabiliteit was  $81,1\% \pm 2,0\%$  indien de epididymides tot 72 h gekoeld (op  $4^{\circ}\text{C}$ ) bewaard werden. Na 96 h bewaring was de leefbaarheid afgenomen tot  $77,2\% \pm 2,6\%$ . In een studie van Morris et al. (2002) was 75% van de verse epididymale spermatozoa levend (26). Na het ontdooien was slechts 30% van het staal vitaal.

Volgens Monteiro et al. (2013) kan de incidentie van apoptose in een staal als een parameter gebruikt worden om de spermakwaliteit te beoordelen (9). Het medium dat gebruikt wordt voor het collectieproces beïnvloedt net als het invriesproces morfologische defecten zoals middenstuk reflexen, distale cytoplasmadruppels, acrosomale degeneratie en staartafwijkingen. Een significante invloed op defecten ter hoogte van de nucleus en op knopvormige acrosomen werd in een onderzoek van Heise et al. (2011) niet gezien: deze defecten worden dan ook reeds gevormd tijdens de spermiogenese en niet tijdens het maturatieproces in de epididymis (4). Een lager percentage acrosomale reactie is aanwezig in een epididymaal staal in vergelijking met ejaculaat (5). Seminaal plasma leek volgens Heise et al. (2011) geen invloed te hebben op de levensvatbaarheid van spermatozoa (4). In deze studie werden de spermatozoa gecentrifugeerd voor het invriezen, wat grotendeels het SP verwijderde. Het percentage zaadcellen met morfologische defecten was volgens Monteiro et al. (2002) en Guimaraes et al. (2012) niet significant verschillend tussen geëjaculeerd sperma en epididymale stalen (7,10). In een studie van Heise et al. (2011) vertoonden verse epididymale spermatozoa meer morfologische defecten in vergelijking met verse zaadcellen uit een ejaculaat (4). Invriezen verminderde dit kwantiteitsverschil en deed het percentage morfologische afwijkingen sterk stijgen: een uitzondering hierop werd gezien in epididymale stalen waar SP aan werd toegevoegd. Wellicht zorgt het SP voor een significante daling in het aantal distale cytoplasmadruppels. Distale cytoplasmadruppels maken het leeuwendeel uit van de morfologische afwijkingen die bij verse

spermatozoa aangetroffen worden (4,14). Het cytoplasma wordt grotendeels opgenomen door de Sertoli cellen in de testis maar er blijft een druppel over die tijdens het maturatieproces in de epididymis wordt afgestoten. De kwantiteit van dit defect is hoger in epididymale zaadcellen in vergelijking met geëjaculeerde spermatozoa. Dit kan via meerdere mechanismen verklaard worden. Zo hebben geëjaculeerde spermatozoa meer tijd om te matureren in vergelijking met gecollecteerde epididymale spermatozoa. Bovendien werd bij de stier aangetoond dat bepaalde stoffen in het vesiculaire blaasjesvocht helpen om de cytoplasmadruppel af te stoten. Vriezen doet het percentage van het voorgenoemd defect dalen. Dit soort defect heeft ogenschijnlijk geen effect op de bevruchtungsvermogen van het sperma (4). Volgens Brito et al. (2007) is de negatieve correlatie tussen distale cytoplasmadruppels en de drachtresultaten per cyclus 3 keer kleiner in vergelijking met proximale cytoplasmadruppels (14).

Middenstuk reflexen ontstaan in de corpus en cauda epididymidis door een hogere gevoeligheid aan lokale ionen (4,14). Dit defect zorgt ervoor dat de zaadcel een omgekeerde zwembeweging maakt. Epididymale spermatozoa geïncubeerd met SP hebben minder middenstuk reflexen in vergelijking met zaadcellen uit ejaculaat: het SP zorgt voor een wijziging in het ionisch milieu. Spermatozoa uit het ejaculaat hebben daarentegen minder middenstuk reflexen dan verse epididymaal zaadcellen zonder SP. Het invriezen doet het gehalte van dit defect dalen maar dit geldt niet voor epididymaal sperma zonder SP (4).

Het grootste aantal abnormale koppen, staartdefecten en proximale cytoplasmadruppels werden gezien bij hengsten jonger dan 3 jaar. In de leeftijdsklasse 3-9 jaar leek het aantal abnormale koppen en staarten te dalen. Een inteeltgraad >2% bij Shetland pony's leidt tot een daling in het percentage normale spermatozoa (14).

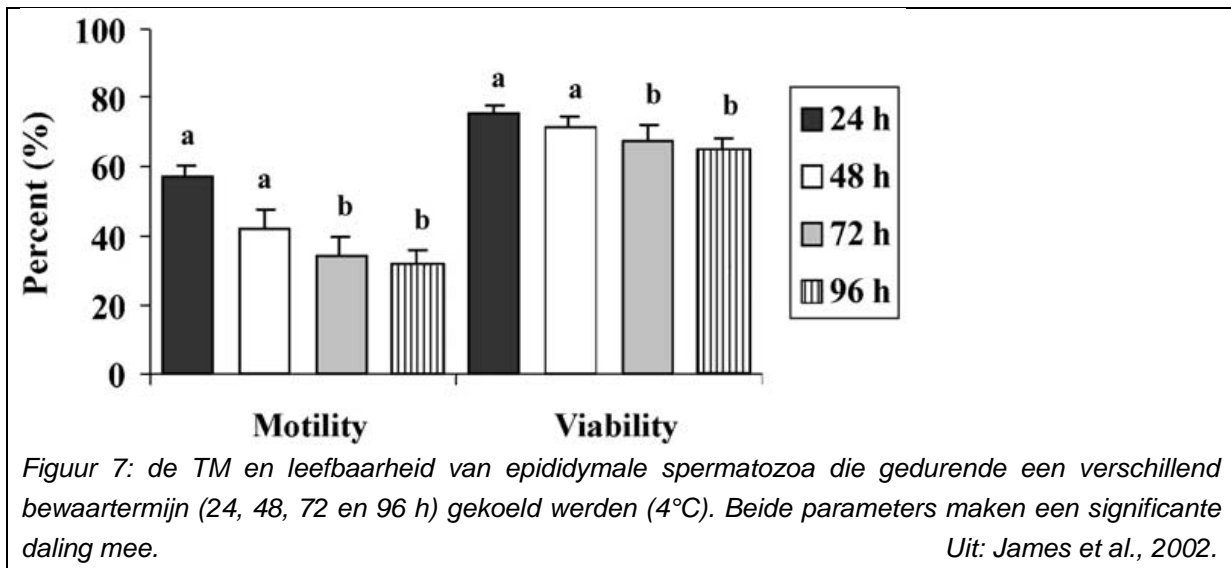
### **5.3 De concentratie**

De concentratie is eveneens een belangrijk onderdeel van het standaard onderzoek. De haemocytometer kan gebruikt worden om de spermatozoa onder de lichtmicroscop te tellen. Dit is een glazen slide met een rooster op waardoor de zaadcellen geteld kunnen worden. Het staal wordt verdund met een stof die de zaadcellen stil legt, zoals formaldehyde. Deze directe methode wordt beschouwd als zijnde de gouden standaard maar ze is subjectief en de kans op telfouten is relatief groot. De overige, indirecte methoden hebben als nadeel dat zij mogelijk ook andere celtypes dan spermatozoa meetellen. Een spectrofotometer en fotometer meten hoeveel spermatozoa in een staal aanwezig zijn aan de hand van de kwantiteit lichtabsorptie: hoe meer spermatozoa, hoe meer licht geabsorbeerd wordt. Contaminatie van het staal leidt echter tot een hogere absorptiegraad en dus tot een overschatting van de concentratie. Het staal wordt 1:200 verdund met fysiologische oplossing in een cuvette. Een fluorescentie gebaseerd telsysteem zoals de NucleoCounter® SP-100TM is een nieuwe methode die zowel de concentratie als de viabiliteit meet. Recentelijk behoort flowcytometrie ook tot de mogelijkheden om de zaadcellen te tellen. De CASA meet naast de motiliteit ook de concentratie maar deze is niet zo accuraat als bovenstaande methodes (30-31).

### **6 De gekoelde bewaring**

Het tijdstip en de lokatie van castratie zijn niet altijd even ideaal voor de collectie van epididymale spermatozoa (5). Het gekoeld bewaren van de epididymides is van vitaal belang om de fertiliteit zo goed mogelijk te behouden en zeker als men het staal wenst over te brengen naar een faciliteit die

ervaring heeft met de procedure om epididymale spermatozoa te collecteren. Het gekoeld bewaren van de volledige testikel na castratie houdt kwalitatief gezien geen voor- of nadelen in ten opzichte van het koelen van epididymale spermatozoa die onmiddellijk na castratie geïncubeerd worden (7). De Equitainer is de gouden standaard die wereldwijd gebruikt wordt voor het transport van equine gekoeld sperma (16). De resultaten van een studie van Mislei et al. (2016) suggereerden dat een temperatuur van +8°C nog aanvaardbaar is als bewaar temperatuur. Dit is hoofdzakelijk van belang wanneer het lokaal heersende klimaat een optimale koeling onmogelijk maakt (16). Het is goedkoper om enkel de epididymale zaadcellen te versturen in plaats van de intacte epididymides gezien het lagere gewicht en volume (7).



Er bestaan diverse koelprocedures voor ejaculaat maar vermoedelijk hebben epididymale spermatozoa een ander koel- en invriesprotocol nodig wegens verschillen in de membraanstabielheid en -samenstelling. Er heerst onenigheid over het al dan niet meer resistent zijn van epididymale spermatozoa tegenover een lagere temperatuur en voor hoe lang men de stalen kan bewaren met behoud van de kwaliteit (1,9). De PM is de parameter die het meest beïnvloed wordt door de duur van de bewaring. Het bewaren op 5°C geniet de voorkeur in vergelijking met de bewaring op kamertemperatuur (18-24°C): een lagere temperatuur vertraagt het cellulair metabolisme waardoor degeneratieve processen tegenhouden worden. Desondanks nam in een studie van Monteiro et al. (2013) de PM significant af na 18 h bewaartermijn op 5°C (9). De kwaliteit, waaronder de leefbaarheid en TM, ging snel achteruit indien men de epididymides langer dan 12 h bewaarde op kamertemperatuur (9, fig 7). Zo was er reeds na 6 h een aanzienlijke daling van de PM. Na 12 h bewaring op kamertemperatuur daalden tevens de VSL en RAP. Bij het langer dan 24 h bewaren van de epididymis, werden significant lagere waarden van de VCL en PMI waargenomen. Ontdooide epididymale zaadcellen die onmiddellijk na het castreren of na 24 h gekoelde bewaring van de epididymides geïncubeerd werden, waren volgens Monteiro et al. (2011) minstens even vruchtbaar als spermatozoa afkomstig uit het ejaculaat (10). In een andere studie van Monteiro et al. (2013) kon geen verschil in de VAP en VSL worden vastgesteld tussen groep 1 waarbij het geëjaculeerde sperma 24 h op 5°C werd bewaard en groep 2 waarbij epididymale stalen onmiddellijk na de electieve castratie geïncubeerd en bewaard werden onder dezelfde omstandigheden (18). Bij een derde groep werden de zaadcellen pas verzameld nadat de epididymides 24 h bewaard werden op 5°C. Epididymale zaadcellen (groep 2 en 3) scoorden na 24 h gekoelde bewaring een betere TM, PM, RAP, VSL, VAP en PMI in vergelijking met geëjaculeerd sperma uit groep 1. Volgens Guimaraes et al.

(2012) waren de kwaliteitsparameters zoals de concentratie spermatozoa, TM, VSL, RAP, viabiliteit en morfologische defecten gelijkaardig in vergelijking met geëjaculeerde spermatozoa: het maakte het niet uit of de zaadcellen onmiddellijk na de orchiëctomie gepreleveerd werden, gecollecteerd werden na het koelen van de epididymides voor 24 h op 4°C of de gecollecteerde spermatozoa direct na orchiëctomie bewaard werden voor 24 h op 4°C (7). Een aanzienlijke daling van de vitaliteit wordt waargenomen als men de epididymale spermatozoa voor 24 h op 22°C bewaart (7). Desalniettemin werd in een onderzoek van Neuhauser et al. (2013) een verlaagde motiliteit maar geen verlaagde leefbaarheid vastgesteld bij het bewaren van de epididymis op kamertemperatuur gedurende een etmaal: deze temperatuur veroorzaakt veranderingen in het metabolisme en/of het micromilieu waarin de spermatozoa gedijen (1).

Volgens een onderzoek van Vieira et al. (2013) konden de epididymides bewaard worden op 5°C voor 96 h (3). De motiliteit (TM, PM, VAP, LIN) werd in een onderzoek van Mislei et al. (2016) beter na het toevoegen van 10% SP: de spermatozoa werden gepreleveerd uit testikels die 24 h bewaard werden op +8°C in een Equitainer (16). Bovendien was de levensvatbaarheid beter in de voorgenoemde groep dan in de groep waarbij de testikels bewaard werden met 10% SP op +3°C in een styrofoam box gevuld met ijs. De levensvatbaarheid was niet significant verschillend tussen de groepen met en zonder SP. De epididymaal stalen werden daarna bewaard op 4°C. De kwaliteit werd bekeken op 24 h en 48 h maar er werden geen significante wijzigingen waargenomen. Daarenboven werden geen prominente kwaliteitsgewijze verschillen waargenomen tussen het bewaren in een styrofoam box met ijs (+3°C) en in een Equitainer (+8°C). De temperatuur in een styrofoam box met ijs is sterk afhankelijk van de omgevingstemperatuur. Dit maakt dat de koelcurve eerder variabel is. Er wordt gesuggereerd dat +8 tot +10°C wellicht een betere bewaartemperatuur is voor hengsten wiens geëjaculeerde spermatozoa niet goed bestand zijn tegen koeling op +4°C. Een bewaartemperatuur van +15 tot +20°C zou volgens Cuervo-Arango et al. (2014) gelijkaardige drachtresultaten, spermakwaliteit en microbiële groei opleveren (32). Het toevoegen van eidooier heeft, net zoals bij het invriesproces, een positieve invloed op de TM, PM en VCL van gekoelde zaadcellen (1). Na het bewaren (24 h, 4°C) van de testikel in fysiologische oplossing is de PM minder goed in gemodificeerde Palmer verdunner (6,5%) in vergelijking met Egg Tech® (14,0%). De TM blijkt echter ongeveer even goed te zijn (respectievelijk 63,0% en 65,6%) (27).

In het temperatuurstraject +37°C tot +20°C gaat de temperatuur met 0,3-0,5°C/min naar beneden, wat vrij snel is. Van +20°C tot +5°C wordt traag gekoeld met een daling van <0,1°C/min (30). Volgens Neuhauser et al. (2014) is dergelijke trage koeling tussen +20°C en +5°C van geen belang voor de motiliteit (13). Te traag koelen of invriezen kan aanleiding geven tot dehydratatie van de zaadcellen. Andere auteurs zoals Olaciregui et al. (2014) meenden dat het van uitermate belang is om traag te koelen indien men het sperma wenst in te vriezen: de spermakwaliteit is beter en de zaadcellen vertonen een hogere weerstand tegen koude shock (23). Koude shock is een fenomeen die de motiliteit stil legt, de spermatozoa beschadigt en teruggeslagen staarten creëert. Het koelen en invriezen heeft veruit de meeste impact op de mitochondriën.

## 6.1 Het laden van de rietjes

De spermastalen worden na het wassen verdund met een spermaverdunner inclusief cryoprotectans en worden 75 min gekoeld op +5°C. Na de bepaling van de concentratie wordt het sperma verdeeld over rietjes die ingevroren worden (22). Bij geëjaculeerd sperma wordt een dosis van 100-200 miljoen progressief motiele spermatozoa per rietje (0,5 mL of 0,25 mL) gehanteerd. Het laden van de rietjes kan manueel of geautomatiseerd gebeuren (24). Er bestaan diverse mogelijkheden om het rietje te



verzegelen: men kan het rietje verzegelen met ultrasoon geluid, glazen of metalen balletjes of polyvinyl alcohol poeder.

## 7 Het invriezen van spermatozoa

Invriezen van sperma biedt talloze voordelen: het genetische materiaal van een hengst wordt langdurig bewaard, geografische barrières worden opgeheven en de verspreiding van ziektes wordt geminimaliseerd. Epididymale spermatozoa kunnen zoals een normaal ejaculaat ingevroren worden volgens het standaard protocol in een faciliteit die ervaring heeft met invriezen. De kwaliteit van ingevroren spermatozoa afkomstig uit de epididymis wordt niet beïnvloed door het al dan niet 24 h bewaren van de volledige testikel voor het collecteren en invriezen van het epididymaal staal (7,10). Een eenduidig protocol specifiek voor het invriezen van epididymale spermatozoa bestaat nog niet. Bovendien is niet elke hengst geschikt om sperma te produceren die ingevroren wordt: zo was het in een studie van Vidament et al. (1997) bij 19% van de hengsten onmogelijk om het sperma in te vriezen (33). Om de kwaliteit van ontdooid sperma van hengsten die over het algemeen 'slechte vriezers' zijn te verbeteren, kan men SP van een 'goede vriezer' gebruiken wiens sperma een acceptabele tot uitermate goede kwaliteit heeft na het ontdooien (4). Desalniettemin beweerde men in een studie van Pena et al. (2011) dat er geen link was tussen de antioxidantia in SP en de weerbaarheid ten opzichte van lipide peroxidatie (11). Hengsten waarvan bekend is dat de geëjaculeerde zaadcellen niet goed bestand zijn tegen het invriezen, presteren veelal even slecht met hun ingevroren epididymale spermatozoa (25). Bij paarden, varkens en runderen worden een hoge mate van oxidatieve stress en apoptose gezien bij het invriezen van geëjaculeerde spermatozoa. Dit wordt onder meer veroorzaakt door lipide peroxidatie, wat leidt tot een verminderde houdbaarheid na ontdooien. Bacteriën zoals coliformen, *Streptococcus* spp. en *Staphylococcus* spp. spelen hier nagenoeg een rol in. Vermoedelijk wordt het belang van het directe effect van de lipide peroxidatie overschat vermits in een aantal hengsten deze parameter met slechts 2-3% toeneemt bij het ontdooien van sperma. De graad waarin lipide peroxidatie optreedt, hangt af van de lipide samenstelling van de zaadcelmembraan. Het meest voorkomende vetzuur in de zaadcelmembraan bij de hengst is docosapentaanzuur (C22:5 n-6). We kunnen dus stellen dat de membraansamenstelling van de zaadcel belangrijk is voor de weerstand tegen schade die kan ontstaan bij het invriezen. Hypothetisch gezien zou de vriesbaarheid verbeterd kunnen worden door het aanpassen van het dieet van de hengst waarbij het lipideprofiel verbeterd wordt (33). Bij het opstellen van een invriesprotocol voor epididymale spermatozoa moet dus zeker gepoogd worden om de kans op oxidatieve stress te verminderen zodat de kwaliteitsparameters na het ontdooien zo goed mogelijk zijn. Over het algemeen wordt dezelfde verdunner voor epididymaal sperma gebruikt als diegene die het meest geschikt is voor het geëjaculeerd sperma van de hengst (6). In een studie van Bruemmer et al. (2006) werd epididymaal sperma voor het invriezen verdund met een cryobeschermende spermaverdunner tot  $800 \times 10^6$  spermatozoa per dosis werd bekomen (6). Het gebruik van een lagere concentratie glycerol of nieuwe cryoprotectantia zoals dimethylformamide in het protocol zou betere resultaten geven.

Monteiro et al. (2013) toonden aan dat epididymale zaadcellen die onmiddellijk gecollecteerd en ingevroren werden na castratie een betere kwaliteit hadden dan ingevroren ejaculaat van dezelfde hengsten: de TM, PM, VAP, VSL, en PMI waren beter 8 h na het ontdooien (9). Zelfs indien de epididymides voor het invriezen gekoeld (+4°C) bewaard werden voor 24 h, waren de VAP, RAP en PMI na het ontdooien beter in vergelijking met de zaadcellen uit het ontdooid ejaculaat. Het ejaculaat

had minder levende en meer beschadigde spermatozoa in vergelijking met het epididymale staal indien de stalen 8 h op +20°C werden bewaard na het ontdooiproces.

De levensvatbaarheid van epididymale zaadcellen na het ontdooien was in een studie van Guimaraes et al. (2012) hoger dan die van het ejaculaat: hypothetisch wordt gesteld dat dit het gevolg is van een betere weerstand tegen koude shock (7). In een onderzoek van Heise et al. (2011) was de levensvatbaarheid van de epididymale cellen eveneens hoger maar er werden meer morfologische abnormaliteiten aangetroffen (4). Dit laatste kan te wijten zijn aan het gebrek aan contact met SP (7). Voor het invriesproces vertonen de meeste epididymale spermatozoa intermediaire capacitatie en na het ontdooien een acrosomale reactie. Geëjaculeerde spermatozoa zijn daarentegen niet gecapaciteerd voor het invriezen en intermediair gecapaciteerd na het ontdooien (36). De zwakste spermatozoa sterven gedurende het vriesproces waardoor enkel nog de spermatozoa met de beste kwaliteit overblijven na het ontdooien. De spermakinetiek is ogenschijnlijk beter na het invriezen terwijl men dan eigenlijk de superieure subpopulatie van het oorspronkelijk staal bekijkt. Hyperactivatie leidt tot een minimale verandering in de motiliteit: de spermatozoa bewegen zich op een niet-progressieve en niet-lineaire manier met een grote ALH en wijde staartbeweging voort. De waarden van VAP en VSL stijgen terwijl de LIN en STR afnemen. Deze veranderingen zijn gelinkt aan (cryo)capacitatie en het gebruik van capacitatiemedia (34).

Het sperma wordt eerst gekoeld tot +5°C en vervolgens ingevroren tot -196°C, wat gebeurt aan een snelheid van -20 tot -50°C/min. Dan worden de rietjes ondergedompeld in vloeibare stikstof (1,24). Koolzuurijs (-79°C) kan ook gebruikt worden. De tijd die nodig is tussen het koelen en het invriezen varieert tussen de verschillende verdunners. Een wachttijd van 20 min op +5°C bij gebruik van Botu-Crio™ en 2 h voor INRA-96® (INRA, Parijs, Frankrijk) wordt aangeraden (24).

### **7.1 Spermaverdunners met cryoprotectantia**

De verwarmde (+37°C) cryobeschermende spermaverdunner verdunt het spermastaal waardoor meer rietjes gevuld kunnen worden. Het bevat stoffen die zorgen voor de optimale bewaring van de spermatozoa. Er bestaan verscheidene spermaverdunners die elk op zich een specifieke samenstelling hebben. Buffers die de pH, elektrolytenbalans en de osmolariteit regelen zoals een fosfaatbuffer, zitten standaard in de verdunnervloeistof. Daarenboven zitten stoffen die metabolieten neutraliseren en de zaadcellen beschermen tegen koude shock in de commerciële verdunner (24). Antibiotica zoals amikacine, polymyxine B en ticarcilline worden aangewend om potentiële contaminatie te bestrijden. Energie kan onder de vorm van glucose, fructose of lactose toegevoegd worden. Het gehalte oxidatieve stress daalt door het toevoegen van antioxidantia die op het niveau van de mitochondriën werken (11). Welke spermaverdunner de voorkeur geniet, is afhankelijk van de spermakwaliteit van de hengst. Meestal wordt een 1:2-1:4 verdunning gehanteerd. In het geval dat het staal een lage concentratie in combinatie met een groot volume zou hebben, kan het staal eerst gecentrifugeerd (500 g voor 10 min) en geresuspendeerd worden of kan een verdunning van 1:1 gebruikt worden (30). Na het verdunnen van het staal wordt 10-20 min gewacht eer het vriesproces in gang wordt gezet om zo een superieure motiliteit te verkrijgen (24). In een studie van Falomo et al. (2016) werden EGG TECH® en gemodificeerd Palmer medium gebruikt als verdunnervloeistof: deze verbeterden de TM na het ontdooien (27). De PM was beter in vergelijking met studies waarbij INRA-82® of EDTA-lactose gehanteerd werden (5,27, tabel 5). Het gebruik van Botu-Crio™ leidde in verschillende onderzoeken van Monteiro et al. (2011,2013) tot een betere TM en PM na het ontdooien

(9-10). Er wordt geen verschil gezien in PMI als men Botu-Crio™, EDTA-lactose en INRA-82® onderling vergelijkt (5).

Tabel 5: De TM en PM van de spermatozoa bij gebruik van diverse spermaverdunners met cryoprotectantia worden vergeleken. Naar: Papa et al., 2008 en Melo et al., 2007 (35).

Freeze extenders	TM (%)	PM (%)
EGG TECH®	68,3% ± 6,1 %	14,2% ± 2,1%
Gemodificeerde Palmer	64,5% ± 6,1 %	8,9% ± 2,1%
INRA-82®	10,7% ± 15,7%	4,0% ± 7,4%
EDTA-lactose	3,4% ± 9,3%	1,1% ± 3,2%
Botu-Crio™	47,6% ± 23,6%	19,6% ± 11,4%

## 7.2 Cryoprotectantia

Cryoprotectantia zijn stoffen die de intra- en extracellulaire ijskristallisatie verhinderen zodat de zaadcellen intact blijven (24). Het intracellulaire ijskristallisatiefenomeen in humane en equine zaadcellen kan met onder andere een elektronenmicroscop en ijskristalmetingen niet aangetoond worden. De meeste schade ontstaat overwegend bij het ontdooien door osmotische veranderingen in het milieu. De osmotische stress wordt tijdens het invriezen veroorzaakt doordat de cellen water verliezen ten gevolge van de hypertoniciteit van het extracellulaire milieu. De mate van dehydratatie hangt af van de invriessnelheid en stopt pas bij het bereiken van het osmotisch evenwicht. Bij het ontdooien ontstaat een extracellulair hypotoon milieu waardoor de cellen water opnemen en uitzetten. De veranderingen in volume brengen in belangrijke mate schade toe aan de plasmamembraan, het cytoskelet maar in het bijzonder aan de mitochondriën. Een osmolaliteit van 450 tot 900 mOsm/kg wordt verdragen zonder enige vorm van schade te berokkenen. De blootstelling aan een lagere osmolaliteit inhibeert initieel de motiliteit bij terugkeer naar een isotoon milieu. Permanent gekrompen cellen worden waargenomen bij het blootstellen aan een hogere osmolaliteit (1500 mOsm/kg). Verder worden de zaadcellen tijdens het invriezen beschadigd door extracellulaire ijskristallisatie (11,24). Om beschadiging te minimaliseren, wordt cryoprotectans gradueel toegevoegd ofwel wordt het staal gekoeld na het toevoegen van dergelijke stof (30). Voor de optimale concentratie van een cryoprotectans worden de negatieve en positieve intracellulaire effecten in rekening gebracht. Het ideale cryoprotectans heeft de volgende kenmerken: een hoge wateroplosbaarheid, een laag moleculair gewicht en een zo laag mogelijke spermatotoxiciteit (23). Vaak worden diverse cryoprotectantia gecombineerd in één enkel product voor een optimale bescherming van de spermatozoa: zo zitten zowel glycerol als methylformamide in Botu-Crio™ (24).

Er bestaan penetrerende en niet-penetrerende cryoprotectantia die in principe spermatotoxisch kunnen zijn (tabel 6). Het meest gebruikte agens is glycerol die via passieve diffusie wordt opgenomen: het risico op intracellulaire beschadiging van de spermatozoa vermindert vermits deze stof een lager vriespunt heeft dan water waardoor het intracellulaire ijskristallisatieproces later optreedt (30). Op moleculair vlak denatureren de eiwitten en wordt de actine activiteit gewijzigd (23). De spermakwaliteit wordt negatief beïnvloed door een concentratie van >3,5% glycerol. De meest effectieve concentratie glycerol in een INRA® verdunner bedraagt 2,5% (22). Het samenvoegen van glycerol met cholesterol geladen methyl-β-cyclodextrines zou de opname van het cryoprotectans vergemakkelijken maar leidt niet tot betere vruchtbaarheidsresultaten (11). Het cholesterol houdt hoogstwaarschijnlijk de acrosomale reactie tegen. Een studie van Olaciregui et al. (2014) toonde het superieure effect van 5% dimethylformamide op de TM en PM aan, waardoor deze stof als een

potentiële vervanger van glycerol (MW = 92,09 g/mol) wordt aanzien (23). Dimethylformamide en methylformamide hebben een lager moleculair gewicht (respectievelijk 73,09 g/mol en 59,07 g/mol) en een lagere viscositeit (11,24): bijgevolg diffunderen deze stoffen gemakkelijker in en uit de spermatozoa en hebben ze een minder sterke osmotische werking, waardoor de kans op schade door osmotische stress kleiner wordt.

De niet-penetrerende agentia zoals afgeroomde melk en koolhydraten zijn extracellulair aanwezig: dit creëert een hypertoon milieu en trekt water uit de spermatozoa aan zodat deze gedehydrateerd worden. Dit proces zorgt ervoor dat intracellulaire ijskristallisatie in minder grote mate kan doorgaan.

Eidooier is een niet-penetrerende cryoprotectans die reeds decennia lang wordt gebruikt. Het beschermt de zaadcellen tegen koude shock door de aanwezigheid van low density lipoproteïnes (LDL) die fosfolipidemembraandefecten tijdens het vriesproces herstelt (24). Bovendien werkt eidooier het spermatotoxisch effect van SP tegen en neutraliseert het waterstofperoxide die een afvalproduct is van het metabolisme van de zaadcellen. Het bevat ook voedingstoffen voor de spermatozoa. De kwantiteit eidooier moet in evenwicht zijn met de hoeveelheid SP in het spermastaal. De gewenste concentratie fluctueert over het algemeen rond de 20% (24). De *in vitro* bevruchtingsresultaten zijn echter beter bij een concentratie van slechts 3% eidooier. Deze cryoprotectans capteert stikstofmonoxide, wat van groot belang is voor het functioneren van de equine zaadcel (11). Eidooier kent een variabele samenstelling wat de reproduceerbaarheid nadelig beïnvloedt. Microbiële contaminatie van het spermastaal is eveneens een mogelijk gevolg. Een vermindering van de microbiële contaminatie wordt bekomen door het toepassen van pasteurisatie (23). In een studie van Olaciregui et al. (2014) had pasteurisatie van eidooier echter een slecht effect op de TM en PM van ontdooid sperma (23). Dit is in schril contrast met een studie van Papa et al. (2008) waar gepasteuriseerde eidooier de spermakwaliteit ten goede kwam (5). Als alternatief kan sojaboon lecithine gebruikt worden. Zowel eidooier als afgeroomde melk hebben een positieve invloed op de motiliteit van zaadcellen: deze stoffen hebben de grootste invloed op de spermatozoa in het meest craniale deel van de cauda epididymidis (1).

Tabel 6: Voorbeelden van verschillende penetrerende en niet-penetrerende cryoprotectantia.

Penetrerende cryoprotectantia	Niet-penetrerende cryoprotectantia
Glycerol	Polyvinylpyrrolidone
Dimethylsulfoxide	Eidooier
Propyleenglycol	Lactose
Dimethylformamide	Afgeroomde melk

### 7.3 De invloed op kwaliteitsparameters

Zelfs indien na de collectie geen PM wordt waargenomen, wordt het epididymaal staal ingevroren. Soms wordt er een verbetering tot 35% van de TM gezien na het ontdooiproces. De parameters die belangrijk worden geacht voor het beoordelen van de spermakwaliteit, zijn over het algemeen minder goed in sperma die ingevroren en ontdooid werd. De spermatozoa leven minder lang en er zijn minder levende cellen (3,9). Tevens zijn de motiliteit en de vruchtbaarheid minder goed na het ontdooien: glycerol, die vaak gebruikt wordt als cryoprotectans, speelt hier vermoedelijk een rol in (23). Epididymale spermatozoa vertonen vers een betere motiliteit (TM, PM) dan in een ingevroren toestand (27). In een onderzoek van Neuhauser et al. (2013) waren de TM en PM beter in een ontdooid epididymaal staal waar homolog SP aan werd toegevoegd dan in het ejaculaat van dezelfde hengst (1). Het snel invriezen van het sperma waarbij een styrofoam vriesbox met vloeibare stikstof gebruikt

werd, zorgde in een studie van Neuhauser et al. (2014) voor een significant hogere kwantiteit dode spermatozoa (13). Zowel het gebruik van een voorgeprogrammeerde vriesbox als een styrofoam vriesbox leverden een daling in TM en PM op. Na de collectie en het ontdooien van de spermatozoa afkomstig uit de meer craniale delen van de cauda epididymidis werden meer losse koppen gezien (13): een mogelijke verklaring hiervoor is dat men in deze studie de flotatiemethode heeft toegepast op het middelste en craniale gedeelte van de cauda en de retrograde flushing methode op de caudale cauda epididymidis. Door het centrifugeren van het staal na collectie bekomt men een lagere kwantiteit losse koppen. Het gehalte abnormaliteiten in het middenstuk en de staart steeg na het ontdooien. Zeker in het meest caudale gedeelte van de cauda epididymidis werden opgewonden en gebogen staarten waargenomen. Het aantal spermatozoa met protoplasmadruppels daalde echter: dit is vermoedelijk te wijten aan veranderingen in de plasmamembraan, centrifugatie en/of osmotische druk uitgaande van de spermaverdunner.

De densiteit van het chromatine in de zaadcellen wordt groter tijdens de koelfase van het invriesproces (3). Tijdens het invriezen en ontdooien van spermatozoa worden reactieve zuurstofradicalen gevormd, hoofdzakelijk door de mitochondriën (3,11). In een normaal ejaculaat worden de spermatozoa in zekere mate beschermd door scavengers aanwezig in het SP. Epididymale vloeistof bevat echter weinig scavengers en geen SP, wat betekent dat de spermatozoa een hoger risico op oxidatieve beschadiging lopen. Door het koelproces worden minder reactieve radicalen gevormd in vergelijking met het vriesproces (3).

## **8 Het ontdooiproces**

Het ontdooien geschiedt door de rietjes 30 tot 60 s in een warmwaterbad op +37°C te plaatsen. In een studie van Monteiro et al. (2011) werden de stalen 20 sec op +46°C ontdooit (10). De rietjes worden afgedroogd en het spermastaal wordt kwalitatief geëvalueerd. Nadien wordt de hengstige merrie zo snel mogelijk geïnsemineerd. De kwaliteit van geëjaculeerde en epididymale spermatozoa na het ontdooien varieert significant tussen hengsten onderling (13). Er werd in een studie van Neuhauser et al. (2014) een vergelijkbare TM en PM waargenomen voor ontdooide epididymale zaadcellen en ejaculaat (13). In een onderzoek van Neuhauser et al. (2013) werd een daling van de motiliteit vastgesteld na het ontdooiproces (1). Bij het vrijkomen van glycerol kan de zaadcel beschadigd worden. Er worden meer levende dan motiele zaadcellen waargenomen, wat wellicht te wijten is aan mitochondriale schade veroorzaakt door het vries-en ontdooiproces. Na het ontdooien van zaadcellen gecollecteerd uit de epididymis zijn er meer zaadcellen met een integere plasmamembraan in vergelijking met ontdooide zaadcellen afkomstig uit ejaculaat: in een studie van Guimaraes et al. (2012) werd gesuggereerd dat zaadcellen gecollecteerd uit de epididymis beter bestand zijn tegen koude shock (7).

Bij het ontdooien wordt het bevruchtungsvermogen van de levende zaadcellen gecompromitteerd door een grote populatie dode of beschadigde spermatozoa. Men kan de gewenste spermatozoa isoleren door middel van diverse technieken zoals door het maken van een colloïdale bereiding (11).

## 9 De inseminatie en drachtresultaten

Bij de eerste succesvolle dracht die voortkwam uit diepvriessperma werden epididymale spermatozoa gebruikt (25). Het sperma wordt gedeponereerd in de top van de baarmoederhoorn ipsilateraal aan de kant van het ovarium waar de ovulatie plaatsvond. Het insemineren gebeurt door middel van hysteroscopie of door het plaatsen van een inseminatiepipet onder rectale begeleiding. Bij de inseminatie in een uteriene hoorn kan men een lagere dosis progressief motiele spermatozoa gebruiken (24). Ovum pick-up (O.P.U.) in combinatie met intracytoplasmatische sperma-injectie (I.C.S.I.) kan eveneens aangewend worden, zeker indien de motiliteit aan de lage kant is.

De capacitatie en acrosomale reactie van de epididymale spermatozoa lijken in mindere mate tot zelfs helemaal niet door te gaan. Bovendien is de motiliteit over het algemeen vrij laag. Dit verklaart waarom de drachtresultaten na kunstmatige inseminatie met dit type spermatozoa niet optimaal zijn en waarom de ideale inseminatiedosis hoger ligt in vergelijking met geëjaculeerde spermatozoa (3). Drachtresultaten kunnen niet verbeterd worden door louter de dosis te verhogen: de kwaliteit van de spermatozoa is van onontbeerlijk belang. Capacitatie-achtige processen gaan reeds door tijdens het invriezen van sperma: dit wordt cryocapacitatie genoemd. De overlevingsduur van de zaadcellen in de merrie wordt bijgevolg verminderd (3,34). Bij de ram en de stier werd eveneens een lagere *in vivo* vruchtbaarheid waargenomen bij gebruik van epididymale spermatozoa (26). Daarentegen stelden Monteiro et al. (2011) dat de vruchtbaarheid niet significant verschilde met die van geëjaculeerde spermatozoa (9).

In een studie van Vieira et al. (2013) werd een heteroloog I.C.S.I. systeem gehanteerd waarbij 59 bovine oöcyten geïnjecteerd werden met ontdooide equine epididymale spermatozoa (3). Pronucleusvorming was aanwezig bij 15,25% van de oöcyten. Bij *in vitro* fertilisatie (I.V.F.) lag dit gehalte op 8,13% ( $n = 209$  oöcyten): er werd minder oöcyte penetratie gezien in vergelijking met het gebruik van geëjaculeerde spermatozoa. Dit heeft wellicht te maken met het feit dat het capacitatieproces verschillend is. Het capacitatiemedium zorgt voor een variabiliteit tot 40% in de penetratiegraad (3).

In een studie van Morris et al. (2002) werd 18% van de merries drachtig via inseminatie met  $200 \times 10^6$  ontdooide epididymale spermatozoa in de uterotubale junctie via hysteroscopie en 8% werd drachtig bevonden nadat men de merries geïnsemineerd had onder rectale begeleiding (26). Bij het insemineren in de uterotubale junctie met verse spermatozoa aan dezelfde dosis werd 45% drachtig. Bij het gebruik van een lagere dosis ( $5-10 \times 10^6$  ontdooide spermatozoa) waaraan Sperm Talp werd toegevoegd, bekwam men een drachtpercentage van 29%. Ook Papa et al. (2008) bekwamen betere drachtresultaten mits het benutten van Sperm Talp (5). Het al dan niet toevoegen van SP maakte geen significant verschil uit. Een drachtpercentage van 66,6% werd in een onderzoek van Papa et al. (2008) bekomen na inseminatie in de top van de uteriene hoorn met een dosis van  $400 \times 10^6$  spermatozoa (5). Deze spermastalen werden ingevroren in Botu-Crio™.

## BRONNEN

1. Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. 2013. Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility. *Journal of Equine Veterinary Science* 33, 942-949.
2. Roels K, Leemans B., Ververs C., Govaere J., Hoogewijs M., Van Soom A. 2013. Collection and freezing of equine epididymal spermatozoa. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 83, 321-325.
3. Vieira L., Gadea J., Garcia-Vazquez F., Aviles-Lopez K., Matas C. 2013. Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96 h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science* 136, 280-288.
4. Heise A., Thompson P., Gerber D. 2011. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 123, 192-201.
5. Papa F., Melo C., Fioratti E., Dell'Aqua Jr. J., Zahn F., Alvarenga M. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 107, 293-301.
6. Bruemmer J. 2006. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice* 22, 677-682.
7. Guimaraes T., Lopes G., Ferreira P., Leal I., Rocha A. 2012. Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Animal Reproduction Science* 136, 85-89.
8. James A., Green H., Hoffman S., Landry A., Paccamonti D., Godke R. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58, 401-404.
9. Monteiro G., Guasti P., Rocha A., Martin I., Sancler-Silva Y., Dell'Aqua C., Dell'Aqua J., Papa F. 2013. Effect of storage time and temperature of equine epididymis on the viability, motion parameters, and freezability of epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 31, 169-173.
10. Monteiro G., Papa F., Zahn F., Dellaqua Jr., Melo C., Maziero R., Avanzi B., Alvarenga M., Guasti P. 2011. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 127, 197-201.
11. Pena F., Garcia B., Samper J., Aparicio I., Tapia J., Ferrusola C. 2011. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology* 76, 1177-1186.
12. Martinez-Pastor F., Guerra C., Kaabi M., Diaz A., Anel E., Herraes P., De Paz P., Angel L. 2005. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology* 63, 24-40.
13. Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. 2014. Comparison of the effects of four freezing methods on motility characteristics, morphology, and viability of postthaw stallion epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 882-888.
14. Brito L. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6, 249-264.

15. Pesch S., Bergmann M., Bostedt H. 2006. Determination of some enzymes and macro-and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66, 307-313.
16. Mislei B., Merlo B., Asta D., Iacono E., Love C., Mari G. 2016. Effect of two different cooling devices for testicles transport on stallion epididymal sperm quality. *Journal of Equine Veterinary Science* 46, 64-68.
17. Neuhauser S., Dörfel S., Handler J. 2015. Dose-dependent effects of homologous seminal plasma on motility and kinematic characteristics of post-thaw stallion epididymal spermatozoa. *Andrology* 3, 536-543.
18. Monteiro G., Guasti P., Hartwig F., Dellaqua Jr., Alvarenga M., Papa F. 2013. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *The Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 65, 681-686.
19. Cary J., Madill S., Farnsworth K., Hayna J., Duoos L., Fahning M. 2004. A comparison of elektroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Canadian Veterinary Journal* 45, 35-41.
20. Volkmann D., Gerber D., Erb H. 2001. Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 68, 315-365.
21. Tiplady C., Morris L., Allen W. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 58, 225-228.
22. Gloria A., Carluccio A., Petrizzi L., Noto F., Contri A. 2016. Characteristics of frozen epididymal spermatozoa from stallion that died 12 to 36 hours after colic surgery. *Theriogenology* 85, 345-350.
23. Olaciregui M., Gil L., Monton A., Luno V., Jerez R., Marti J. 2014. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* 68, 91-95.
24. Alvarenga M., Papa F., Neto C. 2016. Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice* 32, 521-530.
25. Schulman M. 2003. Effects of halothane anesthesia on the cryopreservation of epididymal spermatozoa in pony stallions. *Equine Veterinary Journal* 35, 93-95.
26. Morris L., Tiplady C., Allen W. 2002. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646.
27. Falomo M., Rossi M., Mantovani R. 2016. Collection, storage and freezability of equine epididymal spermatozoa. *Italian Journal of Animal Science* 15, 386-389.
28. Boersma A., Olszanska O., Walter I., Rülcke T. 2015. Microsurgical ad percutaneous epididymal sperm aspiration for sperm collection from live mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 54, 471-477.
29. Guasti P., Monteiro G., Maziero R., Martin I., Avanzi B., Dellaqua Jr. J., Papa F. 2013. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. *Journal of Equine Veterinary Science* 33, 1153-1156.
30. Knottenbelt D., LeBlanc M., Lopate C., Pascoe R. 2003. *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. Saunders, Elsevier Inc. p. 66-77.
31. Love C. Measurement of concentration and viability in stallion sperm. 2012. *Journal of Equine Veterinary Science* 32, 464-466.



32. Cuervo-Arango J., Nivola K., Katila T. 2014. The effect of storage temperature of equine transported semen on pregnancy rates and spermatozoal quality. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, 91-93.
33. Vidament M., Dupere A., Julienne P., Evain A., Noue P., Palmer E. 1997. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 48, 907-917.
34. Partyka A., Nizanski W., Ochota M. 2012. Current Frontiers in Cryobiology: Methods of assessment of cryopreserved semen. InTech d.o.o., Rijeka, Kroatien. p. 547-574.
35. Melo C., Zahn F., Martin I., Orlandi C., Dell'Aqua J., Avarenga M., Papa F. 2007. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 27, 171-175.

## BIJLAGEN

### BIJLAGE I

De specifieke karakteristieken van de epididymale spermatozoa bekomen via de retrograde flushing methode per hengst zijn in deze bijlage te vinden. De terminologie wordt in bijlage IV geduid.

#### Hengst 1

- Soort castratie: open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: 9 jaar 8 maanden.
- Testikels: *Links* 43,7 gram & 12 cm omtrek. *Rechts* 38,1 gram & 12 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 82L 18D  
Afwijkingen: 56N 34AS 6PPD 4DPD

48 h: L/D: 79L 21D  
Afwijkingen: 54N 40AS 5PPD 1DPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	229,1 miljoen spz/mL (60,4%)	Progressief motiel	23,6 miljoen spz/mL (6,2%)
Mobiel niet-progressief	126,9 miljoen spz/mL (33,4%)	Totaal	379,6 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	7,8	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	64,1
Medium snelheid (%)	3,6	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21,8
Lage snelheid (%)	28,2	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	33,4
Statisch (%)	60,4	LIN (%)	34,0
WOB (%)	52,1	STR (%)	65,3
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,7	BCF (Hz)	8,4

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	96,2 miljoen spz/mL (94,8%)	Progressief motiel	0 miljoen spz/mL (0,0%)
Mobiel niet-progressief	5,3 miljoen spz/mL (5,2%)	Totaal	101,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	2,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	99,4
Medium snelheid (%)	0,0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	16,7
Lage snelheid (%)	3,1	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	47,3
Statisch (%)	94,8	LIN (%)	16,8
WOB (%)	47,6	STR (%)	35,2
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,0	BCF (Hz)	0,0

*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	359,1 miljoen spz/mL (98,1%)	Progressief motiel	0,4 miljoen spz/mL (0,1%)
Mobiel niet-progressief	6,7 miljoen spz/mL (6,7%)	Totaal	366,2 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	1,0	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	31,6
Medium snelheid (%)	0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	10,9
Lage snelheid (%)	1	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	19,5
Statisch (%)	98,1	LIN (%)	34,3
WOB (%)	61,7	STR (%)	55,6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,3	BCF (Hz)	0,2

## Hengst 2

- Soort castratie: open castratie zonder lokale anesthesie.
- Leeftijd: 1 jaar 9 maanden.
- Testikels: *Links* 136,3 gram & 16 cm omtrek. *Rechts* 128 gram & 15 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 91L 9D  
Afwijkingen: 52N 1AK 15AS 32 PPD

24 h: L/D: 92L 8D  
Afwijkingen: 56N 2AK 12AS 30 PPD

### *Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	247,7 miljoen spz/mL (92,3%)	Progressief motiel	1,8 miljoen spz/mL (0,7%)
Mobiel niet-progressief	19,0 miljoen spz/mL (7,1%)	Totaal	268,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	2,9	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	43,1
Medium snelheid (%)	0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	13,8
Lage snelheid (%)	4,9	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	23,4
Statisch (%)	92,3	LIN (%)	32,1
WOB (%)	54,4	STR (%)	59,0
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,9	BCF (Hz)	1,3

### *Spermatozoa gewonnen op 0 h na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	234,7 miljoen spz/mL (59,6%)	Progressief motiel	27,8 miljoen spz/mL (7,1%)
Mobiel niet-progressief	131,4 miljoen spz/mL (33,4%)	Totaal	393,9 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	11,4	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	54,4
Medium snelheid (%)	2,3	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	17,4
Lage snelheid (%)	26,7	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	26,5
Statisch (%)	59,6	LIN (%)	32,0
WOB (%)	48,6	STR (%)	65,9
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,5	BCF (Hz)	5,8

### *Testikel verwerkt na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	185,0 miljoen spz/mL (84,0%)	Progressief motiel	4,9 miljoen spz/mL (2,2%)
Mobiel niet-progressief	30,3 miljoen spz/mL (13,8%)	Totaal	220,2 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	4,6	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	73,3
Medium snelheid (%)	1,4	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21,7
Lage snelheid (%)	9,9	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	33,6
Statisch (%)	84,0	LIN (%)	29,6
WOB (%)	45,8	STR (%)	64,6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,1	BCF (Hz)	6,8

### Hengst 3

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: 2 jaar 11 maanden.
- Testikels: *Links* 155 gram & 17 cm omtrek. *Rechts* 143,5 gram & 16 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 96 L 4 D  
Afwijkingen: 54 N 2 AS 24 PPD 2 DPD

48 h: L/D: 98 L 2D .  
Afwijkingen: 68 N 16 AS 9 PPD 7 DPD

#### *Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	208,3 miljoen spz/mL (82,0%)	Progressief motiel	4,2 miljoen spz/mL (1,7%)
Mobiel niet-progressief	41,6 miljoen spz/mL (16,4%)	Totaal	254,1 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	4,6	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	57,4
Medium snelheid (%)	1,5	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	18,5
Lage snelheid (%)	11,9	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	26,9
Statisch (%)	82,0	LIN (%)	32,2
WOB (%)	47,0	STR (%)	68,5
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,1	BCF (Hz)	8,5

#### *Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	155,1 miljoen spz/mL (86,4%)	Progressief motiel	3,2 miljoen spz/mL (1,8%)
Mobiel niet-progressief	21,1 miljoen spz/mL (11,8%)	Totaal	179,4 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	3,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	73,7
Medium snelheid (%)	1,0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21,6
Lage snelheid (%)	9,4	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	33,1
Statisch (%)	86,4	LIN (%)	29,4
WOB (%)	44,9	STR (%)	65,4
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,8	BCF (Hz)	6,9

#### *Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	215,5 miljoen spz/mL (82,5%)	Progressief motiel	2,8 miljoen spz/mL (1,1%)
Mobiel niet-progressief	42,3 miljoen spz/mL (16,4%)	Totaal	260,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	7,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	61,8
Medium snelheid (%)	0,4	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	15,8
Lage snelheid (%)	10,0	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	28,3
Statisch (%)	82,5	LIN (%)	25,6
WOB (%)	45,8	STR (%)	56,0
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,8	BCF (Hz)	1,0

#### **Hengst 4**

- Soort castratie: Gesloten castratie zonder lokale verdoving.
- Leeftijd: 5 jaar.
- Testikels: *Links* 228,5 gram & 19 cm omtrek. *Rechts* 243,3 gram & 20 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 93L 7D  
Afwijkingen: 75N 13AS 12PPD

24 h: L/D: 89L 11D  
Afwijkingen: 55N 1AK 24AS 14PPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	269,6 miljoen spz/mL (73,5%)	Progressief motiel	25,0 miljoen spz/mL (6,8%)
Mobiel niet-progressief	72,2 miljoen spz/mL (19,7%)	Totaal	366,8 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	10,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	60,5
Medium snelheid (%)	2,9	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	22,7
Lage snelheid (%)	13,5	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	29,8
Statisch (%)	73,5	LIN (%)	37,6
WOB (%)	49,3	STR (%)	76,2
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,3	BCF (Hz)	7,3

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	176,6 miljoen spz/mL (49,9%)	Progressief motiel	29,6 miljoen spz/mL (8,4%)
Mobiel niet-progressief	148,0 miljoen spz/mL (41,8%)	Totaal	354,2 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	23,6	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	41,4
Medium snelheid (%)	3,4	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	16,3
Lage snelheid (%)	23,2	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	22,9
Statisch (%)	49,9	LIN (%)	39,3
WOB (%)	55,2	STR (%)	71,1
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,8	BCF (Hz)	8,3

*Testikel verwerkt na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	379,9 miljoen spz/mL (91,3%)	Progressief motiel	4,2 miljoen spz/mL (1,0%)
Mobiel niet-progressief	32,1 miljoen spz/mL (7,7%)	Totaal	416,2 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	3,8	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	34,7
Medium snelheid (%)	0,3	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	15,0
Lage snelheid (%)	4,7	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	21,0
Statisch (%)	91,3	LIN (%)	43,3
WOB (%)	60,4 (%)	STR (%)	71,6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	1,7	BCF (Hz)	3,4

### Hengst 5

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: Onbekend.
- Testikels: *Links* 12,8 gram & 9 cm omtrek. *Rechts* 13,2 gram & 9 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 15 L 4 D (te weinig spermatozoa op het preparaat)

Afwijkingen: /

24h ingevroren: L/D: 95 L 5 D

Afwijkingen: 70 N 10 AS 13 PPD 7 DPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	19,1 miljoen spz/mL (66,5%)	Progressief motiel	4,4 miljoen spz/mL (15,2%)
Mobiel niet-progressief	5,3 miljoen spz/mL (18,3%)	Totaal	28,8 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	5,2	VCL (µm/s)	77
Medium snelheid (%)	14,3	VSL (µm/s)	38,6
Lage snelheid (%)	14	VAP (µm/s)	43,8
Statisch (%)	66,5	LIN (%)	50,2
WOB (%)	59,6	STR (%)	88,1
ALH (µm)	3,2	BCF (Hz)	12,3

*Testikel verwerkt na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	14,0 miljoen spz/mL (83%)	Progressief motiel	0,69 miljoen spz/mL (4,1%)
Mobiel niet-progressief	2,18 miljoen spz/mL (12,9 %)	Totaal	16,9 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	4,4	VCL (µm/s)	62,6
Medium snelheid (%)	3,3	VSL (µm/s)	27
Lage snelheid (%)	9,3	VAP (µm/s)	33,4
Statisch (%)	83	LIN (%)	43,2
WOB (%)	53,3	STR (%)	81
ALH (µm)	3,1	BCF (Hz)	9,8

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h) en de spermatozoa werden ingevroren na analyse.*

Statisch	57,9 miljoen spz/mL (70,0%)	Progressief motiel	6,7 miljoen spz/mL (8,3%)
Mobiel niet-progressief	16,9 miljoen spz/mL (20,8%)	Totaal	81,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	8,7	VCL (µm/s)	70,8
Medium snelheid (%)	7,1	VSL (µm/s)	35,1
Lage snelheid (%)	13,2	VAP (µm/s)	40,4
Statisch (%)	71,0	LIN (%)	49,6
WOB (%)	57,1	STR (%)	86,8
ALH (µm)	3,2	BCF (Hz)	10,2

## Hengst 6

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: 1 jaar 11 maanden.
- Testikels: *Links* 185,7 gram & 17 cm omtrek. *Rechts* 222,7 gram & 22 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 93 L 7 D  
Afwijkingen: 62 N 1 AK 28 AS 8 PPD 1 DPD

0 h ingevroren: L/D: 92 L 8 D  
Afwijkingen: 67 N 1 AK 31 AS 1 PPD

48 h: L/D: 100 L 0 D  
Afwijkingen: 49N, 40 AS, 9 PPD, 2 DPD

48 h ingevroren: L/D: 99 L 1 D  
Afwijkingen: 51 N 35 AS 12 PPD

### *Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	331,3 miljoen spz/mL (60,3%)	Progressief motiel	42,6 miljoen spz/mL (7,8%)
Mobiel niet-progressief	175,5 miljoen spz/mL (31,9%)	Totaal	549,4 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	17,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	60,4
Medium snelheid (%)	3,3	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	19,4
Lage snelheid (%)	19,2	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	30,3
Statisch (%)	60,3	LIN (%)	32,0
WOB (%)	50,2	STR (%)	63,8
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,4	BCF (Hz)	5,4

### *Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h) en de spermatozoa werden ingevroren na analyse.*

Statisch	135,7 miljoen spz/mL (98,3%)	Progressief motiel	0,2 miljoen spz/mL (0,1%)
Mobiel niet-progressief	2,1 miljoen spz/mL (1,5%)	Totaal	138,0 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	0,7	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	25,9
Medium snelheid (%)	0,0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	12,2
Lage snelheid (%)	1,0	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	15,7
Statisch (%)	98,3	LIN (%)	47,0
WOB (%)	60,8	STR (%)	77,4
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,2	BCF (Hz)	0,2

### *Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	401,2 miljoen spz/mL (87,5%)	Progressief motiel	4,2 miljoen spz/mL (0,9%)
Mobiel niet-progressief	53,1 miljoen spz/mL (11,6%)	Totaal	458,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	3,6	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	63,7
Medium snelheid (%)	0,7	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	17,7
Lage snelheid (%)	8,3	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	32,4
Statisch (%)	87,5	LIN (%)	27,7
WOB (%)	50,9	STR (%)	54,5
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,7	BCF (Hz)	3,0

*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C en spermatozoa ingevroren na analyse.*

Statisch	536,7 miljoen spz/mL (96,1%)	Progressief motiel	2,3 miljoen spz/mL (0,4%)
Mobiel niet-progressief	19,2 miljoen spz/mL (3,4%)	Totaal	558,2 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	2,2	VCL (µm/s)	26,0
Medium snelheid (%)	0,0	VSL (µm/s)	11,5
Lage snelheid (%)	1,7	VAP (µm/s)	15,5
Statisch (%)	96,1	LIN (%)	44,0
WOB (%)	59,4	STR (%)	74,1
ALH (µm)	1,1	BCF (Hz)	1,2

### **Hengst 7**

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: 5 jaar 7 maanden.
- Testikels: *Links* 454 gram & 20 cm omtrek. *Rechts* 405,4 gram & 22 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 99 L 1 D

Afwijkingen: 89 N 2 AK 5 AS 3 PPD 1 DPD

0 h ingevroren: L/D: 96 L 4 D

Afwijkingen: 77 N 2 AK 3 AS 8 PPD 10 DPP

48 h: L/D: 99 L 1 D

Afwijkingen: 89 N 1 AK 3 AS 6 PPD 1 DPD

48 h ingevroren: L/D: 99 L 1 D

Afwijkingen: 89 N 2 AK 3 AS 4 PPD 2 DPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	350,8 miljoen spz/mL (33,0%)	Progressief motiel	124,9 miljoen spz/mL (11,8%)
Mobiel niet-progressief	585,9 miljoen spz/mL (55,2%)	Totaal	1061,7 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	13,2	VCL (µm/s)	94,8
Medium snelheid (%)	12,0	VSL (µm/s)	27,1
Lage snelheid (%)	41,8	VAP (µm/s)	40,2
Statisch (%)	33,0	LIN (%)	28,6
WOB (%)	42,4	STR (%)	67,5
ALH (µm)	4,8	BCF (Hz)	7,9

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h) en de spermatozoa werden ingevroren na analyse.*

Statisch	208,8 miljoen spz/mL (96,0%)	Progressief motiel	0,6 miljoen spz/mL (0,3%)
Mobiel niet-progressief	8,1 miljoen spz/mL (3,7%)	Totaal	217,4 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	2,1	VCL (µm/s)	33,7
Medium snelheid (%)	0,0	VSL (µm/s)	13,4
Lage snelheid (%)	1,9	VAP (µm/s)	21,4
Statisch (%)	96,0	LIN (%)	39,8
WOB (%)	63,5	STR (%)	62,6
ALH (µm)	0,2	BCF (Hz)	0,3



*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	543,7 miljoen spz/mL (79,9%)	Progressief motiel	15,65 miljoen spz/mL (2,3%)
Mobiel niet-progressief	121,1 miljoen spz/mL (17,8%)	Totaal	680,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	5,7	VCL (µm/s)	72,6
Medium snelheid (%)	1,7	VSL (µm/s)	21,4
Lage snelheid (%)	12,7	VAP (µm/s)	73,2
Statisch (%)	79,9	LIN (%)	29,5
WOB (%)	45,7	STR (%)	64,4
ALH (µm)	4,1	BCF (Hz)	5,7

*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C en spermatozoa ingevroren na analyse.*

Statisch	171,1 miljoen spz/mL (93,3%)	Progressief motiel	1,7 miljoen spz/mL (0,9%)
Mobiel niet-progressief	10,6 miljoen spz/mL (5,8%)	Totaal	183,4 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	3,1	VCL (µm/s)	49,8
Medium snelheid (%)	0,4	VSL (µm/s)	15,8
Lage snelheid (%)	3,1	VAP (µm/s)	23,9
Statisch (%)	93,3	LIN (%)	31,8
WOB (%)	47,9	STR (%)	66,3
ALH (µm)	2,7	BCF (Hz)	5,8

### **Hengst 8**

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
- Leeftijd: 12 jaar 11 maanden.
- Testikels: *Links* 217,6 gram & 18 cm omtrek. *Rechts* 197,7 gram & 16 cm omtrek.
- Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:

0 h: L/D: 97 L 3 D  
Afwijkingen: 67 N 23 AS 9 PPD 1 DPD

0 h ingevroren: L/D: 94 L 6 D  
Afwijkingen: 30 N 1 AK 56 AS 11 PPD 2 DPD

48 h: L/D: 99 L 1 D  
Afwijkingen: 74 N 24 AS 2 PPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	305,2 miljoen spz/mL (97,5%)	Progressief motiel	1,4 miljoen spz/mL (0,5%)
Mobiel niet-progressief	6,3 miljoen spz/mL (2,0%)	Totaal	312,9 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	1,4	VCL (µm/s)	29,2
Medium snelheid (%)	0,0	VSL (µm/s)	11,5
Lage snelheid (%)	1,1	VAP (µm/s)	17,3
Statisch (%)	97,5	LIN (%)	39,2
WOB (%)	59,3	STR (%)	66,0
ALH (µm)	0,8	BCF (Hz)	0,7

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	453,2 miljoen spz/mL (74,9%)	Progressief motiel	10,6 miljoen spz/mL (1,7%)
Mobiel niet-progressief	141,3 miljoen spz/mL (23,4%)	Totaal	605,1 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	8,0	VCL (µm/s)	77,9
Medium snelheid (%)	1,9	VSL (µm/s)	18,7
Lage snelheid (%)	15,3	VAP (µm/s)	37,7
Statisch (%)	74,9	LIN (%)	24,0
WOB (%)	48,4	STR (%)	49,6
ALH (µm)	2,9	BCF (Hz)	3,8

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C en ingevroren na analyse.*

Statisch	25,6 miljoen spz/mL (83,1%)	Progressief motiel	0,4 miljoen spz/mL (1,3%)
Mobiel niet-progressief	4,8 miljoen spz/mL (15,6%)	Totaal	30,8 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	3,1	VCL (µm/s)	98,7
Medium snelheid (%)	1,3	VSL (µm/s)	22,5
Lage snelheid (%)	12,5	VAP (µm/s)	49,7
Statisch (%)	83,1	LIN (%)	22,8
WOB (%)	50,4	STR (%)	45,3
ALH (µm)	0,7	BCF (Hz)	3,8

*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	311,5 miljoen spz/mL (94,5%)	Progressief motiel	1,4 miljoen spz/mL (0,4%)
Mobiel niet-progressief	16,6 miljoen spz/mL (5,0%)	Totaal	329,5 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	2,4	VCL (µm/s)	37,2
Medium snelheid (%)	0,1	VSL (µm/s)	14,2
Lage snelheid (%)	3,0	VAP (µm/s)	22,6
Statisch (%)	94,5	LIN (%)	38,1
WOB (%)	60,8	STR (%)	62,7
ALH (µm)	0,6	BCF (Hz)	0,7

**Hengst 9**

- Soort castratie: Open castratie met lokale verdoving.
  - Leeftijd: 4 jaar 4 maanden.
  - Testikels: *Links* 75,8 gram & 10 cm omtrek. *Rechts* 105,1 gram & 12 cm omtrek.
  - Morfologische preparaten en motiliteitskenmerken:
- 0 h: L/D: 99 L 1 D  
Afwijkingen: 69 N 13 AS 2 PPD 12 DPD
- 0 h ingevroren: L/D: 89 L 11 D  
Afwijkingen: 48N 4 AK 33 AS 2 PPD 13 DPD
- 48 h: L/D: 95L 5 D  
Afwijkingen: 68 N 10 AS 3 PPD 19 DPD

*Testikel onmiddellijk na castratie verwerkt (0 h).*

Statisch	270,7 miljoen spz/mL (84,1%)	Progressief motiel	6,7 miljoen spz/mL (2,1%)
Mobiel niet-progressief	44,4 miljoen spz/mL (13,8%)	Totaal	321,4 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	4,3	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	94,5
Medium snelheid (%)	2,0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	21,6
Lage snelheid (%)	9,6	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	42,2
Statisch (%)	84,1	LIN (%)	22,9
WOB (%)	44,7	STR (%)	51,3
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,1	BCF (Hz)	3,9

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C.*

Statisch	238,6 miljoen spz/mL (59,6%)	Progressief motiel	21,8 miljoen spz/mL (5,5%)
Mobiel niet-progressief	139,9 miljoen spz/mL (34,9%)	Totaal	400,3 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	11,1	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	99,2
Medium snelheid (%)	5,4	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	24,1
Lage snelheid (%)	23,9	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	45,0
Statisch (%)	59,6	LIN (%)	24,4
WOB (%)	45,4	STR (%)	53,6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	4,1	BCF (Hz)	6,1

*Spermatozoa gewonnen op 0 h na 24 h koeling op 5°C en ingevroren na analyse.*

Statisch	31,5 miljoen spz/mL (72,9%)	Progressief motiel	5,0 miljoen spz/mL (11,6%)
Mobiel niet-progressief	6,7 miljoen spz/mL (15,6%)	Totaal	43,3 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	9,3	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	82,3
Medium snelheid (%)	8,0	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	29,0
Lage snelheid (%)	9,8	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	46,3
Statisch (%)	72,9	LIN (%)	35,2
WOB (%)	56,3	STR (%)	62,6
ALH ( $\mu\text{m}$ )	2,5	BCF (Hz)	7,9

*Testikel verwerkt na 48 h koeling op 5°C.*

Statisch	246,3 miljoen spz/mL (71,6%)	Progressief motiel	21,8 miljoen spz/mL (6,4%)
Mobiel niet-progressief	75,8 miljoen spz/mL (22,0%)	Totaal	344,0 miljoen spz/mL
Snelle snelheid (%)	6,8	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	93,8
Medium snelheid (%)	6,3	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	25,9
Lage snelheid (%)	15,4	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	43,9
Statisch (%)	71,6	LIN (%)	27,6
WOB (%)	46,8	STR (%)	58,9
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3,9	BCF (Hz)	8,8

## BIJLAGE II

Het protocol voor open castratie met gebruik van lokale intratesticulaire anesthesie.

<b>Open castratie met lokale anesthesie</b>
1. Het paard wordt bij het induceren op zijn linkerzijde geduwd. Vervolgens bindt men de onderliggende benen en het bovenliggende voorbeen samen met boeien en een musketon. Het bovenliggende achterbeen wordt naar voren en boven getrokken met een dik touw: dit biedt een overzichtelijk operatieveld.
2. De huid op en rond het scrotum wordt geschrubd met chloorhexidine en ontsmet met 70% ethylalcohol. Men dient 10 mL lokale anesthesie (procaïne) per testis toe in de beide testikels. Eventueel kan 5 mL subcutaan worden geïnjecteerd.
3. Het operatieveld wordt afgeschermd door middel van een steriele operatiedoek die bevestigd wordt met doekklemmen.
4. Een incisie van 8-10 cm wordt op 1,5 cm van de raphe in de scrotale huid gemaakt. Het onderhuids bindweefsel (tunica dartos) wordt vrij geprepareerd met een bistourimes n° 24 (Swann-Morton®, Sheffield, Verenigd Koninkrijk) of met een weefselschaar. De testikel wordt uit de huid gestulpt. Bij voorkeur orchiëctomiseert men met de onderliggende testikel eerst zodanig dat de castratietang niet in de weg zit bij het prepareren van de tweede testikel.
5. De tunica vaginalis wordt craniaal ingesneden. De testikel wordt langs onderen gegrepen waarbij druk wordt uitgeoefend zodat de testikel tevoorschijn komt. De tunica vaginalis kan gefixeerd worden door de wijsvinger te steken in het 'vingerhoedje' gevormd door het omgeklapte distale uiteinde. Een kocher klem kan de tunica fixeren als blijkt dat de vingers van de chirurg de tunica onmogelijk kunnen fixeren. De zaadstreng blijft bedekt door deze tunica.
6. Het losmazig weefsel bovenop de tunica vaginalis wordt omhoog gestroopt zodat de zaadstreng zo goed mogelijk gekneusd wordt.
7. De Zandse tang wordt op de tunica vaginalis geplaatst en zo hard mogelijk aangespannen. Deze tang kneust het weefsel waardoor de vascularisatie onderbroken wordt. Deze spanning dient enkele minuten aangehouden te worden. In tussentijd kan men stappen 4 tot 7 toepassen op de bovenliggende testikel.
8. Na 5 minuten wordt de tang gelost. Een resorbeerbare ligatuur (Novosyn® 2/0, B.Braun Medical N.V., Diegem, België ) wordt geplaatst op de plaats van de kneuzing. Ongeveer 2 cm distaal van de kneuzing wordt de bedekte zaadstreng doorgesneden met een bistourimes n°24. Er dient gecontroleerd te worden op een eventuele bloeding: als deze afwezig is, mag men het fingerhoedje loslaten. De castratiewonde mag nadien even druppelsgewijs bloeden. Indien het bloed uit het scrotum stroomt, dient men het oorzakelijke bloedvat op te zoeken en te ligeren. Het scrotum kan ook opgetamponneerd worden met een steriele handdoek om tegendruk te geven.

De gebruikte medicatie bij een open castratie met lokale anesthesie in de recoverybox.

Tijdslijn	Medicatie	Dosering
Vóór het inbrengen van de katheter (sedatie)	Romifidine Flunixin meglumine Natrium-penicilline	80 µg/kg 1,1 mg/kg 20 000 I.U./kg
Premedicatie	Romifidine Morfine	80 µg/kg 0,1 mg/kg
Inductie	Ketamine Diazepam	2,2 mg/kg 0,06 mg/kg
Tijdens de ingreep	Triple drip  Lokale anesthesie (procaïne) Anti-tetanusserum Penicilline	20 mL ketamine, 250 mL 0,9% NaCl oplossing en 250 mL guaiafenesine  10 mL 3 mL 5 mL/100 kg

Bijkomende informatie over de gebruikte medicatie.

Actieve stof	Productkenmerken
Romifidine	Sedivet®, 10 mg/mL, SCS Boehringer Ingelheim Comm.V., Brussel, België.
Flunixin meglumine	Emdofluxine®, 82,97 mg/mL, Ecuphar N.V., Oostkamp, België.
Na-penicilline	Penicilline 5.000.000 I.E.®, Kela Farma N.V., Sint-Niklaas, België.
Morfine	Morfine HCl STEROP®, 10 mg/mL, Laboratoria Sterop, Brussel, België.
Ketamine	Ketamidor®, 100 mg/mL, Ecuphar N.V., Oostkamp, België.
Diazepam	Ziapam®, 5 mg/mL, Laboratoire TVM, Lempdes, Frankrijk.
Procaïne	Procaïne hydrochloride®, 40 mg/mL, V.M.D. nc, Arendonk, België.
Anti-tetanusserum	Anti-tetanusserum®, 1,16 I.U./mL, MSD Animal Health BVBA, Brussel, België.
Guaiafenesine	Myorelax®, 100 mg/mL, Eurovet N.V./S.A., Heusden-Zolder, België.
Penicilline	Duphaphen®, 300 mg/mL procaïnebenzylpenicilline, Zoetis Belgium s.a., Louvain-La-Neuve, België.

### BIJLAGE III

De spermatozoa werden met een controlled rate freezer ingevroren gebruik makende van het onderstaande protocol.

Invriesprotocol
1. Het spermastaal wordt 30-60 minuten in een pot lauw water gezet in de koelkast op 5°C. Vervolgens wordt het staal afgedroogd en wordt de verdunde inhoud in rietjes verpakt.
2. Vervolgens wordt het staal ingevroren tot -140°C aan een snelheid van -40 tot -60°C/min.
3. De rietjes worden vervolgens ondergedompeld in vloeibare stikstof (-196°C).
4. De rietjes worden naar een stikstofcontainer overgebracht.

## BIJLAGE IV

Een lijst waarin de diverse afkortingen die gehanteerd worden bij het spermaonderzoek nader verklaard worden.

Afkorting	Betekenis
PMI (%)	De integriteit van de plasmamembraan.
TM (%)	De totale motiliteit geeft het percentage zaadcellen weer die beweegt.
PM (%)	Het percentage zaadcellen die progressieve motiliteit vertoont.
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	De 'average path velocity' geeft de gemiddelde snelheid op het traject weer.
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	De 'straight-line velocity' is de snelheid gemeten op de rechte lijn getrokken van het beginpunt naar het eindpunt.
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	De snelheid op het werkelijke traject wordt weergegeven door 'curvilinear velocity'.
DAP ( $\mu\text{m}$ )	De 'distance average path' is de gemiddelde afstand die de zaadcel aflegt.
DCL ( $\mu\text{m}$ )	De 'distance curved line' is de werkelijke afstand die de zaadcel aflegt.
DSL ( $\mu\text{m}$ )	De 'distance straight line' is de afstand die de zaadcel aflegt gemeten op de rechte lijn getrokken van het beginpunt naar het eindpunt.
STR (%)	De 'straightness' wordt berekend door de VCL te delen door de VAP.
LIN (%)	De 'linearity' wordt berekend door de VSL te delen door de VCL.
WOB (%)	De 'wobble' is de oscillatie index van de zaadcel. Dit geeft de relatie weer tussen de VAP en VCL.
ALH ( $\mu\text{m}$ )	De 'amplitude of lateral head displacement' geeft de breedte van de oscillatie van de kop weer.
BCF (Hz)	De 'beat cross frequency' geeft weer hoe vaak de zaadcelkop heen en weer beweegt op het traject.
RAP (%)	De subpopulatie zaadcellen die zich met een hoge snelheid voortbewegen.
L/D	Het aantal levende en dode spermatozoa op 100 zaadcellen.
N	Het aantal normale spermatozoa op 100 levende zaadcellen.
AK	Het aantal spermatozoa met abnormale koppen op 100 levende spermatozoa.
AS	Het aantal spermatozoa met staartdefecten op 100 levende spermatozoa.
PPD	Het aantal spermatozoa met proximale protoplasma druppels op 100 levende spermatozoa.
DPD	Het aantal spermatozoa met distale protoplasma druppels op 100 levende spermatozoa.