

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014 - 2015

Standaardisatie van spermacollectie en spermabeoordeling bij hertachtigen

door

Jonas Spruyt

Promotor: Cyriel Ververs, DVM

Copromotor: Stijn Schauvliege, DVM

Onderzoek in het kader
van de Masterproef II

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 2014 - 2015

Standaardisatie van spermacollectie en spermabeoordeling bij hertachtigen

door

Jonas Spruyt

Promotor: Cyriel Ververs, DVM

Copromotor: Stijn Schauvliege, DVM

Onderzoek in het kader
van de Masterproef II

VOORWOORD

Een masterproef produceren is een hele uitdaging die ik met stijgend animo heb volbracht.

Ik dank in de eerste plaats mijn promotor Cyriel Ververs, voor zijn inspirerende coaching 'in en naast het veld'. Niet alleen begeleidde hij mij doorheen theorie en literatuur naar de praktijk van het verdovingsgeweer en de elektro-ejaculatie, hij wekte ook mijn interesse voor Afrikaanse antilopen en voor fertiliteitsonderzoek.

Bij mijn copromotor Stijn Schauvliege kon ik terecht voor het complexe thema van de anesthesie. Ik dank hem voor de snelle lezing en de efficiënte feedback op dit onderdeel van de masterproef.

Ik dank Bart Leemans voor zijn 'fluorescente' bijdrage in de analyse van mijn onderzoeksgegevens. Hij hielp me op weg om spermastalen te bestuderen door er computeranalyse op toe te passen en de gegevens statistisch en grafisch te bewerken. Ik kon met elke vraag daarover bij hem terecht.

Tot slot dank ik ook mijn thuisbasis voor het geduld en voor de eerste hulp bij digitale en tekstuele ongevallen...

INHOUD

Samenvatting en trefwoorden	1
Inleiding en probleemstelling	2
Literatuurstudie	5
1 INLEIDING	5
2 REPRODUCTIEBIOLOGIE EN SEIZOENSINVLOEDEN	6
3 SPERMA- AFNAMEPROTOCOL	11
3.1 Verdoving: sedatie en anesthesie	11
3.2 SPERMACOLLECTIE	29
3.3 SPERMABEWARING: VERDUNNEN EN INVRIEZEN	32
4 SPERMA BEOORDELING	41
4.1 MACROSCOPISCH SPERMAONDERZOEK	41
4.2 MICROSCOPISCH SPERMAONDERZOEK	42
4.3 BIOCHEMISCH ONDERZOEK	48
4.4 BACTERIOLOGISCH, MYCOLOGISCH EN VIROLOGISCH ONDERZOEK	49
5 INSEMINATIE	50
Onderzoek	53
1 INLEIDING - DOELSTELLING	53
2 MATERIAAL EN METHODEN	54
2.1 VERDUNNERS EN PRODUCTEN	54
2.2 DIEREN EN ELEKTRO-EJACULATIE	54
2.3 SPERMAVERWERKING EN KWALITEITSBEOORDELING	55
2.4 INSTELLINGEN CASA EN BIJKOMENDE FLUORESCENT-GEBASEERDE ANALYSE	57
3 Resultaten	58
3.1 DIEREN EN ELEKTRO-EJACULATIE	58
3.2 MACROSCOPISCHE SPERMABEOORDELING EN CONCENTRATIE	59
3.3 EVALUATIE VAN SPERMAKWALITEIT PARAMETERS	60
Discussie	66
Bijlagen	66
Referenties	77

SAMENVATTING EN TREFWOORDEN

Geen enkel taxon uit de familie van de Cervidae kan worden beschouwd als typisch voor “het hert” in het algemeen. Hertachtigen leven in verschillende habitatten en de kennis over de reproductiebiologie van mannelijke dieren vertoont duidelijke hiaten voor Cervidae en nog meer voor *Afrikaanse antilopeachtigen*. Verschillende factoren hebben de afgelopen decennia geleid tot een toegenomen belangstelling in de academische wereld voor de reproductie en de fertiliteit bij deze dieren.

Sperma-afname gebeurt bij herten meestal via elektro-ejaculatie (EE) of via postmortale (PM) collectie. Ook bij *Afrikaanse antilopeachtigen* zijn EE en PM-collectie gebruikelijk. De chemische immobilisatie die vereist is voor sperma-afname via EE brengt risico's met zich mee. Het ideale anestheticum bestaat niet, maar in de hertenhouderij is xylazine het meest aangewende preparaat. Bij *Afrikaanse antilopeachtigen* gebruikt men opioïden, aangevuld met azaperone. Het bewaren van sperma is een kritieke stap voor *assisted reproductive technologies* (ART) en ook voor het aanleggen van spermabanken. Het fertiele karakter van de zaadcellen moet doorheen het bewaringsproces behouden blijven. De meeste verdunners die succesvol gebruikt kunnen worden bij herten zijn afgeleiden van suiker-gebaseerde tris en/of citraat-gebufferde verdunners, waaraan eidozier tegen koude-shock en glycerol als cryoprotectans worden toegevoegd.

In het onderzoek voor deze masterproef werd een sperma-afnameprotocol toegepast op damherten en een sikahert, met het doel een standaardprocedure voor afname en kwaliteitsbeoordeling van hertensperma uit te testen die ook in praktijkomstandigheden kan worden uitgevoerd. Sperma werd afgenomen via EE en bewaard in 4 verschillende verdunners: Inra 96, Botubof, Gebo en Gent. Het ejaculaat werd onderzocht op 0uur, 24uur en 48uur na collectie. Voor het eerst bij het damhert, werd CASA-analyse en fluorescente kleuring met JC-1, SYBR14-PI/PNA-FITC uitgevoerd om via deze manier kwaliteitsparameters te bepalen. De concentratie van het damhertensperma, bepaald met het CASA-systeem, verschilde sterk van verdunner tot verdunner. Er kwamen vooral kleine morfologische afwijkingen voor en er waren duidelijke individuele verschillen voor wat betreft levend/dood verhouding van spermatozoa. Gemiddeld $\geq 75\%$ van de spermatozoa had een intact acrosoom, $\geq 80\%$ had een intacte membraanpotentiaal en 50% bezat een aeroob metabolisme. De CASA-analyse voor spermamotiliteit is objectief, geautomatiseerd en correcter dan de traditionele schattingsmethode. Er werd een algemene trend vastgesteld: TM, PM en VAP verminderden doorheen de tijd in alle geteste verdunners; Gebo bewaarde de motiliteit het best. Hyperactiviteit van de zaadcellen kon visueel duidelijk gezien worden in alle verdunners maar vooral in Gebo. Dit reflecteerde in gestegen VCL- en ALH- en in gedaalde LIN- en STR-waarden. Het sikahertensperma in de Botubof verdunner had een slechte motiliteit die ook niet goed bewaard bleef.

Dit onderzoek zet aan tot verdere studie over de correlatie van CASA-parameters en vruchtbaarheid van damhertensperma. Om na te gaan of een standaardprocedure voor spermaonderzoek ook voor *Afrikaanse antilopeachtigen* opgaat, werden literatuurgegevens over deze diersoorten vergeleken. Onderzoek van een groter aantal dieren, metingen en replicaties is van belang om onderbouwde conclusies te kunnen trekken. Geoptimaliseerde bewaringsprotocollen zijn absoluut vereist voor ART.

Sleutelwoorden: Afrikaanse antilopeachtigen – Anesthesie – Herten - Sperma-Analyse - Spermabewaring

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Hertenvlees wordt al sinds de oudheid door de mens geconsumeerd, zelfs al langer dan rund- en varkensvlees. Men heeft dit kunnen aantonen aan de hand van hertenbotten in prehistorische vondsten en op basis van datering van muurschilderingen. De eerste commerciële hertenkwekerij werd echter pas relatief recent opgestart in Schotland in 1971. In het begin van de jaren zeventig groeide Nieuw-Zeeland uit tot wereldleider in de productie van hertenvlees met 1,6 miljoen hinden. Ongeveer 80% van de vleesproducten werd uitgevoerd naar Europa. Ook in Rusland wordt er veel hertenvlees geproduceerd en verhandeld op verschillende afzetmarkten over de hele wereld. In Europa zijn er bij benadering 10.000 professionele hertenkwekerijen met naar schatting 194.000 hinden, waarvan 65% edelherten (*Cervus elaphus*) en 30% damherten (*Dama dama*). De hertenkwekerij kent dus een mondiaal karakter.

In België zijn er weinig professionele hertenhouders, er zijn slechts ongeveer 1400 Sanitel beslagnummers in omloop. De laatste jaren neemt het aantal kwekers en investeerders wel toe. Zij willen inspelen op een maatschappelijke trend. Een steeds grotere groep mensen is namelijk bereid om meer te betalen voor gezonde, smaakvolle of exclusieve voedingsproducten. Hertenvlees is mager en heeft geen vet nodig om smaak te krijgen. Het vlees bevat veel ijzer en de hoeveelheid cholesterol-verhogende verzadigde vetzuren is zeer laag (Robb en Bethge, 2001). Het kan dus in een gevarieerde dagelijkse voeding als een gezond alternatief worden aangewend voor bijvoorbeeld rundvlees, dat meer verzadigde vetten bevat. Een bijkomend voordeel aan de hertenkwekerij is het feit dat herten, met name damherten en edelherten, niet aangifteplichtig zijn voor de mestbank. Veehouders die omwille van het nutriënten- en bijhorend emissiegehalte hun veestapel niet meer kunnen uitbreiden, kunnen dus wel nog herten houden zonder gevaar te lopen voor superheffingen.

Aangezien de hertensector een op financieel vlak relatief kwetsbare sector is en er zeker zowel nationaal als internationaal nog uitbreidingsmogelijkheden zijn, lijkt het nuttig om de reproductie van de dieren te optimaliseren. Goed verervende en fertiele dieren moeten onderscheiden worden van minder goede, zeker als het fokdieren betreft. In het kader van dit onderzoek wordt er toegespitst op de fertiliteit van de hertenbokken, omdat zij het grootste verervende en reproductiepotentieel hebben. Een bok met zeer goede genen en superieure fertiliteit moet steeds voorrang krijgen op bokken met een mindere vruchtbaarheid. Vroegtijdige afvoer van weinig fertiele dieren kan hertenkwekers veel financieel leed, teleurstelling en verminderde arbeidsvreugde besparen. De oorzaken van lage fertiliteit zullen slechts kort besproken worden in deze studie. Verdieping van die onderwerpen valt buiten het kader van het onderzoek, er wordt verwezen naar specifieke literatuur ter zake.

Kennis over de reproductiebiologie van mannelijke dieren vertoont nog duidelijke hiaten voor Cervidae, maar nog meer voor *Afrikaanse antilopeachtigen*. Verschillende factoren hebben geleid tot een toegenomen belangstelling in de academische wereld voor reproductie en fertiliteit bij deze dieren. Er is het groeiend economisch belang van de hertenvleessector, maar ook het feit dat verschillende soorten met uitsterven bedreigd worden. Daarnaast is ook de waarde van jachttrofeeën

in Afrikaanse landen de laatste decennia explosief gestegen, waardoor een toegenomen vraag naar uitstekende kweektechnieken is ontstaan.

Tabel 1: Summiere vergelijking van de voornaamste hertensoorten die worden besproken in dit onderzoek en literatuurstudie. LG: lichaamsgewicht; M: mannelijk; V: vrouwelijk; Edelhert (Suttie et al., 1983; Langvatn en Hanley, 1993); Damhert (Clutton-Brock et al., 1988; McElligott et al., 2001); Sikahert (Hishinuma et al., 2003; Matsuura et al., 2004).

Hertensoort	Gemiddelde Volwassen LG M / V	Aandeel in Europa	Doel
Edelhert	145-225kg / 130kg	65%	Vlees Trofee (Hobby)
Damhert	60-110kg / 45kg	30%	Vlees Trofee Hobby
Sikahert	50-75kg / 60kg	Onbekend	Hobby

Gezien het enorme potentieel, is de reproductiebiologie bij herten en bij *Afrikaanse antilopeachtigen* een zeer intrigerende branche in de “diergeneeskunde” zowel voor dierenartsen als voor onderzoekers, dierentuinen, zakenmensen en andere personen met pioniersbloed in de aderen. Verder onderzoek zal nog veel problemen oplossen waar huidige onderzoekers en kwekers mee te kampen hebben. Daarom dient deze masterproef een dubbel doel: de weergave van de huidige kennis in de literatuur, en mogelijk een aanzet leveren tot verder onderzoek en ontdekkingen.

Op basis van literatuurstudie met betrekking tot de familie van de Cervidae zullen na een inleiding achtereenvolgens volgende thema's aan bod komen:

- reproductiebiologie van de mannelijke dieren,
- sperma-afname protocol met verdoving en anesthesie, spermacollectie en -bewaring,
- spermabeoordeling,
- inseminatie,

De focus zal in deze literatuurstudie vooral liggen op dam- en edelherten omdat zij de grootste economische relevantie hebben. Informatie over de genoemde onderwerpen zal, waar mogelijk, vergeleken worden met die over drie *Afrikaanse antilopeachtigen* uit de familie van de Bovidae. Vooral de springbok (*Antidorcas marsupialis*), de blesbok (*Damaliscus pygargus phillipsi*) en de impala (*Aepyceros melampus*) worden in de literatuur beschreven. Deze soorten behoren tot verschillende subfamilies, waardoor ze moeilijk in één overkoepelende term te vatten zijn. Daarom zal de artificiële term *Afrikaanse antilopeachtigen* gebruikt worden om ze samen te benoemen.

Verdoving en anesthesie bleken een heikel punt te zijn om eigenaars te vinden die hun dieren beschikbaar wilden stellen voor onderzoek in het kader van deze masterproef. Velen haakten af bij het horen dat hun dier kort in slaap zou gebracht worden. Daarom is ervoor geopteerd om het onderdeel 2.3.1 *Verdoving: sedatie en anesthesie*, grondig en uitgebreid te bespreken.

Het onderzoek werd opgezet op basis van de literatuurstudie. Er wordt in de praktijk nagegaan of en hoe het mogelijk is om een standaardprocedure voor afname en kwaliteitsbeoordeling van hertensperma te ontwikkelen, die ook in praktijkomstandigheden kan worden uitgevoerd. Van enkele damherten en een sikahert werden spermastalen afgenomen via elektro-ejaculatie. De stalen werden met verschillende soorten van verdunners bewaard en geanalyseerd. De resultaten worden getoetst aan die uit andere onderzoeken. Om na te gaan of de bekomen resultaten ook voor *Afrikaanse antilopeachtigen* opgaan, worden ook literatuurgegevens over deze diersoorten vergeleken.

Dit artikel wil specifiek spermakwaliteit, -bewaring en -analyse belichten en daarbij gelijkenissen en verschillen aanstippen tussen het damhert (*Dama dama*) en drie *Afrikaanse antilopeachtigen* (springbok, blesbok en impala). Verder onderzoek kan meer helderheid brengen zodat soorten waarover redelijk wat informatie beschikbaar is, model kunnen staan voor andere, minder goed gekende soorten.

Vervolgens werd nagegaan of het damhert model kan staan voor één of meerdere soorten van *Afrikaanse antilopeachtigen*, zodat overeenkomsten en verschillen tussen deze diersoorten beter begrepen kunnen worden. Waar mogelijk kan het damhert als model voor sommige van deze aspecten worden beschouwd.

Deze verkennende studie kan mogelijk aanzetten tot verder onderzoek.

LITERATUURSTUDIE

1 INLEIDING

De Cervidae of de familie van de hertachtigen is geografisch en fenotypisch een zeer diverse groep van evenhoevigen, waarbij ongeveer 43 soorten en 206 sub-soorten beschreven zijn (Whitehead, 1993). Ze komen wereldwijd voor in alle werelddelen met uitzondering van Antarctica. Vooral in Australië en in Nieuw-Zeeland werden destijds meerdere soorten geïntroduceerd (Wodzicki, 1950; Bentley, 1978). De verschillende species bewonen een zeer diverse habitat en vertonen heel diverse gedrag patronen (Whitehead, 1993). Voor de lezer die extra informatie wenst over de verschillende hertensoorten en hun natuurlijke habitat, wordt er verwezen naar bijlage I. Zo kan geen enkel taxon uit de familie van de Cervidae beschouwd worden als typisch voor “het hert” in het algemeen. Omdat hertachtigen in zeer verschillende habitatten leven, zal ook de reproductiebiologie vaak sterk verschillen voor deze soorten. Voor toepassing van geassisteerde reproductieve technologieën (ART) is grondige kennis van de reproductiebiologie echter vereist (Asher et al., 1993; Jabbour et al., 1997; Berg en Asher, 2003). Er is nog zeer veel onbekend en er moet nog veel ontdekt worden voor vele hertensoorten (Pukazhenthi et al., 2006; Fickel et al., 2007).

Omdat ook *Afrikaanse antilopeachtigen* behoren tot verschillende subfamilies, is het evenmin mogelijk om één soort of subfamilie als typisch voor de “*Afrikaanse antilopeachtigen*” te beschouwen. De reproductiebiologie van deze dieren verschilt onderling en ook van die van hertachtigen. Dit onderzoek en deze literatuurstudie zijn bedoeld om gelijkenissen en verschillen tussen de diersoorten te bespreken en zo kennis te vergaren over spermakwaliteit, -bewaring en -analyse. Toekomstig onderzoek kan dit verder verhelderen, zodat soorten waarover redelijk wat informatie beschikbaar is, model kunnen staan voor andere, minder goed gekende soorten.

In de hiernavolgende tekst worden achtereenvolgens de reproductiebiologie van mannelijke dieren, het sperma-afnameprotocol, spermabeoordeling en inseminatie besproken.

2 REPRODUCTIEBIOLOGIE EN SEIZOENSINVLOEDEN

Sommige hertensoorten, vooral die in koele gematigde streken, vertonen sterke seizoengebonden patronen wat betreft reproductie en geboorte. Bij andere soorten in meer equatoriale streken zijn fertiliteit en geboorte volledig onafhankelijk van seizoeninvloeden. Bij hertensoorten in het noordelijk halfrond komen de dieren in de bronst als de dagen korten en de dagelijkse hoeveelheid licht dus vermindert (Lincoln, 1985). Bij soorten zoals onder andere dam-, edel- en witstaartherten vertonen de mannelijke dieren doorheen het jaar afwisselend periodes van vruchtbaarheid en onvruchtbaarheid. Dit gaat gepaard met duidelijke veranderingen in testesgrootte en -functie (Lincoln, 1971; Mirachi et al., 1977; Haigh et al., 1984; Asher et al., 1987, 1996b.; Gosch en Fischer, 1989). Men stelt ook seizoengebonden spermaveranderingen vast, zoals bijvoorbeeld azoöspermie die vaak voorkomt in de lente en in de zomer. Hertachtigen leven in zeer verschillende habitatten en daarom verschilt ook de reproductiebiologie vaak sterk voor deze soorten. Zo zijn verschillende soorten mono-ovulatoir waardoor ze per jaar slechts één nakomeling voortbrengen, terwijl andere poly-ovulatoir zijn en meerdere nakomelingen voortbrengen (Asher et al., 2000). Ook embryonale ontwikkeling en placentatie verschillen sterk van soort tot soort (Lincoln, 1985).

Bij edelherten loopt de bronstperiode van half september tot half oktober, de post-paarperiode van half oktober tot half december, en de niet-paarperiode vanaf februari (Gizejewski, 2004; Martinez-Pastor et al., 2005b). Bij damherten situeert de bronstperiode zich van oktober tot en met november, de post-paarperiode van december tot en met maart, de niet-paarperiode vanaf april, vanaf augustus bevat het sperma opnieuw zaadcellen (Gosch en Fischer, 1989). Bij reeën is de pre-bronstperiode in juni, de bronst in juli, de post-bronstperiode in de eerste helft van augustus en de niet-paarperiode vanaf september (Blottner et al., 1997; Goeritz et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005b).

Tropische hertensoorten zijn veel minder gevoelig voor seizoeninvloeden. Umapathy et al. (2007) rapporteerden dat het fysiologische paarseizoen van het axishart van maart tot en met mei loopt. Maar andere onderzoekers stelden vast dat verschillende soorten, waaronder het axishart, volledig onafhankelijk van het seizoen werpen (Loudon en Curlewis, 1988). Andere tropische hertensoorten vertonen licht seizoengebonden patronen, e.g. het sambarhart (*C. unicolor*) (Semiadi et al., 1994).

Studies waarin men het effect van het seizoen op de voortplanting onderzocht, analyseerden onder andere verschillen in androgene activiteit van de testes (Lincoln, 1971; Bartecki en Jaczewski, 1983; Haigh et al., 1984; Gosch en Fischer, 1989; Asher et al., 1996; Blottner et al., 1996; Goeritz et al., 2003; Gizejewski, 2004; Martinez-Pastor et al., 2005b). Ook directe gedragsobservaties en fluctuaties van hypofysehormonen in het bloed zijn beschreven (Brüggermann et al., 1965; Bubenik et al., 1985; Lincoln en Kay, 1975; Suttie et al., 1989; Sempere et al., 1992). Seizoenverschillen leiden ook tot macroscopische en microscopische adaptaties van de mannelijke voortplantingsorganen, waaronder scrotumomtrek, grootte en gewicht van de testes, testiculaire histologie, de grootte en functie van de secundaire geslachtsklieren en spermaconcentratie (Gosch en Fisher, 1989; Suzuki et al., 1992; Garde et al., 1998; Gizejewski et al., 1998; Peles et al., 2000; Goeritz et al., 2003; Hishinuma et al.,

2003; Peles et al., 2003; Soler en Garde, 2003; Gizejewski, 2004; Martinez-Pastor et al., 2005b,d; Garde et al., 2006).

De bewering dat de reproductie van herten seizoengebonden is, wordt zeer vaak gebaseerd op kwalitatief en kwantitatief sperma-onderzoek. Hierna worden enkele onderzoeken besproken die werden uitgevoerd op dam- of edelherten. Ze zijn relevant in het kader van het onderzoek van deze masterproef.

Martínez-Pastor et al. (2005b) toonden duidelijke seizoeneffecten aan bij sperma van Iberische **edelherten** (*Cervus elaphus hispanicus*). De auteurs stelden vast dat de spermac concentratie duidelijk daalde na de bronstperiode. De resultaten komen overeen met de bevindingen van Gizejewski (2004), die graduele veranderingen tijdens het pre-paar-, paar- en post-paar-seizoen vaststelde bij edelherten. Drie aparte fracties kunnen duidelijk onderscheiden worden, met name een grijze, een gele en een witte (Gizejewski et al., 2003; Gizejewski, 2004). De grijze en witte fracties bevatten spermatozoa maar de concentratie ervan verschilt sterk afhankelijk van het seizoen. De kleverige en viskeuze gele fractie, afkomstig van de zaadblaasjes, wordt enkel gevonden tijdens de bronstperiode en is toxisch voor zaadcellen. Gedaalde motiliteit en zelfs afwezigheid van spermatozoa werden dan ook opgemerkt (Gizejewski et al., 2003; Garde et al., 2006).

In een andere studie rapporteerde Gizejewski (2004) dat de periode van seksuele activiteit gemiddeld 245 dagen per jaar bedraagt, van 4 augustus tot 6 april. In de periode met het hoogste libido, van einde september tot einde oktober, is de spermakwaliteit het best. De auteur onderzocht het sperma zowel macroscopisch als microscopisch in verschillende seizoenen. Hij klasseerde de gegevens op grond van de seizoengebonden seksuele activiteit van de edelhertenbokken als volgt:

Macroscopische veranderingen:

- De eerste zaadlozingen, verzameld in het begin van augustus, zijn homogeen met waterige of melkachtige consistentie, en hebben een grijze kleur.
- Zaadlozingen tijdens het pre-paar seizoen bevatten zowel spermatozoa als secreties van de secundaire geslachtsklieren, voornamelijk van zaadblaasjes.
- Vanaf midden augustus, bevatten de ejaculaten van edelherten twee fracties, typisch voor de paarperiode. Deze fracties hebben een gele kleur (afkomstig van de secundaire geslachtsklieren), en een witte kleur (afkomstig van de testes). De consistentie en de kleur van de gele fractie wijzigt als de piekperiode van het paarseizoen bereikt wordt. Ze verandert van lichtgeel romig tot de kleur en consistentie van verse honing.
- Tijdens de piek-paarperiode krijgt de gele fractie in het sperma het uitzicht van vaste honing met hoge viscositeit. De witte fractie vertoont in deze periode de consistentie van melk of room.
- Vanaf einde november wordt de gele fractie in het sperma geleidelijk aan dunner en bleker.
- Vanaf einde december, hebben de zaadlozingen opnieuw het uitzicht van homogene grijze secreties. Ze worden meer en meer waterig van januari tot februari (Gizejewski, 2004).

In dezelfde studie onderzocht de auteur ook de invloed van het seizoen op het volume van de verschillende fracties in de ejaculaten. Tijdens het pre-paar- en het post-paarseizoen maakte de grijze fractie 100% van de zaadlozing uit, waarin gemiddeld 0.34-0.55 ml sperma genoteerd kon worden. De gele en witte fracties, typisch voor het paarseizoen, maakten respectievelijk 90% (gemiddeld: 1.2-3.0 ml) en 10% (gemiddeld: 0.18 ± 0.12 ml) uit van het ejaculaat. De grootte van de gele en grijze fracties was relatief variabel en werd significant beïnvloed door het seizoen van afname.

Microscopische veranderingen:

Giżejewski (2004) onderzocht verder de spermaconcentratie, de totale hoeveelheid zaadcellen, de motiliteit en morfologische veranderingen van spermatozoa.

- De *spermaconcentratie* is sterk significant gecorreleerd met de periode van het jaar, met de individuele bok en met het aantal sperma-afnames. De concentratie in de witte fracties bedroeg in het onderzoek $1.14-2.27 \times 10^6/\text{mm}^3$. Ze nam duidelijk toe tot einde september en werd behouden tot einde oktober ($2.62-3.18 \times 10^6/\text{mm}^3$). Daarna daalde ze progressief met redelijk wat individuele variatie tot het einde van december naar een waarde van gemiddeld $2 \times 10^6/\text{mm}^3$. Tijdens de pre-paar periode was de concentratie van de grijze fractie in het sperma eerder laag, gemiddeld $0.20-0.45 \times 10^6/\text{mm}^3$. Tijdens de post-paar periode daalde de spermaconcentratie van de grijze fractie ook gestaag vanaf begin december tot einde maart.
- De periode waarin de dieren het hoogste libido vertonen, namelijk van einde september tot einde oktober, gaat gepaard met de hoogste spermaconcentratie en met de *hoogste hoeveelheid zaadcellen* per ejaculaat (namelijk $569.4-793.9 \times 10^6/\text{mm}^3$).
- Met betrekking tot de *progressieve motiliteit* van edelhertensperma kunnen twee periodes gedurende het jaar onderscheiden worden. Vanaf het midden van augustus tot einde oktober wordt een duidelijke toename van de motiliteit genoteerd, namelijk van 40% naar 60%. Daarna volgt een sterke daling tot onder 20% tegen het einde van maart. De auteur concludeerde hieruit dat bij edelherten de samenstelling van de grijze fractie niet ideaal is voor het behoud van de fertiliteit van zaadcellen. Tijdens het paarseizoen vertoonden spermatozoa $47 \pm 24\%$ progressieve motiliteit, waarvan 80% een voorwaartse beweging maakte aan matige snelheid.
- De kleinste hoeveelheid *morfologische afwijkingen* werd tijdens de paarperiode vastgesteld. Bij maximale libido stelde men $<5\%$ grote defecten vast en 6-12% kleine defecten. Een hoger percentage grote en kleine defecten, respectievelijk $>10\%$ en $>25\%$, werd genoteerd in het pre- en post-paar seizoen. Deze bevindingen van Giżejewski (2004) komen overeen met andere studies bij edelherten (Jaczewski et al., 1976; Krzywiński en Jaczewski, 1978) en bij wapiti's (Haigh et al., 1984) en ook bij damherten (Gosch en Fischer, 1989; Gosch et al., 1989).

Omdat **damherten** in het onderzoek van deze masterthesis zijn opgenomen, worden de seizoenkarakteristieken met betrekking tot deze diersoort ook kort belicht. Volgens Chapman en White (1972) kent de spermatogene activiteit van damherten een gelijkaardig verloop als die bij edelherten en andere hertensoorten uit het noordelijke halfrond. In tegenstelling tot de bevindingen van Asher et al. (1987) die geen seizoen ritme konden aantonen, rapporteerden Gosch en Fischer (1989) in hun onderzoek eveneens een seizoen ritme voor wat betreft het *volume van het ejaculaat*, de *concentratie*, de *motiliteit* en het percentage *morfologisch afwijkende zaadcellen*.

Gosch en Fischer (1989) toonden aan dat het sperma van damherten, dat van september tot maart via elektro-ejaculatie bekomen wordt zelfs aan de vereisten voor kunstmatige inseminatie bij runderen voldoet, namelijk $\geq 800 \times 10^6$ spermatozoa/ejaculaat, met een percentage normale spermatozoa $\geq 60\%$, met $\geq 60\%$ motiele zaadcellen en een graad van motiliteit ≥ 3 . Volgens de auteurs zijn damherten in staat om succesvol te paren van augustus tot en met april. Dit komt overeen met de periode waarin ze harde geweien hebben (Chapman en Chapman, 1975; Fischer, 1983, 1984; Asher en Macmillan, 1986). Sperma van januari tot en met maart via elektro-ejaculatie bekomen, is voldoende fertiel om via kunstmatige inseminatie levende nakomelingen te verwekken (Gosch en Fischer, 1989). De laatst genoemde auteurs toonden eveneens aan dat er ook een periode van complete azoöspermie optreedt bij damherten, namelijk van begin juni tot en met half juli, wanneer de testes een volume hebben van $< 30\%$ van het maximale testesvolume. Dit maximum bereiken de bokken net voordat ze in de bronstperiode komen, voor damherten is dit in oktober en november. Na de bronstperiode zullen de testes van december tot einde maart een volume behouden van ongeveer 50% van de maximale grootte. Daarna zal het volume gradueel dalen tot $< 30\%$ in april tot en met juni. Vanaf begin augustus kunnen er opnieuw zaadcellen in het sperma worden aangetroffen. De aantallen zullen progressief stijgen tot de volgende bronstperiode opnieuw bereikt wordt (Gosch en Fischer, 1989).

De *hoeveelheid testosteron* die geproduceerd wordt is ook seizoengebonden en rechtstreeks gecorreleerd met de gonadale activiteit en met het volume van het ejaculaat. Damherten produceren de grootste hoeveelheid testosteron net voor de bronstperiode, daarna zakt de concentratie gradueel (Fischer, 1982; Rolf en Fischer, 1986, 1987; Asher et al., 1987). Testosteron beïnvloedt zowel de secundaire geslachtsklieren als de talgklieren in het preputium. Van oktober tot midden januari bevat het sperma van damherten een extra viskeuze gele fractie die geen zaadcellen bevat. Ze is afkomstig van de zaadblaasjes (Hinz, 1930; Chapman en Chapman, 1979; Gosch en Fischer, 1989). In de periode van midden oktober tot einde november scheiden de klieren in het preputium een talgachtige substantie af die een nadelig effect heeft op de kwaliteit van het sperma. In gecontamineerd sperma zal de kleur van het zaad veranderen van witgeel naar bruin tot zelfs zwart. Sperma voor kunstmatige inseminatie wordt daarom best genomen in een periode waarin de talgklieren weinig actief zijn, bijvoorbeeld van december tot maart. In elk geval moet men de penis goed uitschachten (Gosch en Fischer, 1989).

Men kan concluderen dat de reproductie bij herten in gematigde streken seizoengebonden patronen vertoont. Het kwalitatief beste sperma wordt bekomen in de bronstperiode, dit is in de herfst. Daarbuiten kan er in de wintermaanden evenwel nog fertiel sperma worden bekomen. Tijdens de lente- en zomermaanden bevinden de dieren zich in een gonadale rustperiode waarin weinig tot geen fertiel sperma geproduceerd kan worden. Het tijdstip van spermacollectie heeft dus duidelijke implicaties voor de spermakwaliteit. Men moet hiermee rekening houden als men sperma voor verschillende doeleinden wil gebruiken, zoals kunstmatige inseminatie of voor het aanleggen van spermabanken. Dit wordt verder toegelicht in het hoofdstuk Inseminatie (zie 2.5).

3 SPERMA- AFNAMEPROTOCOL

Op basis van literatuurgegevens worden in het kader van een sperma-afnameprotocol drie onderdelen besproken die essentieel zijn voor het onderzoek in deze scriptie. Er wordt ingegaan op anesthesie en sedatie, op spermacollectie en op spermabewaring. Zowel de routinemethoden voor sperma-analyse ten velde, als de labotechnieken die minder frequent door de practicus kunnen worden uitgevoerd, worden gedetailleerd toegelicht. Met een dergelijk protocol wordt daarna in de praktijk onderzocht of en hoe het mogelijk is om een standaardprocedure voor afname en kwaliteitsbeoordeling van hertensperma te ontwikkelen, die ook in praktijkomstandigheden kan worden uitgevoerd. Om na te gaan of de resultaten en de algemene trends uit dit onderzoek ook voor *Afrikaanse antilopeachtigen* opgaan, worden ook literatuurgegevens over deze diersoorten vergeleken, geëvalueerd en besproken, in hoeverre de literatuur dit toelaat.

3.1 VERDOVING: SEDATIE EN ANESTHESIE

Het verdoven en onder anesthesie brengen van (wilde) dieren is een delicate en belangrijke procedure waarbij voorzichtigheid en de nodige ervaring vereist zijn.

Zowel herten als *Afrikaanse antilopeachtigen* zijn wilde dieren die dus schuchter zijn tegenover de mens. Daarom moeten ze meestal een chemische verdooving en/of anesthesie ondergaan als een bepaalde handeling moet worden uitgevoerd, zoals het aanbrengen van een radio-transmitter, een sperma-afname of een diergeneeskundige handeling. Enkel bij dieren die met de hand zijn opgevoed kan men praktische handelingen soms gemakkelijker uitvoeren zonder ze in slaap te doen. Anesthesie van wilde dieren kan een bijzondere uitdaging zijn waarbij de dierenarts de algemene principes van de anesthesie moet aanpassen aan de individuele diersoort, rekening houdend met de anatomie en fysiologie van het dier en met specifieke veldomstandigheden. Aangezien wilde dieren vooraf meestal geen grondig klinisch onderzoek hebben ondergaan om hun fysiologische status voor de anesthesie te bepalen, zijn dierenartsen beperkt tot het gebruik van medicatie die breed werkt met een zo groot als mogelijke veiligheidsmarge. Hieraan worden andere parameters opgeofferd zoals recoverytijd. Chemische anesthesie van wilde dieren gaat over het algemeen gepaard met een hogere morbiditeit en mortaliteit.

Vooraleer men wilde dieren onder anesthesie kan brengen, dient men **pre-anesthetische voorzorgsmaatregelen** te nemen. Volgens Clarke et al. (2014) moet men vooral rekening houden met hiernavolgende factoren. Het kan nuttig zijn om de *locatie* waar de dieren gehuisvest zijn te verkennen, om risico's in te schatten wanneer de anesthesie geïnduceerd wordt. Het is bijvoorbeeld belangrijk te weten dat er poelen op het terrein zijn die kunnen leiden tot verdrinking, of afgronden en obstakels waar de dieren zich kunnen kwetsen. Het is ook raadzaam om vooraf grondig kennis te maken met het *materiaal* waarmee gewerkt wordt, gaande van voertuigen tot het verdovingsgeweer. De verdovingspijlen en het verdovingsmateriaal mogen enkel gemanipuleerd worden door personen met kennis van zaken en de veiligheidsvoorschriften moeten strikt bewaakt worden. Drug-blootstelling

of accidenteel trauma (naaldprikken of explosies) treden meestal op wanneer het verdovingsgeweer wordt geladen. Dit gebeurt dus best in een rustige omgeving waar zeker één andere persoon aanwezig is voor toezicht op ongevallen. De dierenarts die de leiding heeft moet duidelijke *taken* toevertrouwen aan de personen die zullen helpen bij het verdoven van de dieren, zodat iedereen weet hoe hij/zij moet handelen in bepaalde omstandigheden. *Antidota*, aangepast aan immobiliserende medicatie, dienen steeds bij de hand te zijn, zeker wanneer men met opioïden werkt. Risico's op bijkomende problemen bij verdoofde dieren, zoals *aspiratiepneumonie*, *hyper- en hypothermie*, *capture myopathie*, *tympanie* en *shock* dienen te allen tijde correct ingeschat en tot een minimum beperkt te worden. Om *aspiratiepneumonie* ten gevolge van de anesthesie te voorkomen, kan het aangewezen zijn om het moment van de dag te bepalen waarop de dieren het minste voedsel hebben opgenomen, of als dat mogelijk is kan men ze uitvasten. Om *hyperthermie* te voorkomen worden de dieren het best onder anesthesie gebracht op de koelste momenten van de dag, indien mogelijk liefst in de lente of in de herfst als de dagelijkse temperaturen het meest gunstig zijn. Als anesthesie in de winter wordt uitgevoerd, dan dient men zeker rekening te houden met mogelijk optreden van *hypothermie*. Verder is de sociale hiërarchie in de kudde van belang. Als een dier tekenen vertoont van sedatie en anesthesie, kan de kudde er agressief of defensief tegen reageren. Jammer genoeg kan het lichaamsgewicht van de dieren vaak enkel worden geschat. Dit maakt het tot een heikel punt om de correcte dosis van de medicatie aan te wenden. In intensieve kwekerijen, bijv. van dam- en edelherten, kan men wellicht beschikken over weegschalen of weegbruggen om het gewicht accuraat te meten.

Premedicatie is meestal moeilijk toe te dienen aan wilde diersoorten. Toedienen van neuroleptica kan nochtans raadzaam zijn, vooral bij stressvolle dieren of wanneer transport gepland is. Azaperone kan gebruikt worden wanneer translocatie dient te gebeuren. Zuclopenthixol acetaat heeft een kalmerend effect gedurende vier dagen bij *Cervidae* (Read et al., 2000; Woodbury et al., 2001; Read and McCorkell, 2002).

Het vele veldmateriaal, nodig voor anesthesische handelingen, moet verpakt zijn in goed georganiseerde, makkelijk draagbare dozen of rugzakken. Kleurcodes voor verschillende dozen of inhoud vergemakkelijken het werk. Omdat wilde diersoorten onvoorspelbaar zijn, is het aanbevolen om verschillende scenario's voor te bereiden en het materiaal daarvoor klaar te houden. Een EHBO-kit voor verdover en assistent moet altijd voorhanden zijn, met daarin standaard medicatie voor noodgevallen, zoals lidocaïne, epinefrine en atropine. Daarnaast zijn specifieke antidota onmisbaar, net als materialen die de ventilatie kunnen ondersteunen zoals een laryngoscoop en endotracheale tubes. Zuurstofcilinders zijn eveneens belangrijk, echter vaak onpraktisch. Het is verder verstandig om materialen te voorzien die de bloeddruk en het cardiovasculaire systeem kunnen ondersteunen, meer bepaald intraveneuze katheters en vloeistoffen. Voor het geval dat hyperthermie optreedt moet er water of alcohol voorhanden zijn. Tegen hypothermie dienen dan weer dekens en eventueel warm water voor intraveneuze therapie beschikbaar te zijn.

Om anesthesische medicatie aan herten toe te dienen is men aangewezen op paalspuiten, blaaspijpen of verdovingsgeweren. Bij paalspuiten wordt een spuit met anestheticum bevestigd op het uiteinde

van een lange stok of paal. Het anestheticum wordt toegediend door het dier te stoten. De methode wordt gebruikt als de dieren in een gelimiteerde omgeving zitten en gemakkelijk bereikbaar zijn met het instrument. Verdovingspijlen worden gebruikt in blaaspijpen of in verdovingsgeweren. Accurate intramusculaire toediening van medicatie gebeurt best in grote spiermassa's. Bij herten en *Afrikaanse antilopeachtigen* zijn de bovenste spieren van de achterpoten, waaronder de *musculus gluteobiceps*, ideaal. Daarnaast kan men ook opteren voor de spieren van de hals, meer bepaald de *m. trapezius*, de *m. biceps brachii* en de *m. triceps brachii* (zie fig. 1).

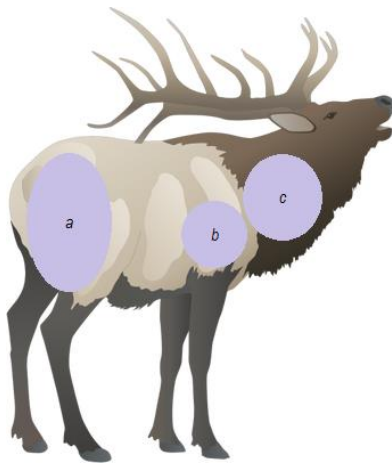


Fig. 1: Illustratie van de grote spiergroepen geschikt voor het verdoven van herten.

a) *m. gluteobiceps*; b) *m. triceps brachii* en *m. biceps brachii*; c) *m. trapezius*.

Verdovingspijlen kunnen impact-trauma's veroorzaken. Daarom kan best geschoten worden met de minimale snelheid die nodig is voor een goede accuraatheid. Problemen geassocieerd met verdovingspijlen zijn volgens Clarke et al. (2014): accidenteel treffen van lichaamsholten, gewrichten en organen, impacttrauma ten gevolge van te hoge snelheid van de verdovingspijl, drug-toedieningstrauma ten gevolge van een inwendige explosieve lading en infectie van verdovingswonden. De meeste verwondingen ontstaan na incorrect gebruik van het materiaal, door onervarenheid van het personeel en door onvoldoende voorafgaande planning van het verdoven.

Een ideaal anestheticum heeft een brede veiligheidsmarge, een lage mortaliteit, een snelle en vlotte activiteit. Hoe sneller de verdoving inwerkt, des te korter zullen de dieren lopen en des te kleiner de kans op *capture myopathy*. Dit is de schade aan de spieren die ontstaat ten gevolge van overbelasting en overmatig gebruik van spieren op momenten van verminderde zuurstoftoevoer. Een ideaal anestheticum zorgt voor relaxatie van het dier en voor het behoud van enkele reflexen die een goede monitoring van de fysiologische toestand en diepte van de anesthesie toelaten. Idealiter is het medicament water-oplosbaar, stabiel, snel metaboliseerbaar, heeft het een lange houdbaarheidstijd, is het niet irriterend en veroorzaakt geen hypersensitiviteit, en geen cardiovasculaire en pulmonaire depressie. Het werkt analgetisch bij sub-anesthetische dosis en produceert een snelle en vlotte recovery met minimale bijwerking. Jammer genoeg bestaat dergelijk ideaal anestheticum tot nu toe

niet, zodat de anesthesist is aangewezen op compromissen bij het gebruik van verschillende soorten medicatie.

Veel studies rapporteren het gebruik van specifieke anesthetische medicatie bij verschillende hertensoorten, veelal in associatie met het verwijderen van geweien. Men moet voorzichtig zijn bij het extrapoleren van resultaten en dosissen, geëvalueerd in dergelijke studies, naar andere hertensoorten of tussen dieren van dezelfde soort in het wild en in gevangenschap. Low (1973) toonde aan dat hogere dosissen vereist waren om dieren in het wild te verdoven in vergelijking met tamme of gevangen herten. Als men zich afvraagt welk product een optimale werking zal hebben bij een bepaald dier moet men zich dus baseren op specifieke studies bij een bepaalde hertensoort. Er is veel meer informatie beschikbaar in de literatuur over de chemische immobilisatie van *Afrikaanse antilopeachtigen*. Dit is het gevolg van het feit dat in Afrika dagelijks wilde dieren verdoofd moeten worden. Het verplaatsen van wilde dieren na koop en verkoop is bijvoorbeeld een van de belangrijkste bezigheden van dierenartsen ter plaatse. Er zijn verschillende specifieke handboeken beschikbaar voor de chemische en fysische immobilisatie van wilde dieren. De basisaspecten zijn zeker ook van toepassing voor de Cervidae.

Om een helder overzicht van producten te geven, is de bespreking van anesthetische middelen opgedeeld in verschillende klassen. Waar mogelijk zal toegespitst worden op dam- en edelherten. Op het einde van dit deel wordt een opsomming gegeven van anesthetica met bijhorende antidota, die volgens de literatuur kunnen worden aangewend bij hertensoorten in praktijkomstandigheden.

Voor de chemische immobilisatie van *Afrikaanse antilopeachtigen* wordt op het einde van dit deel een overzichtstabel gegeven met de verschillende producten die kunnen worden aangewend. De lijst is niet limitatief, maar de vermelde medicamenten zijn de '*drugs of choice*' op basis van het handboek *Chemical and physical restraint of wild animals* door Kock en Burroughs (2012).

Achtereenvolgens wordt het gebruik van opioïden, cyclohexamines, neuroleptica of tranquillizers, sedativa, $\alpha 2$ -agonisten en BAM-combinatie bij herten besproken.

3.1.1 De opioïden

De opioïde-agonisten leveren species-afhankelijke sedatie, immobilisatie, analgesie en bijwerkingen door het stimuleren van specifieke centrale en perifere μ -, κ - en δ -opioïde receptoren. Met zeer sterke analgesie zijn ze de belangrijkste *knock-down* drugs voor immobilisatie van wilde dieren. Bij hoge dosissen kan er echter nog steeds excitatie optreden ten gevolge van uitwendige prikkels, vooral pijnprikkels (Murphy en Hug, 1982). Daarom dient men samen met een opioïde agonist best ook een tranquillizer toe. Men kan het effect van uitwendige prikkels ook reduceren door het dier te blinddoeken en wattenproppen in de oren te steken (Kock en Burroughs, 2012). Dit geldt ook voor herten waarbij een fentanyl/xylazine immobilisatie onvoldoende efficiënt was voor het verwijderen van het gewei, wat meestal pijnlijk is (Wilson et al., 1996b). Fentanyl, carfentanil en etorfine geven bij

herten significante immobilisatie en analgesie. Wegens de hoge potentie van deze producten kunnen ze in kleine volumes worden toegediend en veroorzaken ze een snelle inductie van sedatie/ anesthesie, wat zeker bij in het wild levende dieren aanbevolen wordt. Bij het gebruik van deze producten zijn de meest voorkomende bijwerkingen zowel bij herten als bij *Afrikaanse antilopeachtigen*: bradycardie, respiratoire depressie, hypertensie, hyperactiviteit tijdens de inductiefase, geassocieerd met hyperthermie en *capture-myopathie* (Meuleman, 1984; Stanley et al., 1988). Respiratoire depressie en hyperthermie zijn hiervan de belangrijkste. Hyperactiviteit kan het gevolg zijn van onder-dosering of van inefficiënte plaatsing van de verdovingspijl, leidend tot trage absorptie van het medicament (Jones en Manton, 1973; Kock en Burroughs, 2012). De laatste auteurs meldden eveneens dat pulmonaire depressie relatief frequent voorkomt bij waterbokken (*Kobus ellipsiprymnus*) en impala's, waardoor extra voorzichtigheid vereist is tijdens de immobilisatie van de dieren. Volgens de auteurs kan men respiratoire depressie tegengaan door een pijnlijke stimulus, zoals aan het oor draaien of de thorax slaan, door toedienen van doxapram, of van een lage dosis nalorphine, nalbuphine of butorfanol. Het toedienen van een zuurstof supplement is nuttig bij een respiratoire depressie maar gaat ze niet tegen.

Bij *Afrikaanse antilopeachtigen* worden bijna steeds opioïde agonisten aangewend als primaire drug voor chemische immobilisatie. Volgens Kock en Burroughs (2012) leidt een hogere dosis van de opioïden eerder tot een snelle, vlotte en veilige immobilisatie dan een lagere. *Meer dieren zullen sterven aan te weinig etorfine, dan er sterven aan te veel.* De auteurs raden echter ook aan om opioïden steeds met sedativa te combineren.

Bij herten kan bij gebruik van de langwerkende narcotica carfentanil en etorfine, een belangrijk re-sedatief effect optreden nadat men een antidoot heeft toegediend en volledige recovery is opgetreden. Dit wordt veroorzaakt door het verschil in werkingsduur van deze producten met die van de antagonist, door onderdosering van de antidota en door enterohepatisch recirculeren van etorfine (Stanley et al., 1988). In hoeverre dit effect ook bij *Afrikaanse antilopeachtigen* optreedt, is in de literatuur niet teruggevonden.

Etorfine is een potente afgeleide van morfine die respiratoire depressie kan veroorzaken (Pearce en Kock, 1989; Buss en Meltzer, 2001). Etorfine geeft initieel een stimulatie van het centraal zenuwstelsel vooraleer het sedatie veroorzaakt, waardoor het sedatief effect van deze drug bij herten in vraag wordt gesteld (Lees en Hillidge, 1976). Meestal wordt etorfine toegediend in combinatie met een tranquillizer of sedativum, azaperone of een α 2-agonist (xylazine, medetomidine of detomidine). Deze drugs werken synergistisch met etorfine, zowel in het reduceren van de excitatie als van de musculaire hypertoniciteit die veroorzaakt wordt door etorfine (Kock en Burroughs, 2012). Deze auteurs meldden eveneens dat haloperidol en diazepam niet gebruikt kunnen worden in combinatie met etorfine. Bij witstaartherten (*Odocoileus virginianus*) is dit product inefficiënt gebleken voor sedatie. De dieren kunnen hyperactiviteit, hyperpnee en ataxie vertonen (Kreeger et al., 1987). Jones (1984) toonde aan dat een etorfine/acetylpromazine combinatie eveneens onvoldoende efficiënt kan zijn bij herten, omdat de promazine-afgeleide onvoldoende de excitatorische effecten van etorfine onderdrukt. De combinatie van etorfine en xylazine is bij sommige hertensoorten meer aangewezen (English, 1984).

Janovsky et al. (2000) vergeleken de werking van de combinatie etorfine/acetylpromazine en xylazine met tiletamine/zolazepam en xylazine (1:1) bij wilde edelherten. Ze konden geen significant verschil aantonen.

Carfentanil is de meest potente opioïde agonist die momenteel op de markt is. Het product is verwant aan fentanyl en kan aangewend worden aan een dosis van 1µg/kg (Meuleman et al., 1984; Swan, 1993). Het is 1,2 keer potenter dan etorfine en geeft een snellere inductie van anesthesie (Kock en Burroughs, 2012). Combinatie van carfentanil met xylazine leverde betere immobilisatie dan carfentanil of xylazine alleen. Bij het gebruik van deze combinatie zijn echter schadelijke nevenwerkingen gerapporteerd bij verschillende hertensoorten: 6% sterfte bij elanden (*Alces alces*), vooral als gevolg van *capture-myopathie* (Delvaux et al., 1999), erge hypoxemie en milde hypercapnee bij wapiti's (Moresco et al., 2001), *capture-myopathie* en aritmieën bij damherten, muilherten en het witstaarthert (Pearce en Kock, 1989; Caulkett et al., 2000). Supplementaire zuurstof wordt aangeraden bij het gebruik van deze combinatie, om de ernst van mogelijke neveneffecten te reduceren (Walsh en Wilson, 2002). Reversal van de CZS-depressie met diprenorfine is meestal onvolledig en de dieren kunnen na 2 tot 3 uur terug naar de toestand van exciteren vertonen (Kock en Burroughs, 2012). De auteurs raden langwerkende antagonisten aan, zoals naltrexone aan 90:1, voor de reversal van carfentanil.

Fentanyl is een synthetisch pethidine analoog dat potenter is dan morfine, met een snellere inductie van sedatie/anesthesie en kortere werkingsduur. Fentanyl heeft slechts 1/15 van de potentie van etorfine, waardoor dit opioïde enkel praktisch nuttig is bij het immobiliseren van kleinere diersoorten zoals de impala. Fentanyl veroorzaakt minder respiratoire suppressie, maar heeft een kleiner *knock-down* effect (Kock en Burroughs, 2012). Wilson et al. (1996a,b) vergeleken het effect van de chemische immobilisatie door de combinatie fentanyl/xylazine/azaperone (fentazin) met die van xylazine bij edelherten; de recoverytijd was significant korter voor de combinatie dan voor xylazine alleen. Alhoewel twee goede analgetische producten eveneens werden toegediend, vertoonden sommige herten in dit onderzoek nog steeds afweerbewegingen bij pijnlijke ingrepen zoals het verwijderen van het gewei.

Thiafentanil Oxalaat of **A3080®** is een relatief recent ontwikkelde afgeleide van fentanyl, met een potentie die vergelijkbaar is met die van etorfine. De inductiesnelheid van anesthesie is echter beduidend korter dan die van etorfine en van carfentanil. In combinatie met medetomidine en ketamine vertoont het eveneens een goede en snelle inductie van sedatie/anesthesie bij herten, sneller dan met carfentanil en thiafentanil alleen (Walsh en Wilson, 2002). De kortere werkingsduur van A3080® in vergelijking met etorfine en carfentanil, zorgt ervoor dat na reversal van deze drug minder *renarcotisatie* zal optreden, wat een groot probleem kan zijn bij de Cervidae (Stanley et al., 1988). Thiafentanil is ook bij de *Afrikaanse antilopeachtigen* een uitstekende primaire drug voor chemische immobilisatie, in het bijzonder voor de waterbok, eland (*Taurotragus oryx*), koedoe (*Tragelaphus strepsiceros*) en nyala (*Tragelaphus angasii*) (Kock en Burroughs, 2012).

Butorfanol tartraat is eveneens een opioïde, echter een μ -receptor antagonist en een κ -receptor agonist. Het kan aldus de effecten van meer potente opioïden omkeren, vergelijkbaar met nalorfine. Tegelijkertijd kan het een duidelijke analgesie induceren (Kock en Burroughs, 2012). De auteurs vermelden dat het product in de praktijk bij verschillende diersoorten vooral gebruikt wordt voor postoperatieve analgesie, om de ademhaling te stimuleren na immobilisatie met potentere opioïden. Het wordt ook gebruikt voor staande sedatie bij dieren in gevangenschap en in BAM-mengsels (zie 2.3.1.6 *Butorfanol – Azaperone – Medetomidine (BAM)*).

De **reversal** van opioïden is zeer belangrijk, om het dier te wekken en om gevaarlijke neveneffecten te corrigeren. Hiervoor worden opioïde antagonisten aangewend, ze keren de opioïde effecten om door ze te verwijderen van de receptoren in het CZS. Zowel bij herten als bij *Afrikaanse antilopeachtigen*, kan de reversal gebeuren via verschillende producten, waaronder specifieke opioïde antagonisten (nalaxone, naltrexone en nalmefene) en de agonist-antagonisten (nalorfine en diprenorfine). Etorfine en carfentanil kennen een lange werkingsduur zodat deze producten opgeheven moeten worden door voldoende hoge dosering van antidota met relatief lange werking. Naloxone is hiervoor ongeschikt. Diprenorfine is de eerste keuze voor reversal van etorfine. Specifiek voor herten spelen de nieuwere langwerkende producten naltrexone (Moresco et al., 2001) en nalmefene (Kreeger et al., 1987) een belangrijke rol in het opheffen van de sedatie/anesthesie van deze opioïde agonisten. Ook bij accidentele injectie van deze producten bij de mens, zijn naltrexone en nalmefene de eerste keuze middelen voor reversal (Walsh en Wilson, 2002). Volgens de productbeschrijving van Novartis™ van etorphine-gebruik Immobilon® (M99) bij olifanten, kan ook naloxone aan een 1:1 verhouding gebruikt worden bij accidentele injectie bij de mens. Meer informatie over het specifiek gebruik van reversal producten is te vinden in specifieke literatuur.

Tabel 2: Verschillende klassen van de anestetica en sedativa, met bijhorende handelsnamen (aangepast van Kock en Burroughs, 2012).

Klasse van medicamenten	Actieve ingrediënt	Handelsnaam	Reversal - antagonisten	Handelsnaam reversal
Opioiden	Etorphine Carfentanil Fentanyl Thiafentanil Butorphanol	M99, Captivon Wildnil Sublimase A3080, Thianil Stadol	Diprenorphine Nalorphine Naloxone Naltrexone Nalmefene Nalbuphine	M5050 Lethidrone Narcan Trexonil Nalmefene Nubain
Cyclohexamines	Ketamine Tiletamine	Ketalar, Vetalar, Ketaset Zoletil, Telazol		
Phenothiazines	Acetylpromazine	Acepromazine		
Langwerkende neuroleptica - phenothiazine derivaten	Zuclopenthixol acetaat Perphenazine enanthaat	Clopixol-Acuphase Trilafon LA		
Butyrophenones	Azaperone Haloperidol	Stresnil Serenace		
Benzodiazepines	Diazepam Zolazepam Midazolam	Valium Zoletil, Telazol Dormicum		
α2-agonisten	Xylazine Detomidine Medetomidine	Rompun, Chanazine Domosedan Domitor, Zalopine	Yohimbine Tolazoline Atipamezole	Trexonil Antisedan
BAM-mengsel	Butorphanol Azaperone Medetomidine	Stadol Stresnil Domitor, Zalopine	Naltrexone Tolazolin Atipamezole	Trexonil Antisedan

Tabel 3: volgens de review van Walsh en Wilson (2002). Bij edelherten aanbevolen dosissen van tranquillizers, opioïden en sedatieve/hypnotische agentia, toegediend via intramusculaire (IM) en intraveneuze (IV) weg. Dosissen zijn weergegeven in mg/kg lichaamsgewicht, tenzij anders aangegeven.

Soort	Drug	Dosering (mg/kg)	Toediening	Referentie/bron
Edelhert (<i>Cervus elaphus</i>)	Detomidine	0,10-0,12	IM	Bouma et al, 1988
	Etorphine/ace	2,0-4,5mg / 9-20 mg	IM	Jones 1984
	Etorphine/ace/xylazine	0,035/0,14/0,36	IM	Janovsky et al. 2000
	Fentazin®/Xylazine	0,8 ml/80 mg	IM	Van Mourik et al. 1988
	Parnell Fentazin® 5	1,8-2,4 ml	IM	Parnell Laboratoria
	Parnell Fentazin® 10	0,5 ml/100 kg	IM	Parnell Laboratoria
	Ketamine/xylazine	5,0/1,0	IV	McKelvey en Simpson 1985
	Ketamine/medetomidine	1,5/0,05	IM	Jalanka en Roeken 1990
	Perphenazine enanthaat	1	IM	Diverio et al. 1996
	Xylazine	0,64-0,96/1,0-1,5	IV/IM	Mackintosh en Van Reenen 1984a
	Xylazine/fentanyl/azaperone	0,5/0,004/0,032	IM	Wilson et al, 1996b
	Zoletil®/Xylazine	2,4/2,3	IM	Janovsky et al. 2000

Tabel 4: volgens de review van Walsh en Wilson (2002). Bij edelherten aanbevolen dosissen van verschillende opioïde en $\alpha 2$ -adrenerge antagonisten, toegediend via intraveneuze weg. Dosissen zijn weergegeven in mg/kg lichaamsgewicht, tenzij anders vermeld.

Soort	Drug	Dosering (mg/kg)	Toediening	Referentie/bron
Edelhert (<i>Cervus elaphus</i>)	Parnell Contran-H injectie®	2,0-2,5 ml/100 kg	IV	Parnell Laboratoria
	(Yohimbine/naloxone)	(2,0-2,5/0,0020-0,0025)		
	Tolazine® (Tolazoline)	2,0-4,0	IV	Lloyd Laboratoria
	Tolazoline/Narcan®	2,0/0,8mg	IV	Van Mourik et al. 1988
	Yohimbine	0,20-0,25	IV	Mackintosh en Van Reenen 1984a: Virbac Laboratoria
	Yohimbine/4-aminopyridine	0,15-0,25/0,3-0,5	IV	McKelvey en Simpson 1985

3.1.2 De cyclohexamines

Cyclohexamines zijn een tweede groep van medicamenten voor chemische immobilisatie van vele zoogdieren, reptielen en vogels, die eveneens een *knock-down* effect veroorzaken. De producten ketamine en tiletamine behoren tot deze klasse. Ze zijn relatief veilig, maar er bestaan geen antagonisten die het effect van deze producten kunnen omkeren. Bewustzijn keert dus terug wanneer het medicament is uitgewerkt, meer bepaald wanneer het gemetaboliseerd of geëxcreteerd is uit het lichaam. Hoe hoger het metabolisme van het dier, hoe hoger de dosis van het cyclohexamine zal moeten zijn (Kock en Burroughs, 2012). De inductie vindt meestal plaats binnen 5-10minuten (Kock en Burroughs, 2012). De werking van deze middelen berust op een niet-competitief antagonisme met de N-methyl-D-aspartaat (NMDA) receptor, de belangrijkste receptor voor de excitatorische neurotransmitter, glutamaat (Yamamura et al., 1990). Ze induceren een dissociatieve anesthesie, geassocieerd met een duidelijke musculaire hypertoniciteit, meer uitgesproken bij ketamine dan bij tiletamine, en analgesie (Walsh en Wilson, 2002; Kock en Burroughs, 2012). Omwille van de musculaire rigiditeit, worden ze steeds aangewend in combinatie met producten die goede myorelaxatie induceren, zoals de benzodiazepines of de $\alpha 2$ -adrenerge agonisten. Tijdens de immobilisatie blijven de ogen vaak wijd open. Men moet ze dus afdekken om schade door zonlicht te voorkomen (Kock en Burroughs, 2012). De neveneffecten op de ademhaling zijn veel minder uitgesproken dan bij opioïden. Maar tijdens de inductiefase kunnen excitatie, convulsies en hyperthermie optreden.

Ketamine is het meest gebruikte cyclohexamine in de diergeneeskunde. Een nadeel voor het gebruik bij herten en andere wilde dieren vormt het grote volume dat nodig is om chemische immobilisatie te bekomen. Bij bepaalde hertensoorten kan 15 mg/kg nodig zijn om anesthesie te induceren (Mech et al., 1985). Intramusculaire toediening is vaak pijnlijk. De duur van de immobilisatie bedraagt meestal 1-2 uur (Kock en Burroughs, 2012). Ketamine wordt frequent aangewend in combinatie met xylazine en medetomidine. De combinatie zorgt ervoor dat er minder ketamine kan gebruikt worden, bovendien

kennen deze producten een synergistische werking (Jalanka en Roeken, 1990). Combinatie van ketamine met α 2-agonisten, xylazine, medetomidine en detomidine, kan aanleiding geven tot braken.

Tiletamine kent een vergelijkbare werking met ketamine, maar de inductietijd voor immobilisatie is korter (Lin, 1996; Kilpatrick en Sphor, 1999) en de werkingsduur is langer (Lin, 1996). Tiletamine in combinatie met het sedativum zolazepam, heeft het gebruik van de combinatie ketamine/xylazine grotendeels vervangen. De immobilisatieduur na toediening van de tiletamine/zolazepam combinatie bedraagt 2-3uur, waarbij convulsies soms worden opgemerkt (Kock en burroughs, 2012). Volgens Kreeger en Arnemo (2002) en Caulkett en Arnemo (2007) kan de anesthesie van herten, in het bijzonder van het witstaarthert, best gebeuren met behulp van 4.4 mg/kg tiletamine/zolazepam, gepaard met 2.2 mg/kg xylazine. Deze combinatie levert een betrouwbare chemische immobilisatie en kan gemakkelijk geantagoneerd worden met behulp van yohimbine (Millspaugh et al., 1995; Janovsky et al., 2000; Murray et al., 2000). Janovsky et al. (2000) vergeleken echter de werking van de combinatie tiletamine/zolazepam en xylazine (1:1) met die van etorfine/acetylpromazine en xylazine bij wilde edelherten. Ze konden geen significant verschil aantonen. Verschillende andere studies rapporteerden eveneens de combinatie van tiletamine/zolazepam en xylazine bij het edelhert, bij de wapiti en bij het witstaarthert (Millspaugh et al., 1995; Janovsky et al., 2000; Murray et al., 2000).

Immobilisatie met behulp van een ketamine/medetomidine combinatie is effectiever bij herten dan met behulp van carfentanil/xylazine. Hypoxemie en respiratoire acidose kunnen echter bij de eerste combinatie optreden, zuurstofsupplementatie en sternale positie worden in dat geval aangeraden door Read et al. (2001), alsook steeds bij combinaties met tiletamine/zolazepam en xylazine. Combinaties van xylazine/ketamine en medetomidine/ketamine worden bij herten frequent gebruikt (Lin, 1996). Xylazine/ketamine combinaties, zoals in de *Hellabrunner mix*, zijn het meest aangewezen bij damherten. Smith et al. (2006) toonden bij damherten aan dat een combinatie van medetomidine/ketamine veiligere sedatie/anesthesie opleverde in vergelijking met thiafentanil/medetomidine en ketamine die een snellere inductie veroorzaakten. Bij dieren in gevangenschap zal een medetomidine/ketamine combinatie dan ook steeds de voorkeur krijgen. Door toediening van een additieve bolus (21mg/kg; tot 600mg) ketamine kan een verlenging van de sedatie/anesthesie bekomen worden bij reeds gesedeerde herten (Mech et al., 1985).

Reversal voor tiletamine en ketamine is niet beschikbaar.

3.1.3 De neuroleptica of tranquillizers

Neuroleptica, ook bekend als tranquillizers of antipsychotica, zijn producten die het gedrag modificeren. Ze worden vooral in de humane geneeskunde gebruikt bij de behandeling van psychiatrische aandoeningen. Verminderde reactiviteit en agressie treden op, zonder een doorgedreven depressie van het centraal zenuwstelsel zodat reflexen en pijnresponsen behouden blijven. In de diergeneeskunde worden vooral phenothiazines en butyrophenones aangewend. Ze induceren sedatieve effecten door blokkade van de post-synaptische dopamine, D2-receptoren in het

centraal zenuwstelsel (Janssen, 1965). Tranquillizers zijn echter multipotente blokkers. Ze antagoniseren α - en β -adrenoreceptoren, naast de D2-receptoren, waardoor ze aanleiding kunnen geven tot bloeddrukdalende, convulsies, extra-pyramidale stoornissen en daling van de eetlust (Baldessarini, 1992; Kock en Burroughs, 2012).

De **phenothiazines** induceren bij de meeste diersoorten een voorspelbare dosisafhankelijke sedatie met minimale cardiopulmonaire veranderingen. De werkingsduur is over het algemeen langer dan bij producten van andere klassen, zoals bijvoorbeeld de α_2 -adrenerge agonisten. Er bestaan geen specifieke antidota en analgesie wordt onvoldoende bekomen. Daarom dienen deze producten best in combinatie met andere producten gegeven te worden, zoals de opioïden. De combinatie van een analgetisch opioïd met een neurolepticum staat bekend als neuroleptanalgesie (De Castro en Mundeleer, 1959).

Acetylpromazine maleaat (ACP) is het in de diergeneeskunde meest gebruikte phenothiazine dat bij herten meestal in combinatie met etorphine wordt gebruikt. Het heeft een werkingsduur van gemiddeld 6-8 uur (Kock en Burroughs, 2012). De voornaamste bijwerking van ACP is hypotensie ten gevolge van een perifere α -adrenerge receptorblokkade die fataal kan aflopen in situaties waar de cardiovasculaire functie reeds gecompromiteerd is (Swan, 1993). Daarnaast kunnen ook hyperthermie, extra-pyramidale effecten en paradoxale agressie optreden (Kock en Burroughs, 2012). Bij Sikaherten (*Cervus nippon*) en edelherten kan een etorfine/acetylpromazine combinatie relatief veilig aangewend worden. Bij de andere hertensoorten dient men behoedzamer te zijn, aangezien Jones (1984) aantoonde dat het promazine-derivaat de excitatorische effecten van het opioïd onvolledig onderdrukte. Bij damherten kan het zelfs aanleiding geven tot sterfte (Low, 1973; Harrington, 1974). In de vermelde studies werden combinaties van etorfine en acetylpromazine bestudeerd, waardoor de waargenomen effecten misschien eerder te wijten zijn aan onderlinge interactie tussen producten dan aan een van hen afzonderlijk. Verder onderzoek zal het uitwijzen.

Langwerkende neuroleptica verminderen angst, vijandigheid, motorische activiteit en excitatie. Bij dieren die zeer agressief of geëxciteerd zijn, kunnen deze producten de mortaliteit duidelijk verlagen (Kock en Burroughs, 2012). Als langwerkend neurolepticum is voor herten vooral zuclopenthixol noemenswaardig. Men maakt onderscheid tussen enerzijds zuclopenthixol deconaat dat een kalmerend effect induceert gedurende 10-21 dagen (Ebedes en Burroughs, 1992), en anderzijds zuclopenthixol acetaat met een werking van 3 dagen (Read et al. 2000). Ze worden aangewend wanneer bepaalde handelingen met individuen of met kuddes moeten worden uitgevoerd of wanneer een voorafgaande kalmering van een dier aangewezen is (Diverio et al., 1996). Zuclopenthixol is succesvol gebleken bij de wilde wapiti (Read et al., 2000; Woodbury et al., 2001, 2002) en bij wilde edelherten (Diverio et al., 1996). Bij *Afrikaanse antilooptachtigen* worden vooral zuclopenthixol acetaat en perphenazine enanthaat frequent gebruikt. Uitgebreidere informatie over deze producten is beschikbaar in specifieke literatuur.

Butyrophenone derivaten zijn ook tranquillizers met een werking vergelijkbaar met die van de phenothiazines, i.e. een dopaminerge blokkade (Baldessarini, 1992). Tot deze groep behoren

haloperidol, droperidol en azaperone. Butyrophenones kunnen ernstige bijwerkingen veroorzaken, vooral wanneer hoge dosissen worden aangewend (Kock en Burroughs, 2012). Haloperidol is incompatibel met etorfine en fentanyl (Swan, 1993). Combinaties met perphenazine enanthaat zijn succesvol bevonden om speenstress te reduceren bij edelherten (Pollard et al., 1998). Haloperidol kent een relatief lange half-waarde tijd, waardoor het sederend effect gemiddeld 8-12uur aanhoudt. Het is incompatibel met opioïde drugs, zodat het niet in immobiliserende mengsels gebruikt kan worden. Het wordt daarom enkel aangewend bij dieren die reeds geïmmobiliseerd zijn. Men kan het IM of IV toedienen. Het geeft een uitstekend kalmerend effect bij damherten (8-10uur; English, 1984) en bij verschillende antilooptsoorten zoals het rode hartebeest (*Alcelaphus buselaphus caama*), de blesbok, springbok, steenbok (*Raphicerus camperstris*), duiker (*Sylvicapra grimmia*) en dikdik (*Madoqua kirkii*) (Hofmeyr, 1981). Haloperidol is bij antilopen eveneens effectief gebleken als behandeling van stress na het vangen van de dieren (Ebedes en Burroughs, 1992).

Over het gebruik bij herten van droperidol is er weinig informatie beschikbaar in de literatuur.

Azaperone kan IV, IM of SC toegediend worden, waarna het sederend effect binnen 20-30minuten kan verwacht worden. Als tranquillizer is het in de meeste gevallen de *drug of choice* voor chemische immobiliserende combinaties, maar er bestaat geen specifieke antagonist die de effecten ervan kan omkeren. Het sederend effect duurt 2-4uur, waarbij ook vasodilatatie, gedaalde hartslag, sterke pols, toegenomen ademhaling en suppressie van braakneigingen opgemerkt kunnen worden (Kock en Burroughs, 2012). De auteurs rapporteerden voor het gebruik bij wilde dieren echter ook neveneffecten zoals catalepsie, toegenomen agressie en extra-pyramidale stoornissen zoals tandenknarsen en torticollis. Bij herten wordt azaperone meestal niet alleenstaand gebruikt, maar in combinatie met o.a. butorphanol en medetomidine (BAM-mengsel; zie 2.3.1.6). Combinaties met fentanyl en xylazine, worden eveneens frequent aangewend en zijn in sommige landen zelfs commercieel beschikbaar. Haigh (1977) onderzocht deze combinaties bij damherten en stelde vast dat ze acceptabele immobilisatie konden induceren. Hij onderzocht echter slechts enkele dieren waardoor de significantie van de resultaten in vraag kan worden gesteld. Ook bij *Afrikaanse antilooptachtigen* wordt azaperone zeer frequent gebruikt als tranquillizer in combinatiepreparaten. Bij het sederen van gemsbokken (*Oryx gazella*) moet men extra waakzaam zijn omdat deze dieren onder invloed van azaperone opmerkelijk agressief kunnen optreden tegen mensen (Kock en Burroughs, 2012).

Reversal is niet beschikbaar voor de voormelde producten.

3.1.4 De sedativa

De benzodiazepines werden initieel gebruikt in de humane geneeskunde ter behandeling van rusteloosheid en angst. Ze induceren een matige sedatie, diepe spierrelaxatie, ze zijn anti-convulsief en vrij van cardiopulmonaire bijwerkingen. De effecten op het centraal zenuwstelsel ontstaan door de inhibitorische werking van het gamma-amino-boterzuur, GABA (Baldessarini 1992). Benzodiazepines

worden in de diergeneeskunde vooral gebruikt in combinatie met andere anesthetische middelen om de dosis van deze laatste te verlagen. Ze worden ook gecombineerd met producten die uitgesproken spierrigiditeit veroorzaken, zoals de cyclohexamines (Yadav et al., 2001). Benzodiazepines induceren ook een vorm van amnesie, wat zeer waardevol kan zijn wanneer bepaalde wilde dieren meermaals gevangen moeten worden (Kock en Burroughs, 2012).

Diazepam geeft goede spierrelaxatie en werkt anti-convulsief. Men kan het IM, IV, SC en PO toedienen. Met behulp van hoge orale dosissen diazepam hebben Done et al. (1975) kunnen aantonen dat gewone handelingen met damherten mogelijk zijn. Bij edelherten is het kalmeringseffect van diazepam echter heel onvoorspelbaar. Veranderd gedrag, agressie, bijten en slaan werden geconstateerd. Daardoor kunnen de herten gevaarlijk zijn voor zowel de onderzoeker als voor andere dieren en voor zichzelf (Walsh en Wilson, 2002). De onvoorspelbaarheid zou volgens de auteurs ontstaan doordat angst en rusteloosheid worden geremd waardoor de dieren eerder agressiever worden in plaats van rustiger. Vergelijkbare effecten zijn ook aangetoond bij haloperidol (Hofmeyr, 1981) en droperidol (Dohoo et al., 1986). Bij *Afrikaanse antilopeachtigen* blijft het gebruik van diazepam eerder beperkt omdat er betere alternatieven bestaan, waaronder zolazepam.

Zolazepam is 4 keer potenter dan diazepam en kent een zeer snelle inductietijd voor chemische immobilisatie (Dewald et al., 1977). Ook dit product wordt frequent gebruikt voor de sedatie/anesthesie bij herten, veelal in combinatie met het cyclohexamine tiletamine. Edelherten kunnen relatief veilig geïmmobiliseerd worden via tiletamine/zolazepam en xylazine combinaties (Sente et al., 2014). Bij Afrikaanse wilde dieren wordt deze combinatie vooral gebruikt bij wilde carnivoren en minder bij de hertachtigen, omdat daarvoor combinaties met opioïden de voorkeur genieten.

Midazolam is een relatief nieuw product uit de benzodiazepine-groep. Het is potenter en effectiever dan diazepam (Kock en Burroughs, 2012). Het induceert zeer duidelijke amnesie. Bij herten kan midazolam als premedicatie de intensiteit van de stressrespons na chemische immobilisatie verminderen (Munerato et al., 2010). Auer et al. (2010) meldden dat combinaties van midazolam met xylazine/ketamine en detomidine/ketamine vlotte inductie, stabiele anesthesie en recovery na operaties opleverden bij edelherten die geïmmobiliseerd werden met tiletamine/zolazepam en ketamine. In deze studie werden echter respiratoire depressie en milde hypoxemie opgemerkt. Midazolam wordt minder frequent aangewend bij *Afrikaanse antilopeachtigen* (Kock en Burroughs, 2012).

Reversal is mogelijk via flumazenil (Kock en Burroughs, 2012).

3.1.5 De imidazolegroep, $\alpha 2$ -agonisten

Deze sedativa zijn $\alpha 2$ -agonisten die voorspelbare en dosisafhankelijke sedatie en analgesie induceren. Ze binden op de $\alpha 2$ -adrenerge receptoren op het pre- en post-synaptische niveau waardoor een inhibitie van de transmissie en aldus sedatie optreedt (Aghajanian en Van der Maelen,

1982). Analgesie wordt vooral spinaal bedongen (Xu et al., 2000). Ze kunnen op verschillende manieren toegediend worden zonder irritatie te veroorzaken. Ze hebben een korte latentietijd voor inductie en er bestaan specifieke reversal producten om sedatie en analgesie op te heffen.

Xylazine is een van de meest gebruikte producten in de diergeneeskunde, ook bij herten. Efficiënte dosissen verschillen duidelijk van individu tot individu (Fletcher, 1974) en ook tussen verschillende hertensoorten (Jones, 1984). Hogere dosissen zijn nodig om een goede sedatie en analgesie te bekomen bij in het wild levende herten en bij sterk geëxciteerde dieren (Renecker en Oldsen, 1986). Goede spierrelaxatie wordt bekomen, maar daarnaast kunnen bijwerkingen optreden die het cardiovasculair-, gastro-intestinaal- en pulmonair systeem treffen. Xylazine legt de motiliteit van de pens stil en kan aanleiding geven tot *tympanie*, regurgitatie en mogelijk aspiratiepneumonie wanneer het dier zich in laterale decubitus bevindt (Toutain et al., 1982; Ruckebusch en Allal, 1987). De dieren worden best in sternale positie geplaatst na het verdoven. Na toediening in het laatste trimester van de dracht kan abortus optreden (Kock en Burroughs, 2012). De auteurs raden bij drachtige dieren het gebruik van medetomidine of detomidine aan. Martínez et al. (2008) en Martínez-Pastor et al. (2009) beschreven dat de Iberische edelherten uit hun onderzoek succesvol gesedeerd en onder anesthesie gebracht konden worden na intraveneuze toediening van 0,75mg/kg xylazine, gepaard met 1,5mg/kg ketamine. Gezien men meestal wilde, onvoorspelbare dieren wil onderzoeken in verschillende situaties, kan laatst genoemde methode minder waardevol zijn, doordat men geen anesthetische middelen IV kan toedienen bij deze dieren. Xylazine wordt ook zeer frequent aangewend bij *Afrikaanse antilopeachtigen*.

Detomidine en **medetomidine** zijn eveneens α_2 -adrenerge agonisten, met een hogere affiniteit dan xylazine voor alle subtypes van α_2 -adrenerge receptoren (Schwartz en Clark, 1998; Kock en Burroughs, 2012). Studies bij edelherten hebben aangetoond dat depressie van het cardiovasculair en respiratoir stelsel zowel optreedt bij equipotente toediening van detomidine als van xylazine. Bij xylazine duurden deze effecten echter langer (Bouma et al., 1988). Sedatieduur was dezelfde bij beide producten. Dit staat in contrast met studies bij paarden waarbij gevonden werd dat het sedatief effect van detomidine groter was en langer duurde dan bij xylazine (Jochle en Hamm, 1986). Bij edelherten werd vastgesteld dat de inductietijd en de tijd tot maximale sedatie sneller was voor detomidine dan voor xylazine. Opvallend is, dat een hoge dosis detomidine vaak resulteert in sedatie en analgesie in sternale decubitus. Dit kan zeer positief zijn om regurgiteren en aspiratiepneumonie te voorkomen (Bouma et al., 1988). Er zijn weinig vergelijkende studies in de literatuur te vinden over het gebruik van medetomidine met andere producten bij edelherten. Medetomidine is ook een onderdeel van het BAM-mengsel, waarover later meer. Net als xylazine, worden detomidine en medetomidine ook bij *Afrikaanse antilopeachtigen* frequent aangewend.

Reversal van de α_2 -agonisten kan gebeuren met verschillende producten. Specifieke α_2 -adrenerge antagonist werken superieur en intraveneuze toediening is de meest gewenste toedieningsroute (Brondke en Kowollik, 1988). De beschikbaarheid van de α_2 -adrenerge antagonist yohimbine en atipamezole en de α_2 -adrenerge-antagonist/histamine-antagonist tolazoline (Sanders, 1975), heeft het gebruik van deze producten in de hertenhouderij relatief populair gemaakt. Het reversal product wordt

best traag ingespoten zodat hypotensie en tachycardie voorkomen kunnen worden of beperkt blijven (Maze en Tranquilli, 1991). In de praktijk wordt frequent geopteerd om de benodigde dosis van het antidoot op te splitsen tussen IV en IM toediening. Op deze manier wordt de graad van bijwerkingen die vaak ontstaan door hoge IV dosissen van het product door toediening van het reversal gereduceerd. Er wordt bovendien een langere werking van het antidoot bekomen (Caulkett et al., 2000). Mackintosh en Van Reenen (1984a) en Renecker en Olsen (1986) onderzochten het effect van de combinatie yohimbine en 4-aminopyridine op het omkeren van de sedatie en anesthesie bij edelherten. De reversal was succesvol in deze onderzoeken, al noteerden Mackintosh en Van Reenen (1984a) sporadisch het optreden van convulsies tijdens de recovery. De oorzaak van het optreden van deze convulsies ligt volgens Mackintosh en Van Reenen (1984b) bij het accidenteel aanprikken van de arteria carotis. Yohimbine is minder efficiënt in het omkeren van de detomidine-geïnduceerde chemische immobilisatie dan atipamezole (Bouma et al., 1988). Atipamezole wordt geacht het meest efficiënte antidoot te zijn voor het omkeren van α_2 -agonisten.

Ook bij *Afrikaanse hertachtigen* hebben Yohimbine en atipamezole vergelijkbare eigenschappen en worden zeer vaak aangewend.

3.1.6 Butorfanol – Azaperone – Medetomidine (BAM)

Siegal-Willot et al. (2009) onderzochten de effecten van een **BAM-combinatie** voor chemische immobilisatie bij witstaartherten. Ze gebruikten een concentratie van 0.58 mg/kg butorfanol - 0.37 mg/kg azaperone - 0.19 mg/kg medetomidine. De bekomen sedatie/anesthesie was bij de dieren in dit onderzoek redelijk betrouwbaar, veilig en kortwerkend. De anesthesie kan omgekeerd worden door intramusculaire toediening van atipamezole (3mg/ mg medetomidine) of tolazoline (100mg/ 10mg medetomidine) en naltrexone (50mg/ 30mg butorphanol). De omkering van de anesthesie is meestal volledig na minder dan 10 minuten. Volgens de auteurs ligt het grootste nadeel van BAM-combinaties, in de lange tijd voor inductie en reversal. Persoonlijke communicatie met verschillende praktijk-dierenartsen bevestigden deze stelling. In de praktijk zijn BAM-combinaties bij herten vooral nuttig in kralen of hokken waar de dieren niet ver kunnen weglopen. Voor vrij-levende dieren worden eerder mengsels met opioïden aangeraden, omdat ze een zeer snelle inductie van anesthesie opleveren. Miller et al. (2009) rapporteerden dat BAM-combinaties bij witstaartherten in gevangenschap een gelijkaardige inductietijd kenden als combinaties met xylazine/ketamine en medetomidine/ketamine, en dit zonder risico's op hyperthermie. Specifiek voor het damhert heeft de BAM-combinatie echter onvoldoende acceptabele resultaten opgeleverd. In deze gevallen is het beter een tiletamine/zolazepam en xylazine (1:1) combinatie aan te wenden. Over het gebruik van BAM-combinaties bij edelherten is de literatuur nog schaars. BAM-combinaties worden wel gebruikt bij kleine en mini-antiloopsoorten zoals de impala, de dik-dik en de duiker (Kock en Burroughs, 2012).

Reversal van BAM-mengsels kan gebeuren via combinaties van naltrexone (2x dosis butorphanol) en atipamezole (5x dosis medetomidine) (Siegal-Willott et al., 2009; Kock en Burroughs, 2012) of naltrexone, tolazoline en atipamezole in verschillende verhoudingen (Miller et al., 2009).

3.1.7 Conclusie

Chemische immobilisatie van wilde dieren, zoals herten en *Afrikaanse antilopeachtigen*, is een riskante onderneming waarbij veel fout kan gaan. Men moet er dus voor zorgen dat anesthesie zo vlot en veilig mogelijk verloopt. Voor informatie omtrent veilige producten en dosissen bij herten is men vooral aangewezen op academische literatuur. Voor *Afrikaanse antilopeachtigen* is de situatie anders. Er is reeds veel onderzoek verricht naar chemische immobilisatie bij deze diersoorten en er zijn verschillende goede handboeken beschikbaar.

In de hertenhouderij is xylazine het meest aangewende preparaat voor chemische immobilisatie. Xylazine/ketamine combinaties, zoals in de *Hellabrunner mix*, zijn het meest aangewezen bij damherten. Daarnaast kan men voor de sedatie/anesthesie van herten verschillende andere opties overwegen, de ene al efficiënter dan de andere. De potente opioïden, enkelvoudig of gebruikt in combinaties, kunnen een alternatief zijn voor xylazine maar mogen enkel gebruikt worden door personen met kennis van zaken. Gezien het reële gevaar voor de gebruiker van deze potente opioïden, zijn ketamine en tiletamine/zolazepam misschien betere alternatieven voor personen met beperkte ervaring. Combinaties van producten leiden vaak tot hypoxemie en gerelateerde complicaties. Daarom wordt best supplementaire zuurstof aangelegd (Caulkett et al., 2000; Read et al., 2001). Ook het aanwenden van langwerkende neuroleptica of neurolepticum/sedativumcombinaties voor chemische immobilisatie kan overwogen worden ter vervanging van xylazine, bijvoorbeeld wanneer men een ingreep wil uitvoeren die lang zal duren. Onder meer bij edelherten zijn de effecten van BAM-combinaties op de sedatie/anesthesie nog onvoldoende beschreven in de literatuur. Verder onderzoek is aangewezen.

Bij *Afrikaanse antilopeachtigen* zijn de opioïden, aangevuld met azaperone, de *drug of choice*.

Tabel 5: Tabel met de anestetica en sedativa, de *drugs of choice*, aangewezen bij de *Afrikaanse antilopeachtigen* (Op basis van Kock en Burroughs, 2012). De producten, die volgens de auteurs steeds de voorkeur genieten, worden eerst in de lijst vermeld.

Soort	Sexe	Primaire drug	Sedativum/Tranquillizer	Antidoot	Opmerkingen
Bontebok, Blesbok (Resp. <i>Damaliscus pygargus</i> ; <i>Damaliscus pygargus phillipsi</i>)	M/V	Etorphine 3mg of Thiafentanil 3mg	Azaperone 40mg Azaperone 40mg of Xylazine 5mg of Detomidine 3-5mg	Diprenorphine 6-9mg Naltrexone 45-60mg " "	Etorphine + thiafentanil kan. Yohimbine of atipamezole voor reversal α 2-agonisten alvorens reversal opioïd.
Impala (<i>Aepyceros melampus</i>)	M	Thiafentanil 1-1,25mg of Etorphine 1,5-3mg of Fentanyl 10-15mg Butorphanol 16mg	Azaperone 15-30mg of Medetomidine 2-3mg of Midazolam 15mg Additie butorphanol 5mg Azaperone 40mg, medetomidine 2mg	Naltrexone 25mg, atipamezole x5 dosis medetomidine. Diprenorphine 2,5-8mg, atipamezole zoals hierboven. Diprenorphine 6-9mg, atipamezole " Naltrexone 32mg, atipamezole "	Zeer gevoelig aan opioïden. Additie van 5mg butorphanol heeft reeds goede resultaten geboekt in de daling van de mortaliteit. Sedativa antidota meestal niet nodig.
Grote koedoe (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>)	M	Thiafentanil 6-8mg of Etorphine 8-12mg	Azaperone 100mg of Detomidine 10mg of Midazolam 30mg of Medetomidine 5-6mg Zoals hierboven.	Naltrexone 80mg, atipamezole x5 dosis (me)detomidine. Diprenorphine 30mg, atipamezole zoals hierboven.	Sedativum antidoteren meestal niet nodig.
Kleine koedoe (<i>Tragelaphus imberbis</i>)	M	Etorphine 4-6mg	Xylazine 10-20mg	Diprenorphine 6-9mg, atipamezole x5 dosis medetomidine.	
Elandantilope (<i>Taurotragus oryx</i>)	M/V	Thiafentanil 15-20mg of Etorphine 10-14mg	Azaperone 150-200mg of Xylazine 80-100mg of Detomidine 15-20mg of Medetomidine 15-20mg Zoals hierboven.	Naltrexone 100-140mg, Yohimbine 1ml/50kg, Atipamezole, x5 dosis medetomidine Zoals hierboven.	Temperatuur frequent nagaan. Species moeilijk te immobiliseren. Ev. diprenorphine 24-36mg in plaats van naltrexone 100-140mg.
Livingstone eland (<i>Taurotragus derbianus</i>)	M	Thiafentanil* of Etorphine 14mg of Carfentanil 6mg	Xylazine 80mg of Azaperone 100-150mg Xylazine 150mg	Naltrexone 150mg Diprenorphine 24mg of Naltrexone 150mg, Atipamezole 8mg Naltrexone 600mg, Tolazoline 525-600mg	* Thiafentanil wordt beschouwd als de <i>drug of choice</i> maar verder onderzoek is aangewezen bij deze diersoort. Thiafentanil (5mg) + etorphine (8mg) is ook efficiënt gebleken. Temperatuur frequent nagaan. Species moeilijk te immobiliseren.

Soort	Sexe	Primaire drug	Sedativum/Tranquillizer	Antidoot	Opmerkingen
Gemsbok (<i>Oryx gazella</i>)	M	Thiafentanil 6-8mg of	Medetomidine 5-7mg of Xylazine 15-30mg of Detomidine 10mg of Azaperone 100mg	Naltrexone 60-80mg, yohimbine 1ml/50kg of atipamezole x5 dosis (me)detomidine.	
		Etorphine 6-8mg	Zoals hierboven.	Zoals hierboven.	Diprenorphine 20mg kan naltrexone substitueren.
Sabelantilope (<i>Hippotragus niger</i>)	M	Thiafentanil 6-8mg of	Azaperone 80-100mg of Medetomidine 2-3mg of Detomidine 2-3mg of Xylazine 10-15mg	Naltrexone 90-120mg, atipamezole x5 dosis (me)detomidine of yohimbine 1ml/50kg.	Sedativum antidoteren meestal niet nodig. Gebruik hyaluronidase: 1500-3000IU. Ketamine 50-100mg IV voor extra sedatie kan aangewend worden.
		Etorphine 6-8mg	Zoals hierboven.	Naltrexone 90-120mg of Diprenorphine 12-20mg, atipamezole of yohimbine zoals hierboven.	Azaperone en een α 2-agonist worden vaak gemixt. Sabels zijn gevoelig aan α 2-agonisten, reversal is daarom zeker aan te raden bij drachtige en zieke dieren.
Roan-antilope (<i>Hippotragus equinus</i>)	M	Thiafentanil 6-10mg of	Azaperone 60-100mg of Medetomidine 5-6mg of Detomidine 3-5mg of Xylazine 20-30mg	Naltrexone 75-100mg, atipamezole x5 dosis (me)detomidine of yohimbine 1ml/50kg.	Sedativum antidoteren meestal niet nodig. Gebruik hyaluronidase: 1500-3000IU. Azaperone en een α 2-agonist worden vaak gemixt.
		Etorphine 6-8mg	Zoals hierboven.	Diprenorphine 20mg, atipamezole of yohimbine "	Roans zijn gevoelig aan α 2-agonisten, reversal is daarom zeker aan te raden bij drachtige en zieke dieren.
Springbok (<i>Antidorcas marsupialis</i>)	M/V	Thiafentanil 0,5-1mg of	Azaperone 10-20mg of Medetomidine 1mg of Xylazine 2-5mg	Naltrexone 10-15mg.	Sedativum antidoteren meestal niet nodig. Springbokken zijn gevoelig aan respiratoire suppressie door de opioïden.
		Etorphine 0,5mg of	Zoals hierboven.	Diprenorphine 2-3mg.	Reversal van de α 2-agonisten is aangeraden bij drachtige en zieke dieren - geef x5 dosis medetomidine atipamezole.
		Fentanyl 10-15mg	Zoals hierboven.	Diprenorphine 2,5mg.	
Waterbok (<i>Kobus ellipsiprymnus</i>)	M	Thiafentanil 6-7mg of	Azaperone 100-150mg of Detomidine 5-6mg of Xylazine 5-10mg of Medetomidine 6-7mg	Naltrexone 90-100mg, atipamezole x5 dosis (me)detomidine.	Thiafentanil is de <i>drug of choice</i> bij waterbokken.
		Etorphine 6-7mg	Zoals hierboven.	Diprenorphine 12-15mg, atipamezole zoals hierboven.	

3.2 SPERMACOLLECTIE

Spermacollectie bij hertenbokken is een van de aspecten die artificiële inseminatieprogramma's minder toegankelijk maken. De toepassing van deze technieken is niet wijdverspreid in de hertenkwekerij. Spermacollectie kan gebeuren via een natuurlijke methode, maar ook door elektro-ejaculatie of via *post-mortem* collectie. Deze methoden worden verder toegelicht. Vooraf dient gesteld te worden dat er seizoengebonden beperkingen zijn. Mannelijke dam- en edelherten vertonen in gematigde streken tijdens de lente en de zomer een duidelijke periode van testiculaire inactiviteit en van seizoengebonden infertiliteit (Lincoln, 1971; Krzywinski en Jaczewski, 1978; Asher et al., 1987; Gosch en Fischer, 1989; Asher et al., 1993). Bokken zijn in de bronstperiode vaak onvoorspelbaar en agressief. Bij het aanwenden van natuurlijke spermacollectie-technieken vormen ze een gevaar voor zichzelf, maar ook voor koppelgenoten, onderzoeker en personeel. Daarom gebeurt spermacollectie met behulp van elektro-ejaculatie zeker bij dam- en edelherten meestal onder algemene sedatie en anesthesie (Jaczewski en Jasiorowski, 1974; Asher et al., 1987, 1988b,c; Fennessy et al., 1987, 1990; Gosch en Fischer, 1989). Het gebruik van chemische immobilisatie houdt duidelijke risico's in, wat zeker belangrijk is bij waardevolle dieren.

Spermastalen van herten kunnen op verschillende manieren bekomen worden. Drie methoden worden het meest toegepast, namelijk elektro-ejaculatie (EE), via artificiële vagina's en *postmortale* (PM) collectie. (Garde et al., 1997; Asher et al., 2000; Soler et al., 2003a; Giżejewski, 2004). Andere methoden zoals een inwendige kunstmatige vagina (Giżejewski, 1991; Jabbour en Asher, 1991) of rubberen sponzen in de vagina (Landowski, 1964) kunnen eventueel ook worden overwogen maar vragen een doorgedreven training van de bok en worden daarom minder vaak toegepast. Bij *Afrikaanse antilopeachtigen* zijn vooral EE en PM-collectie gebruikelijk.

3.2.1 Elektro-ejaculatie (EE)

Electro-ejaculatie werd voor het eerst bij hertachtigen beschreven door Bierschwal et al. (1970) en later door Jaczewski en Jasiorowski (1974). Het is de meest efficiënte en meest gebruikte manier om bij herten spermastalen te bekomen. De methode wordt nu een 40-tal jaren toegepast (Martínez et al., 2008) en kan routinematig uitgevoerd worden in hertenkwekerijen. EE is relatief gemakkelijk uit te voeren en levert stalen op met hoog volume door toegenomen secretie van de accessoire geslachtsklieren en epididymis. Voor elektro-ejaculatie moeten de dieren natuurlijk eerst gevangen worden of in gevangenschap leven, vervolgens is het nodig ze te sederen en onder anesthesie te brengen. Ondanks het risico geassocieerd met de verdoving, is geen specifieke training voor de afnemer vereist en de methode vergt weinig tijd. Men kan elektro-ejaculaties gedurende het hele jaar uitvoeren, maar de stalen die tijdens de zomer verzameld worden bevatten meestal geen motiele spermatozoa. Verschillende auteurs rapporteren dat spermatozoa bekomen via elektro-ejaculatie, fertiel zijn en zowel via laparoscopische-intra-uteriene als via cervicale inseminatie aanleiding kunnen geven tot nakomelingen (Jabour et al., 1997; Gorden, 1997; Asher et al., 2000; Garde et al., 2006).

Hoewel het percentage beweeglijke zaadcellen ongeveer gelijkwaardig is tussen epididymale en geëjaculeerde spermastalen, is de kwaliteit van de beweging samen met het percentage normale zaadcellen en intacte acrosomen, hoger bij ejaculatie (Martínez et al., 2008). In hun onderzoek, toonden deze auteurs verder aan dat de totale hoeveelheid spermatozoa bekomen via elektro-ejaculatie, niet gecorreleerd is met de leeftijd. Bij *post-mortem collectie* is de hoeveelheid spermatozoa per spermastaal wel significant gecorreleerd met de leeftijd. Dit is volgens de auteurs niet enkel te wijten aan het verschil in testiculaire grootte van oudere dieren ten opzichte van jongere maar ook aan het feit dat spermatogenese efficiënter verloopt bij oudere dieren. Volgens de auteurs geeft de elektro-ejaculatie techniek zeer variabele resultaten omwille van verschillende factoren, waarbij stress, anesthesie, stimulatie en het dier zelf de variabiliteit verklaren. De variabele resultaten zouden volgens de auteurs niet aan de elektro-ejaculatie techniek zelf te wijten zijn, omdat ze in een eerder onderzoek (Martínez-Pastor et al., 2006) al aantoonde dat elektro-ejaculatie voor een goede afname van spermatozoa uit het cauda epididymis reservoir zorgt.

Martínez-Pastor et al. (2009) meldden dat stalen voor elektro-ejaculatie best in aparte fracties worden afgenomen, omdat de zaadlozing bij herten gefractioneerd verloopt. Een van de fracties bevat typisch een veel hogere concentratie aan spermatozoa dan de andere. Dit werd eerder al aangetoond door Gizejewski et al. (2003). Gizejewski et al. (2004) stelden vast dat sperma-afname in aparte fracties met behulp van elektro-ejaculatie of gewone artificiële vagina's niet mogelijk is. Gizejewski et al. (2000, 2004) ontwikkelden dan weer een gemodificeerde artificiële vagina, waarbij gescheiden opname van de aparte fracties wel mogelijk is.

Het gefractioneerd collecteren van zaadlozingen wordt door Martínez-Pastor et al. (2009) aanbevolen omdat bij EE contaminatie door urine en door secreties van de accessoire geslachtsklieren frequenter optreedt. Vanuit praktisch oogpunt kan het voor cryopreservatie van stalen gemakkelijker zijn om het hele ejaculaat op te vangen in eenzelfde tube, urine gecontamineerde tuben te verwijderen samen met de gele secreties van de bulbo-urethrale klier (Gizejewski et al., 2003). Op die manier kunnen alle spermatozoa in het staal gebruikt worden en niet enkel de fractie die het rijkste is aan spermatozoa. Men moet er echter rekening mee houden dat dergelijke stalen een hogere hoeveelheid seminaal plasma bevatten, dat schadelijk kan zijn voor de zaadcellen. Hierop wordt verder ingegaan in sectie 2.4 *Sperma beoordeling*.

3.2.2 Artificiële vagina

Verschillende (Poolse) onderzoekers hebben naar methoden gezocht om sperma van edelherten op een natuurlijke manier te bekomen (Krzywinski, 1976; Strzezek et al., 1985; Gizejewski, 2004). Ze maakten bijvoorbeeld gebruik van een artificiële vagina en stelden vast dat ze kwalitatief goede stalen konden bekomen (Gizejewski, 2004; Ungerfeld et al., 2008). Hoewel deze methode minimaal invasief is, dienen de bokken wel een adequate en doorgedreven training en gewenning te ondergaan. Dit is vaak moeilijk te realiseren. Omdat herten tijdens de bronstperiode onvoorspelbaar en agressief kunnen reageren, kan deze methode gevaarlijk zijn voor de afnemer (Asher et al., 2000). De techniek

geeft wel goede resultaten bij rendieren die veel gemoedelijker van aard zijn (Dott en Utsi, 1973). Onafgezien van de potentiële voordelen, is het gebruik van een artificiële vagina in de hertensector dus weinig gangbaar.

3.2.3 Postmortem collectie

Spermatozoa kunnen ook postmortaal bekomen worden. In de literatuur wordt meer en meer melding gemaakt van het nut en het gebruik van **epididymaal gewonnen sperma**. De techniek is ontstaan vanuit interesse voor het winnen van zaadcellen van gestorven waardevolle dieren op boerderijen, en van trofeedieren, geschoten tijdens de jacht. Men wilde waardevol genetisch materiaal opnieuw inzetten in dezelfde of in een andere populatie (Platz et al., 1982; Gizejewski et al., 1998; Martínez-Pastor et al., 2005a,b). Epididymaal gewonnen spermatozoa verschillen van geëjaculeerde zaadcellen, maar verschillende studies toonden aan dat spermatozoa bekomen via deze methode ook ingevroren kunnen worden, om dan vervolgens gebruikt te worden voor kunstmatige inseminatie of in vitro fertilisatie (Zoborszky et al., 1999; Comizzoli et al., 2001; Soler et al., 2003; Zoborszky et al., 2005; Gomendio et al., 2006; Fernández-Santos et al., 2006a,b; Martínez-Pastor et al., 2006).

Sperma kan postmortaal bekomen worden door de *cauda epididymis* door te snijden met een bistouri (Soler et al., 2003a, 2005; Zoborszky et al., 2005), of door retrograde flushing van de *vas deferens* en de *proximale cauda epididymis* (Garde et al., 1997; Comizzoli et al., 2001). Deze technieken werden vergeleken en de hoeveelheid gevonden spermatozoa was gelijkwaardig bij allebei (Martínez-Pastor et al., 2006c). Bij epididymale spermatozoa ontbreekt het seminaal plasma.

Sperma dient binnen 24 uur na sterfte gecollecteerd te worden en de testikels dienen zo snel mogelijk gekoeld bewaard te worden, wat niet altijd een sinecure is bij wilde dieren. Spermaparameters zijn afhankelijk van de tijdsperiode tussen sterfte en spermacollectie. Soler et al. (2003a) rapporteerden dat tijdelijke opslag van de testes bij 5°C ervoor kan zorgen dat de plasmamembraan van de zaadcellen tot 4 dagen na sterfte bewaard kan blijven. Het percentage morfologisch normale spermatozoa bleef behouden tijdens de eerste drie dagen van de opslag. In een latere studie zagen dezelfde auteurs dat de motiliteit van de zaadcellen die gedurende 96 uur bewaard bleven in de epididymis niet significant veranderde. Na cryopreservatie werd wel een daling van de motiliteit genoteerd bij zaadcellen die 46 uur of langer bewaard bleven (Soler et al., 2005). Fernández-Santos et al. (2009a) toonden aan dat de spermamotiliteit na invriezen zelfs na 96 uur bewaring bij 5°C nog goed genoeg was om de opslag van spermastalen met lange *post-mortem* tijd te overwegen. Malcotti et al. (2012) zagen acceptabele motiliteit van spermacellen na ontdooiing, zelfs na 30 uur bij bewaring aan 20°C.

Het postmortaal winnen van epididymale zaadcellen is bij verschillende hertensoorten succesvol gebleken, vooral bij edelherten (Krzywinski, 1981; Garde et al., 1997; Soler et al., 2003a), bij witstaartherten (Jacobson et al., 1989) en bij sika herten (Hishinuma et al., 2003). Het is ook succesvol bij *Afrikaanse antilopeachtigen*, zoals de impala, de blesbok en de springbok (Loskutoff et al., 1996; Herrick et al., 2004; Chatiza et al., 2011, 2012).

3.3 SPERMABEWARING: VERDUNNEN EN INVRIEZEN

Ook bij herten en bij *Afrikaanse antilopeachtigen* is het bewaren van sperma een zeer belangrijke stap voor ART, evenals voor het aanleggen van spermabanken (Garde et al., 2006; Chatiza et al., 2011). Het is een van de meest kritieke stappen omdat het fertiele karakter van de zaadcellen behouden moet blijven. Dit wordt door veel factoren beïnvloed. Hierna volgt een opsomming van belangrijke aspecten die in de literatuur vermeld worden in verband met spermabewaring.

3.3.1 Algemene principes

De kwaliteit van sperma wordt rechtstreeks in verband gebracht met manipulatietechnieken en met de bewaring van het zaad. Om optimale bevruchtungskansen na te streven moet getracht worden om deze processen zo gunstig mogelijk te laten verlopen. Over het algemeen overleven 40-50% van de zaadcellen het invriesproces niet, zelfs wanneer optimale protocollen worden gebruikt. Als men het percentage motiele zaadcellen van een vers spermastaal vergelijkt met dat van een staal na cryopreservatie stelt men vast dat ook de levensvatbare cellen worden aangetast door het invriesproces, dit resulteert in een gedaalde motiliteit en dus verminderde vruchtbaarheid (Watson, 2000). Het is daarom belangrijk om zo efficiënt mogelijke protocollen te ontwikkelen waarbij zoveel mogelijk levensvatbare en motiele zaadcellen behouden blijven.

Met dit doel kunnen **verdunners** aangewend worden. Een goede verdunner moet de zaadcel beschermen tegen te snelle afkoeling, i.e. het ontwikkelen van schadelijke ijskristallen. Hij moet ook voedingsstoffen bevatten die het metabolisme van de zaadcel ondersteunen en hij moet een goede bufferende werking bezitten om het geproduceerde melkzuur uit het anaerobe metabolisme op te vangen. De verdunner moet instaan voor de juiste osmolariteit en elektrolytenbalans, hij moet de kiemgroei remmen en het volume van het ejaculaat vergroten zodat meerdere dosissen van het sperma bereid kunnen worden. Tenslotte moeten de spermatozoa ook beschermd worden tijdens het invriesproces (Watson, 2000).

Een voor een bepaalde diersoort efficiënte verdunner moet dus aan een aantal voorwaarden voldoen en verschillende componenten bevatten (op basis van Watson, 2000):

- Een beschermer tegen koude-shock is essentieel. Koude-shock treedt op wanneer koeling van 30°C tot 0°C te snel wordt uitgevoerd. De koude-shock is proportioneel met de koelingstemperatuur, met het temperatuurverschil en met het tijdsinterval (Watson, 1981). Koude-shock heeft sterk nadelige effecten op de zaadcellen, daarom dient koeling van het sperma nauwkeurig te gebeuren. Om koude-shock te voorkomen, gebruikt men meestal een verdunner die eidooier of melk bevat. Melk moet eerst 10 seconden op 75-90°C verwarmd worden zodat enkele thermolabele componenten hun spermatotoxiciteit verliezen.
- Als men sperma wil diepvriezen, bijvoorbeeld in koolzuurijs (-79°C) of in vloeibare stikstof (-196°C), dan moeten cryoprotectiva zoals glycerol of dimethylsulfoxide (DMSO) aangewend worden. Het toevoegen of verwijderen van een cryoprotectans vormt een aanzienlijke maar voorbijgaande vorm van osmotische stress voor de plasmamembraan van de zaadcel. De

grootte van deze osmotische stress is afhankelijk van het cryoprotectans (Gao et al., 1993). Een te grote of te geringe hoeveelheid aan cryoprotectans kan ervoor zorgen dat de spermatozoa teveel uitdrogen of barsten vanwege de vloeistofverplaatsing door osmose. Een bepaalde mate van uitdroging is gewenst omdat tijdens het invriesproces ijskristallen kunnen gevormd worden (Watson, 1995; Hammerstedt et al., 1995). De negatieve effecten van ijskristallen op de zaadcel zijn het gevolg van osmotische drukveranderingen in de bevroren fractie (Watson en Duncan, 1988). Ook bij herten is aangetoond dat glycerol en DMSO de vorming van ijskristallen kunnen verminderen en dus gunstig zijn voor de bewaring van het sperma (Fernández-Santos et al., 2006b; Martínez-Pastor et al., 2006b; Fernández-Santos et al., 2007). Te hoge concentraties glycerol zijn evenwel ook toxisch voor de levensvatbaarheid en de fertiliteit van de spermacel (Rudenko et al., 1984; Watson, 1995).

- Een verdunner moet een voedingsbron bevatten om het metabolisme van de zaadcel te ondersteunen. Bij herten gebruikt men meestal suikers als glucose, fructose of lactose (Pintus en Ros-Santaella, 2014). Fernandez-Santos et al. (2007) gaven aan dat ook de invloed van andere suikers onderzocht zou moeten worden.
- Een grote variatie aan buffers kan aangewend worden om de pH en de osmolariteit te stabiliseren. Meestal worden fosfaat-, citraat- of tris (hydroxymethyl)-aminomethaan buffers gebruikt. Sperma is iso-osmotisch met andere lichaamsvloeistoffen zoals bloed en melk, meer bepaald 300mOsm.
- Aan de verdunner moet ook een kiem-groei-remmend middel toegevoegd worden. Hiervoor worden antibiotica gebruikt die niet sperma toxisch zijn zoals: penicillines, streptomycine of neomycine, polymyxine B (colistine) of gentamycine. Er zijn geen specifieke studies uitgevoerd over welke antibiotica wel en niet toxisch zijn voor de zaadcellen van herten.

De afgelopen decennia is er relatief weinig onderzoek gebeurd naar verdunners specifiek voor hertensperma, omdat de huidige bestaande verdunners voldoende acceptabele resultaten geven (Asher et al., 2000; Garde et al., 2006; Martinez-Pastor et al., 2009). Alle verdunners die getest werden bij herten zijn afgeleid van studies bij stieren, bokken of rammen. De meeste verdunners die succesvol gebruikt kunnen worden bij herten zijn afgeleiden van de veel gebruikte suiker-gebaseerde tris en/of citraat-gebufferde verdunners, origineel gebruikt bij kleine herkauwers, waarbij eidooier tegen koude-shock en glycerol als cryoprotectans worden toegevoegd (Krzywinski en Jaczewski, 1978; Evans en Maxwell, 1987; Asher et al., 2000) (zie tabel 6). Kleine aanpassingen hiervan werden vervolgens op grote schaal en met aanvaardbare resultaten toegepast in experimentele en commerciële programma's (Asher et al., 1986; Fennessy et al., 1990, 1991a,b; Haigh en Bowen, 1991).

Tabel 6: Uit de review van Asher et al. (2000)

Twee vaak gebruikte verdunningsformules voor het invriezen van hertensperma	
Citraat-gebaseerde verdunner (Krzywinski en Jaczewski, 1978)	
72 ml 2,9% natrium citraat	
1,25 g fructose	
0,1 g streptomycine sulfaat	
20 ml eidooier	
8 ml glycerol	
Het ejaculaat wordt opgevangen in, of dadelijk verdund met 5 ml verdunner bij 37°C, gekoeld gedurende 2 uur, en verder verdund tot de vereiste concentratie, daarna bevroren in pellets op droog ijs.	
Tris-gebaseerde verdunner (Evans en Maxwell, 1987)	
3,63 g tris (hydroxymethyl) aminomethaan	
0,50 fructose	
1,99 g citraat	
15 ml eidooier	
5 ml glycerol	
0,06 g peniciline G (sodium zout)	
0,1 g streptomycine sulfaat	
Aangelengd tot 100ml met gedistilleerd water. Sperma wordt verdund 1+4 (zaad+verdunner) en langzaam gekoeld (1,5 - 2 u). daarna bevroren in pellets op droog ijs of in vloeibare stikstof LN2 damp in rietjes	

Gezien de grote potentiële voordelen van het invriezen van sperma, hebben specifieke studies voor herten toch verschillende verdunners en verschillende concentraties van cryoprotectantia en eidooier geëvalueerd. Er wordt verder ingegaan op informatie over dam- en edelherten en over 3 soorten *Afrikaanse antilopeachtigen*, met name de springbok, de impala en de blesbok.

3.3.2 Spermabewaring bij edelherten

Vergeleken met alle andere soorten hertachtigen is er veel onderzoek gevoerd naar de aspecten van afname, fysiologie en opslag van sperma bij edelherten. In Nieuw-Zeeland is het gebruikelijk om sperma opgeslagen in vloeistof (i.e. bewaard bij omgevingstemperatuur) aan te wenden bij KI bij edelherten. Dit gebeurt vooral wanneer donorherten gehuisvest zijn op hetzelfde terrein of wanneer geweten is dat het sperma van bepaalde dieren niet goed overleeft na invriezen en ontdooien. Spermakwaliteit van edelherten kan met succes gehandhaafd worden bij omgevingstemperatuur (15-20°C) voor een periode van 2 tot 24 uur voor inseminatie (Asher et al., 2000). Vroegtijdig aanlengen van het sperma met beschermende buffers, gevolgd door trage (4u) koeling van 30°C tot 15°C, vermindert het optreden van koude-shock (Asher et al., 2000). Meestal lengt men aan met normale verdunners voor invriezen zonder cryoprotectantia.

Tot voor kort zijn er slechts weinig pogingen gedaan om alternatieve **verduunners** voor sperma van edelherten te evalueren. Veldhuizen (1994) onderzocht de combinatie van vijf verduunners en drie verschillende cryoprotectantia op sperma bekomen door **elektro-ejaculatie**. Als verduunners vergeleek hij natriumcitraat-eidooier (Krzywinski en Jaczewski, 1978), tris-glucose-citraat-eidooier (Evans en Maxwell, 1987), magere melk-eidooier (Vinha en Coughrough, 1972), lactose-eigeel (Dott en Utsi, 1973) en een synthetisch oplosmiddel voor ramsperma, RSD-1 (Upreti et al., 1995). De cryoprotectantia die geëvalueerd werden waren glycerol, propaan-1,2-diol (PROH) en dimethylsulfoxide (DMSO). Het sperma vertoonde de hoogste motiliteit van $56.7 \pm 8.4\%$ na ontdooien en incubatie met tris-citraat-eidooier en glycerol aan 50% van de normale verhouding. De lactose-eigeel-glycerol combinatie was de beste buffer voor het behoud van de acrosoom-integriteit. Ondanks schijnbare verschillen, toonde *in vivo* evaluatie op basis van bevruchtingsresultaten na laparoscopische intra-uteriene kunstmatige inseminatie aan dat er praktisch geen verschillen zijn tussen natriumcitraat, tris-citraat en lactose gebaseerde verduunners (Veldhuizen, 1994). Volgens de auteur suggereren de lage bevruchtingspercentages dat andere factoren dan spermakwaliteit in het spel zijn. Martínez-Pastor et al. (2006b) rapporteerden eveneens dat spermatozoa, bekomen via elektro-ejaculatie, succesvol kunnen ingevroren worden met Tres-Tris-fructose (20% eidooier en 4% glycerol). Soler et al. (2003) behaalden eveneens goede resultaten met een Tris verdunder met 2,5% eidooier en 5% glycerol.

Martinez-Pastor et al. (2009) testten zowel zelfgemaakte (e.g. TES-Tris-fructose eidooier) als commerciële verduunners (Triladyl®, Andromed® en Bioxcell®) op edelhertensperma, eveneens bekomen via elektro-ejaculatie. Triladyl® (met 20% eidooier) en Andromed® bewaarden de kwaliteit van het edelhertensperma goed na cryopreservatie. De invloed van beide verduunners op de kwaliteit van de bewaring van het sperma verschilde niet significant. Bij Triladyl® wordt de acrosoom-integriteit het beste bewaard (Maxwell et al., 2007; Martínez-Pastor et al., 2009), terwijl Andromed® geen componenten bevat van dierlijke afkomst. Beide verduunners zijn dus zeer goede alternatieven voor het verdunnen en invriezen van sperma in praktijkomstandigheden op hertenkwekerijen. Martinez-Pastor et al. (2009) rapporteerden dat de spermarijke fractie niet alleen meer motiele en levensvatbare zaadcellen oplevert, maar ook beter in te vriezen is, en meer motiele zaadcellen behoudt na ontdooien. Soler et al. (2003a, 2005) bevestigden de eerder vastgestelde positieve resultaten met Triladyl®. Daarnaast hebben ook verschillende andere studies aangetoond dat Triladyl® succesvol gebruikt kan worden bij andere wilde herkauwers, zoals het axisert (Haigh et al., 1993) en ook de dama, de edmi- en de dorcas-gazellen (Garde et al., 2003).

Ook voor **epididymaal** gewonnen spermatozoa van het edelhert werkt Triladyl® goed als verdunder (Esteso et al., 2003; Soler et al., 2003; Malo et al., 2005; Zomborszky et al., 2005). Epididymale spermatozoa kunnen het best ingevroren worden met een Tres-Tris-fructose-verdunder (Martínez-Pastor et al., 2005c, 2006a,b,c) of met Tris-citraat-fructose (Fernández-Santoz et al., 2006a,b,c).

Men is voor het **invriezen** van edelhertensperma geneigd om protocollen te volgen die ontwikkeld zijn voor schapen en runderen. Spermatozoa van edelherten lijken het invriezen en ontdooien relatief goed te doorstaan. In verschillende verdunder/cryoprotectans formules hebben ze over het algemeen

na ontdooien een aanvaardbaar overlevingsniveau van 30-70% (Haigh et al., 1985, 1986; Asher et al., 1988b; Fennessy et al., 1990; Veldhuizen, 1994; Zomborszky et al., 1999). Volgens Krzywinski en Jaczewski (1978) en Mulley et al. (1988) kan hertensperma goed als pellets ingevroren worden op CO₂-ijs, na verdunning met een natrium citraat-eidooier-glycerol-verdunner, of in 0.25ml rietjes in vloeibare stikstof (Asher et al., 1988b,c; Fennessy et al., 1990).

Martínez-Pastor et al. (2006b, 2009) adviseren dat men best 4% glycerol toevoegt om een optimale cryoprotectie te garanderen. Fernández-Santos et al. (2005) rapporteerden bij edelherten dat glycerol (3%) de kwaliteit van bevroren epididymale zaadcellen het beste bewaarde, terwijl DMSO (3%) de hoogste toxiciteit vertoonde. Ook in Veldhuizen (1994) werd glycerol gezien als het beste cryoprotectans, terwijl DMSO duidelijk minder goede resultaten boekte. In een latere studie door Fernández-Santos et al. (2006a) vergeleken de auteurs de effecten van verschillende concentraties glycerol, ethyleen glycol en propyleen glycol op de vriesresistentie van sperma. De auteurs vonden dat 12% van elk cryoprotectans toxisch was voor de zaadcellen, waarbij de membraan-integriteit werd aangetast. Spermaparameters voor epididymaal sperma namen toe wanneer Tris-citraat-fructose-verdunners 6% glycerol bevatten (Fernández-Santos et al., 2006a).

Het effect van **seminaal plasma** op de vruchtbaarheid van diepgevroren spermatozoa hangt af van de collectiemethode. Bij zaadcellen die via *elektro-ejaculatie* zijn bekomen is het effect anders dan bij epididymaal gewonnen spermatozoa. Zaadplasma is tijdens de zaadlozing afkomstig van accessoire geslachtsklieren. Bij gedomesticeerde huisdieren is zaadplasma ongeschikt om de levensvatbaarheid en vruchtbaarheid van zaadcellen in stand te houden omdat het onvoldoende bufferende capaciteit heeft om de pH te neutraliseren. Zaadplasma bevat *decapacitatie factoren* en beschermt onvoldoende tegen koude-shock (Maxwell en Johnson, 1999). Studies bij kleine herkauwers toonden aan dat de samenstelling van het zaadplasma varieert gedurende de seizoenen en dat het afhankelijk is van de activiteit van de accessoire geslachtsklieren (Nunes et al., 1982; La Falci et al., 2002; Cardozo et al., 2006). Elektro-ejaculatie induceert een overdreven secretie van zaadplasma en daardoor waarschijnlijk ook van een verhoogde hoeveelheid componenten die schadelijk zijn voor zaadcellen (Martínez-Pastor et al., 2009). In dezelfde studie bij Iberische edelherten zagen de auteurs dat spermatozoa bekomen na ejaculatie, snel hun kwaliteit verliezen als ze niet worden geïncubeerd met eidooier. Zo kan een verhoogde hoeveelheid zaadplasma negatieve effecten op de kwaliteit van het sperma induceren. Men stelde verder vast dat bij stalen waarbij enkel de spermarijke fractie werd ingevroren, de motiliteit van de zaadcellen na invriezen beter bewaard bleef dan na invriezen van het volledige ejaculaat. Martínez-Pastor et al. (2009) adviseren om ook bij hertensperma het ejaculaat te centrifugeren om zo het zaadplasma te kunnen verwijderen. Zo kan men negatieve effecten op de kwaliteit van het sperma vermijden.

Bij *epididymaal* gewonnen zaadcellen is de situatie echter anders. Soler et al. (2005) zagen dat seminaal plasma een positief effect heeft op de bewaring van zaadcellen. Dit werd tegengesproken door de studie van Fickel et al. (2007) die aantoonde dat epididymale spermatozoa met seminaal plasma significant slechtere resultaten vertoonden na kunstmatige inseminatie en in vitro fertilisatie dan zaadcellen zonder zaadplasma. Volgens hen is het aanbevolen om na invriezen en ontdooien

eerst het plasma te verwijderen vooraleer KI of IVF toe te passen. Ook Martínez-Pastor et al. (2009) onderzochten bij edelherten het effect van het supplementeren van zaadplasma aan epididymaal gewonnen spermatozoa. Dit plasma werd bekomen via ejaculaten van andere edelherten. De auteurs zagen een sterk positief effect van dit plasma op de levensvatbaarheid van de epididymale zaadcellen. Er werden meer spermatozoa met intacte membraan en acrosoom gevonden in vergelijking met de referentiestalen. De auteurs concludeerden dat de bewaring van epididymale spermacellen bij edelherten verbeterd kan worden door aan specifieke verdunners zaadplasma toe te voegen. Het positief effect is waarschijnlijk te wijten aan de aanwezigheid van specifieke enzymen en antioxidanten in dit plasma. Omdat het bekomen van zaadplasma via andere dieren nogal omslachtig en onpraktisch kan zijn, kan verder onderzoek naar dieronafhankelijke substanties met vergelijkbare inhoud als zaadplasma zeer zinvol zijn.

Op basis van de huidige literatuur kan men concluderen dat, specifiek voor edelherten, de spermakwaliteit voor en na invriezen relatief goed behouden blijft bij gebruik van specifieke verdunningsformules. Het is aan de practicus om op basis van de situatie te kiezen voor een bepaalde formule bij het aanwenden van sperma bij ART.

3.3.3 Spermabewaring bij damherten

De meeste sperma-afnames voor onderzoek bij damherten zijn gebeurd via elektro-ejaculatie. Over het algemeen zijn spermatozoa van damherten aanzienlijk robuuster dan die van edelherten en ze zijn minder gevoelig voor behandeling (Asher et al. 1993). Net als bij gekweekte edelherten kende het gebruik van vers of vloeistof-bewaard sperma in KI programma's voor damherten weinig problemen (Asher et al., 1988a,1992a; Jabbour et al. 1993a,b).

Ook bij het damhert zijn zelfgemaakte en commerciële verdunners uitgetest. Voor de bewaring van epididymale zaadcellen vertoonden Triladyl® en Bioxcell® goede resultaten (Zomborszky et al., 2005). Ook natriumcitraat(2.9%)-eidooier(20%)-glycerol(8%) en Tris-eidooier(2.5%)-glycerol(5%) verdunners zijn efficiënt gebleken voor het bewaren en invriezen van damhertensperma (respectievelijk Jabbour et al., 1993; Soler et al., 2003b).

Bevriezing van damhertensperma is in sommige gevallen spectaculair succesvol gebleken, met een potentiële motiliteit van meer dan 70% na ontdooien (Asher et al., 1993). Net als bij edelherten hebben de meeste onderzoekers van damhertensperma gebruik gemaakt van natriumcitraat(2.9%)-eidooier(20%)-glycerol(8%) als verdunner in de formule voor het invriezen in rietjes (Krzywinski en Jaczewski, 1978; Asher et al. 1992a). Mulley et al. (1988) hebben met succes aangetoond dat sperma pellets van damherten op droog-ijs in te vriezen zijn na aanlengen met eidooier(2.25%)-tris-glucose-citraat-buffer en glycerol(6%). Dit werd origineel voor geiten ontwikkeld door Ritar en Salamon (1983). Mulley et al. (1988) noteerden echter wel motiliteitwaarden die zeer variabel waren na ontdooiing, namelijk van 10 tot 70%.

In een poging om de levensvatbaarheid van zaadcellen na ontdooiing te verbeteren, heeft Veldhuizen (1994) dezelfde combinaties van verdunners en cryoprotectantia onderzocht die werden geëvalueerd voor edelherten (zie hoger). Het onderzoek toonde aan dat de verdunner magere melk-eidooier-glycerol het meest aangewezen is, met de hoogste motiliteit na ontdooien van $76,7 \pm 8,0\%$. Zoals bij edelherten presteerde glycerol veel beter dan de andere cryoprotectantia, behalve RSD-1, die beter was met DMSO. In vivo leveren de verschillende verdunningsmethoden echter geen significante verschillen in bevruchtingspercentages na laparoscopische intra-uteriene KI ($65-71\%$; $P > 0.10$.) (Veldhuizen, 1994)

De variabele resultaten van alle voormelde studies tonen duidelijke species-verschillen aan, door verschillen in reproductieve biologie. Op basis van de huidige studies lijkt het weinig waarschijnlijk dat een gestandaardiseerde verdunningsmethode voor de verschillende hertensoorten kan ontwikkeld worden. Misschien dat verder onderzoek dit in de toekomst kan tegenspreken. Samenvattend kan men stellen dat er reeds redelijk wat onderzoek is gebeurd naar goede verdunners en cryoprotectantia voor de bewaring van hertensperma, evenwel met wisselende resultaten. Er zijn nog steeds duidelijke hiaten in de literatuur met betrekking tot dit onderwerp. Zo is er voor verschillende specifieke hertensoorten weinig te vinden over het effect van bepaalde formules op de spermakwaliteit, evenmin over de ontwikkeling van een specifiek protocol voor herten om de spermakwaliteit te kunnen kwalificeren voor bijvoorbeeld inseminatie, IVF en natuurlijke conceptie. Nader onderzoek zal hierin zeker waardevol kunnen zijn.

Bijlage II geeft een goed overzicht over de verschillende verdunners, cryoprotectantia, invriesprotocollen en ontdooiingsschema's die overwogen kunnen worden voor een aantal hertensoorten.

3.3.4 Sperma-bewaring bij Afrikaanse antilopeachtigen

Loskutoff et al. (1996) voerden in Zuid-Afrika onderzoek uit op springbokken (*Antidorcas marsupialis*), op impala's (*Aepyceros melampus*) en op blesbokken (*Damaliscus dorcus phillipsi*). De populatie van deze soorten neemt af en daarom is men sterk geïnteresseerd in een protocol om sperma te bewaren via cryo-conservatie. Bewaring van genetisch materiaal in sperma-banken zou vermoedelijk enig tegengewicht kunnen geven bij het verlies aan biodiversiteit (Wildt et al., 1992, 1995; Herrick et al., 2004). De onderzoekers testten het mogelijk toxisch effect van verschillende cryoprotectantia op de bewaring van epididymaal sperma, geïncubeerd bij $4-10^{\circ}\text{C}$ en $30-32^{\circ}\text{C}$, in Biladyl®. Dit is een tris-gebufferde commerciële verdunner, op basis van eidooier en zonder glycerol (i.e. 2.42% Tris, 1.38% citraat, 1% fructose + 20% eidooier) die ook in verschillende andere studies werd gebruikt (Chatiza et al., 2011, 2012). In de studie van Loskutoff et al. (1996) evalueerden de auteurs dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol, ethyleenglycol en propyleenglycol, allen aan 4% en 8%. Bij de blesbok en bij de impala behaalden glycerol (4% en 8%) en ethyleenglycol (8%) goede resultaten, terwijl propyleenglycol de hoogste toxiciteit induceerde. Bij de springbok gaf DMSO (8%) het beste resultaat. De auteurs merkten ook op dat er bij springbokken minder individuele variatie bestond. Ze stelden ook

dat een goede motiliteit de beste functionele overleving van zaadcellen meebrengt, maar daarom niet noodzakelijk de hoogste vruchtbaarheid. Andere fertiliteitsparameters zouden daarvoor ook geëvalueerd moeten worden.

Chatiza et al. (2011) vergeleken epididymaal sperma, bij veldcondities gewonnen, voor- en na invriezen. Ze onderzochten voor de blesbok, de impala en de springbok de spermamotiliteit, de integriteit van de plasmamembraan, de acrosoom beschadiging en de morfologie. In dit onderzoek werd ook de Biladyl®-verdunner aangewend, gesupplementeerd met 20% eidooier en 7% glycerol. De auteurs noteerden na invriezen een significante daling van waarden voor het % geschatte motiliteit, voor morfologie en acrosoom- en plasmamembraanintegriteit. Deze bevindingen werden bevestigd door Loskutoff et al. (1996) en Herrick et al. (2004). In dit laatste onderzoek, noteerden de auteurs een lagere waarde voor het percentage geschatte motiliteit dan in de andere twee onderzoeken. Dit is te verklaren door het feit dat in het onderzoek van Herrick et al. (2004) een verdunner, origineel bedoeld voor paarden, en een ander cryoprotocol zijn toegepast. Er traden duidelijke species verschillen op voor morfologische sperma-abnormaliteiten, de blesbok vertoonde hiervan de minste. Het betrof slechts kleine abnormaliteiten, i.e. distale protoplasmadruppels, midpiece-reflex, gekrulde- en gebogen staarten; de meeste afwijkingen zijn te wijten aan koude shock. Ze hebben over het algemeen weinig effect op de fertiliteit van het zaad (Bart en Oko, 1989). Het sperma van de blesbok bleek beter bestand tegen invriesprocessen.

In Chatiza et al. (2012) werd ook een vriesprotocol getest op epididymaal sperma van de blesbok, de springbok en de impala. Hierbij werd ook de Biladyl®-verdunner, met 7% glycerol, aangewend. De motiliteit van de zaadcellen werd geanalyseerd met het CASA-systeem. Dit is het eerste onderzoek waarin sperma van *Afrikaanse antilopeachtigen* werd onderzocht via CASA. Men stelde duidelijke diersoortverschillen vast voor motiliteitsparameters berekend via CASA: totale motiliteit, progressieve motiliteit, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, LIN en STR (zie 2.4.2.2 –*microscopisch onderzoek – motiliteit*). Deze parameters duiden verschillen aan in metabole activiteit en in algemene spermafysiologie.

Er is weinig literatuur beschikbaar over efficiënte en succesvolle spermapbewaring en cryopreservatie bij *Afrikaanse antilopeachtigen*. De vriesprotocollen afkomstig van gedomesticeerde herkauwers werden ook bij deze diersoorten aangewend als basisreferentie en daarna geadapteerd. Tot op heden waren die slechts matig succesvol, vermoedelijk wegens sterke diersoortverschillen. Duidelijke interspecies verschillen voor spermafysiologie bij de blesbok, de impala en de springbok, leiden ertoe dat verschillende verdunners, cryoprotectantia, capacitatie- en IVF-media verschillende resultaten genereren bij deze diersoorten. Diersoort-specifieke aanpassingen van basis protocollen zijn noodzakelijk (Loskutoff et al., 1996; herrick et al., 2004; Chatiza et al., 2011, 2012). Wetenschappers zijn het er wel over eens dat IVF-protocollen van gedomesticeerde runderen, nuttig kunnen zijn als basis (Wildt et al., 1992).

Tabel 6: Een overzicht van de verschillende verdunners gebruikt in onderzoeken bij impala, blesbok en springbok. ES, epididymaal sperma; ED, eidooier

Diersoort	EE / ES	Verdunner	CPA	Referentie
Impala (<i>Aepyceros melampus</i>), Blesbok (<i>Damaliscus dorcus phillipsi</i>), Springbok (<i>Antidorcas marsupialis</i>).	ES	Biladyl® Capacitatiemedium Bovine IVF	Glycerol 7%	Chatiza et al., 2011, 2012
	ES	Biladyl®	Glycerol 4% - 8%, ethyleen glycol 4% - 8%, propyleen glycol 4% - 8%, DMSO 4% - 8%	Loskutoff et al., 1996
Impala (<i>Aepyceros melampus</i>)	ES	Biladyl®	Glycerol 5%, ethyleen glycol 5%, DMSO 5%	Rush et al., 1997
Blesbok (<i>Damaliscus dorcus phillipsi</i>), Springbok (<i>Antidorcas marsupialis</i>).	ES	EQ (20% ED, 5,5% lactose, 1,5% glucose, Orvus pasta) Capacitatiemedium Bovine IVF	Glycerol 5%	Herrick et al., 2004

4 SPERMA BEOORDELING

Om uitspraken te kunnen doen over fertiliteit moet de kwaliteit van een ejaculaat geanalyseerd worden op basis van verschillende parameters. De kostprijs van materiaal en apparatuur die nodig zijn om een grondig sperma-onderzoek uit te voeren kan hoog oplopen, zeker als men een volledige screening wil uitvoeren. De materiaalkost zal zeker voor particulieren duur uitvallen. Samenwerking met professionele laboratoria, klinieken en andere instanties die gespecialiseerde apparatuur bezitten kan dus zeker worden aangeraden. In 3.2 *Materiaal en methoden* van het onderzoek, wordt kort besproken wat er nodig is om zowel een standaard sperma-onderzoek als een volledige screening van een ejaculaat uit te voeren.

Sperma-analyse levert een aantal kwaliteitsparameters voor de fertiliteit. In de literatuur is informatie te vinden over verschillende hertenrassen waaronder dam- en edelherten, sikaherten en rendieren. Omdat deze hertenfamilies in zeer verschillende habitatten leven zal ook de reproductiebiologie verschillen en daardoor ook de spermakarakteristieken.

Een standaard spermaonderzoek is opgebouwd uit een macroscopisch en een microscopisch onderzoek van het staal en probeert kwaliteitsparameters in kaart te brengen. Daarnaast kunnen ook een biochemisch en een microbiologisch spermaonderzoek een toegevoegde waarde hebben. Parameters worden echter significant beïnvloed door de collectiemethode. Sperma verkregen via een artificiële vagina zou de beste stalen opleveren (Gizejewski, 2004). Zoals eerder gesteld, vergt die afnamemethode een doorgedreven training van de bok en dit is in de praktijk onrealistisch. Om een correcte uitspraak te doen over spermakwaliteit parameters en over de fertiliteit van een individu, moet men dus rekening houden met de collectiemethode. Hierna zullen verschillende aspecten van spermaonderzoek besproken worden, en waar mogelijk de verschillen tussen de hertensoorten. In de hier volgende tekst zal opnieuw vooral informatie over dam- en edelherten worden belicht.

4.1 MACROSCOPISCH SPERMAONDERZOEK

Bij de macroscopische beoordeling van het ejaculaat beschouwt men het volume, de homogeniteit, de kleur en mogelijke bij-mengingen.

Het **volume** is bij hertachtigen sterk afhankelijk van verschillende factoren. Het seizoen waarin het staal genomen wordt is van belang (zie in 2.2 *reproductiebiologie en seizoensinvloeden*). Daarnaast spelen andere fysiologische factoren een rol, waaronder de leeftijd van het dier, de ejaculatiefrequentie, het interval tussen twee sperma afnames en de graad van seksuele pre-stimulatie. Maar het volume van een ejaculaat wordt vooral bepaald door de productie van zaadplasma door de secundaire geslachtsklieren. Bij hertenbokken zijn dat de ampullae, de zaadblaasjes, de prostaat en de bulbo-urethrale klier (Goeritz et al., 2003). Functie, morfologie en grootte van deze accessoire geslachtsklieren zijn ook afhankelijk van seizoeninvloeden. Hoe groter het volume van het sperma, hoe lager de spermaconcentratie. Men kan bij onderzoek het volume van het volledige ejaculaat of van afzonderlijke fracties gemakkelijk meten door het sperma over te gieten in een voorverwarmede gegradeerde glazen maatbeker. Ook hier is de collectiemethode belangrijk. Zo

resulteert elektro-ejaculatie in spermastalen met een groot volume door toegenomen secretie van vloeistoffen afkomstig van de accessoire geslachtsklieren en de epididymis.

Homogeniteit en consistentie van het sperma kunnen variëren van waterig tot viskeus. Dit werd eveneens reeds uitgebreid besproken in 2.2 *Reproductiebiologie – Seizoensinvloeden*. De **kleur** wordt bepaald door de aan- of afwezigheid van een **bijmenging**. Een afwijkende kleur is steeds pathologisch en kan veroorzaakt worden door de aanwezigheid van bloed (rood), urine (geel) en etter (groen). Bij aanwezigheid van etter verandert de consistentie van het staal door het bezinken van ettervlokken (massabeweging).

4.2 MICROSCOPISCH SPERMAONDERZOEK

In microscopisch onderzoek worden de parameters concentratie, motiliteit, levend/dood verhouding en morfologie van protozoa beoordeeld. Voor de volledigheid kan men nog enkele aanvullende testen uitvoeren, zoals de HOS-test, bepaling van de integriteit van de plasma- en acrosom-membraan, mitochondriale functietesten en andere.

Sperma heeft een goede **concentratie** als het voldoende spermatozoa per dosis bevat. Dit is zeer belangrijk om een goede fertiliteit te garanderen. Bij herten is deze parameter, net als het volume, afhankelijk van verschillende factoren en in de eerste plaats van seizoenseffecten. Men kan de concentratie bepalen met behulp van een hemocytometer, i.e. een telkamer voor bloedcellen. Gebruikt men de Bürkse telkamer, dan telt men de zaadcellen in 40 verschillende telkamers (inhoud van één vierkantje = $1/4000\text{mm}^3$). De aantallen vermenigvuldigd met 100 geeft het aantal zaadcellen per mm^3 of μl . Daarna moet men nog vermenigvuldigen met de overeenkomstige verdunningsfactor. Deze methode is dan ook redelijk omslachtig en tijdrovend. In de praktijk bepaalt men de concentratie vooral via geautomatiseerde methoden. De resultaten zijn dan gestandaardiseerd, objectief en relatief snel bekend. Voor sperma onderzoek bij gedomesticeerde huisdieren is meetapparatuur op basis van lichtabsorptie gebruikelijk, zoals spermio-densimeters, nefalometers en colorimeters. Deze machines dienen vooraf voor een bepaalde diersoort geijkt te worden, anders zouden foutieve resultaten ontstaan. Of er specifieke apparatuur en ijkingen bestaan voor hertensperma is in de literatuur niet teruggevonden. In de geraadpleegde studies over herten en *Afrikaanse antilopeachtigen* werden vooral Bürkse telkamers gebruikt (Gosch en Fisher, 1989; Veldhuizen, 1994; Loskutoff et al., 1996; Herrick et al., 2004; Martinez-Pastor et al. 2005a,b,c, 2006b, 2009; Martínez et al., 2008; Chatiza et al., 2011, 2012).

De **motiliteit** is een belangrijke parameter in sperma-onderzoek. De resultaten worden sterk beïnvloed door uitwendige factoren, vooral tijdens de verwerking van stalen bij een lage omgevingstemperatuur. Spermatozoa worden pas volledig motiel op het ogenblik van de zaadlozing, omdat zij dan substraat krijgen vanuit het zaadplasma en overschakelen van een anaeroob naar een aeroob milieu. Martínez et al. (2008) analyseerden bij Iberische edelherten het verschil in totale motiliteit en kwaliteit tussen zaadcellen bekomen via elektro-ejaculatie en postmortaal. Het totale percentage motiele spermatozoa was gelijkaardig bij beide afname-methodes, maar de kwaliteit van epididymale zaadcellen was significant slechter. Spermacellen kunnen bij verschillende diersoorten

sterk verschillen wat betreft de metabole capaciteit van de mitochondriën. Daarom worden spermaverdunners steeds per diersoort geoptimaliseerd. Er is onderzoek verricht naar welke verdunners bij gedomesticeerde herkauwers ook goede resultaten geven bij herten. Dit kwam reeds aan bod in 2.3.3 *Spermabewaring: verdunnen en invriezen*.

Het meten van de motiliteit dient zo snel mogelijk na het opvangen, verdunnen of ontdooien plaats te vinden en kan gebeuren via de traditionele methode of via *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Bij de traditionele methode wordt een vers onverdund staal onmiddellijk geëvalueerd met behulp van een microscoop. Een spermadruppel wordt op een verwarmd draagglaasje (37°C) geplaatst met behulp van een micropipet. Met een contrastfase microscoop (37°C) kan men vervolgens in minstens vijf velden per staal een motiliteitsscore toekennen, volgens de methode beschreven door Evans en Maxwell (1987). De motiliteit kan door de onderzoeker gegradueerd worden aan de hand van een 0-5 score: 0, geen motiliteit; 1, zwakke staart bewegingen zonder voorwaartse progressie; 2, trage voorwaartse beweging, vaak in een circulair patroon; 3, matige voorwaartse beweging; 4, snelle voorwaartse beweging; 5, zeer snelle voorwaartse beweging. De progressie van een zaadcel is optimaal als ze eenparig, rechtlijnig voorwaarts is met een roterende beweging rond de lengteas. De traditionele methode is niet geautomatiseerd en subjectief omdat manueel graderen onderhevig is aan de interpretatie van de onderzoeker. Deze techniek wordt veel bij *Afrikaanse antilopeachtigen* aangewend, omdat sperma vooral ten velde onderzocht moet worden (Merilan et al., 1982; Loskutoff et al., 1996; Herrick et al., 2004; Chatiza et al., 2011).

Als alternatief kan de geautomatiseerde CASA-methode overwogen worden (Martínez et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2005a,d, 2006a,b,c, 2009; Domínguez-Rebolledo et al., 2010; Anel-López et al., 2012; Mata-Campuzano et al., 2012; Ramón et al., 2012; Ritten et al., 2012). Chatiza et al. (2012) zijn de enige onderzoekers die CASA-analyse uitvoerden bij de impala, de blesbok en de springbok. Volgende parameters worden via deze methode onderzocht: totaal percentage motiele zaadcellen (%; TM), percentage progressieve spermatozoa (%; PM), curvi lineaire baan ($\mu\text{m/s}$; CVB), percentage lineariteit (%; LIN) en rechtheid of *straightness* (%; STR), amplitude van de laterale beweging van de kop (μm ; ALH) en beat cross frequency (Hz; BCF). Er worden minstens 5 velden en 200 cellen geanalyseerd bij een x200 vergroting, met een beeldopname snelheid van 25 beelden/s en een opnametijd van 0,8s. Een zaadcel wordt motiel beschouwd als CVB > $10\mu\text{m/s}$, progressief als CVB > $25\mu\text{m/s}$ en STR > 80%. Een gedetailleerde beschrijving van deze motiliteitsparameters is verstrekt door Mortimer et al. (1988) en Boyer et al. (1989).

Niet alleen de motiliteit en de concentratie van spermastalen zijn belangrijk voor de fertiliteit van het sperma. Daarnaast zijn ook de **morfologie** van zaadcellen en de **levend/dood verhouding** van een spermastaal inherent gecorreleerd met een goede vruchtbaarheid. In het morfologisch onderzoek wordt het percentage en de aard van de pathologisch afwijkende zaadcellen nagegaan. Analyse van morfologische abnormaliteiten kan zowel gebeuren met behulp van een fasecontrastmicroscoop, waarbij ongekleurde uitstrijkjes worden bekeken, als met een lichtmicroscoop en specifieke kleuringen. In studies bij herten maakte men vooral gebruik van giemsa, congo-rood, briljant cresyl blauw en eosine-nigrosine kleuringen (Blottner et al., 1996; Nagy et al., 2001; Goeritz et al., 2003;

Soler et al., 2003; Cheng et al., 2004; Malo et al., 2005; Soler et al., 2005; Zomborszky et al., 2005; Estes et al., 2006; Fernández-Santos et al., 2007; Fernández et al., 2013). Vooral de eosine-nigrosine kleuring wordt frequent bij herten toegepast. Het wordt ook wel een supravitaalkleuring genoemd, omdat men via deze methode eveneens de levend/dood verhouding kan bepalen. Om deze techniek uit te voeren wordt een druppel sperma gemengd met een kleurstof, samengesteld uit bijvoorbeeld 5% nigrosine en 1% eosine. De eosine-nigrosine kleuring wordt aangebracht op een draagglaasje en vervolgens onder een lichtmicroscop geanalyseerd. Het is bij deze techniek belangrijk dat men geen grote temperatuurverschillen tussen draagglaasjes, kleurstof, pipetten en het sperma creëert om koude-shock en foutieve morfologische beoordelingen te voorkomen.

De eosine-nigrosine kleuring werd origineel beschreven door Campbell et al. (1959). Het is een supravitaalkleuring die de achtergrond kleurt van een staal en de structuren waarvan de membraan permeabel is voor een kleurstof. In dit geval vervullen respectievelijk nigrosine (lichtpaars) en eosine (rood) deze functies. Aan de hand van de E-N-kleuring, kan men de integriteit van de plasmamembraan evalueren en zo differentiëren tussen levende en dode spermatozoa. Levende zaadcellen kunnen niet gekleurd worden met eosine, aangezien de celmembraan hiervoor niet doorgankelijk is. Deze cellen blijven wit tot zilver op een lichtpaarse achtergrond. Beschadigde en dode zaadcellen hebben gedegenerende cel-, acrosom- en kernmembranen waarlangs het eosine penetreert en zo deze structuren rood kleurt. De specifieke methode om een E-N-test uit te voeren bij herten, wordt onder andere beschreven door Soler et al. (2005) en door Beracochea et al. (2014), respectievelijk bij epididymaal en via elektro-ejaculatie gewonnen zaadcellen. De methode is gebaseerd op Tamuli en Watson (1994). Deze auteurs vermelden ook een eosine-nigrosine-giemsakleuring om acrosomale veranderingen te herkennen. Specifiek voor hertensperma is de literatuur over kleuring nog zeer schaars. In Aalseth en Saacke (1986) werd voor het eerst melding gemaakt van een eosine B (2%) met Fast Green FCF (0.8%) supravitaalkleuring in een Lakes verdunner, waarmee men eveneens een intacte acrosom- en membraanpotentiaal kan aantonen. Deze kleuring werd vooral aangewend in onderzoek bij impala, blesbok en springbok (Loskutoff et al., 1996; Herrick et al., 2004; Chatiza et al., 2011, 2012).

Zaadcellen van de meeste hertensoorten verschillen morfologisch weinig van spermatozoa van andere zoogdieren. Dit werd geconstateerd in studies bij edelherten (Giżejewski, 2004), bij damherten (Gosch en Fischer, 1989), bij wapiti's (Haigh et al., 1984, 1985), bij elanden (*Alces alces*; Andersen, 1973), bij witstaartherten (Bierschwal et al., 1970), bij rendieren (*Rangifer tarandus*; Dott en Utsi, 1971) en bij sikaherten (Wislocki, 1949). Dit geldt ook voor de zaadcellen van impala, blesbok en springbok (Merilan et al., 1982).

Om **morfologische afwijkingen** op te zoeken kan het aangewezen zijn om een staal zowel oppervlakkig als meer gedetailleerd te screenen. Omdat het sperma van edelherten vergelijkbaar is met dat van gedomesticeerde herkauwers (Giżejewski, 2004) kan men een sperma-morfologische evaluatie maken aan de hand van de methode van Blom (1973). Martínez et al. (2008) analyseerden spermastalen van Iberische edelherten ook op morfologische parameters. Ze classificeerden cytoplasmadruppels als proximaal of als distaal. De laatste zijn kenmerkend voor epididymaal sperma.

Garde et al. (1998) en Gizejewski et al. (1998) toonden aan dat epididymaal gewonnen zaadcellen van edelherten tijdens het paarseizoen grote hoeveelheden distale cytoplasmadruppels bevatten, namelijk 71.2-80.3%. Distale cytoplasmadruppels worden steeds als abnormaal aanzien, terwijl proximale cytoplasmadruppels enkel abnormaal zijn bij geëjaculeerde zaadcellen, omdat ze fysiologisch voorkomen in epididymaal gewonnen spermatozoa bij herkauwers (Cooper, 2005). Distale druppels worden geclassificeerd als kleine defecten, die verloren gaan tijdens beweging van spermatozoa doorheen de ductus deferens (Saacke, 1970; Barth en Oko, 1989). Bij edelherten is de aanwezigheid van spermatozoa met distale cytoplasmadruppels de meest voorkomende morfologische afwijking. Andere mogelijke abnormaliteiten zijn macro- en microcefale spermatozoa, pyriforme koppen, losse koppen, midpiece reflex (gebogen of opgevouwen) middenstuk, segmentale aplasie van de mitochondriale schede, en tenslotte gebroken en gekrulde staarten (Martínez et al., 2008).

Om morfologische afwijkingen te scoren, kan gewerkt worden met een *spermaformule* die ook door verschillende auteurs bij sperma van *Afrikaanse antilopeachtigen* werden toegepast (Merilan et al., 1982; Loskutoff et al., 1996; Herrick et al., 2004; Chatiza et al., 2011, 2012). Minimaal 100 ongekleurde zaadcellen worden geteld en geplaatst in volgende categorieën:

- Normale cellen (N)
- Primaire afwijkingen:
 - Abnormale koppen (AK)
 - Abnormale staarten (AS)
 - Dubbelvormen (DV)
- Secundaire afwijkingen:
 - Proximale protoplasmadruppels (PPD)
 - Distale protoplasmadruppels (DPD)
 - Losse kop(kap)
 - Abnormale staarten
- Tertiaire afwijkingen:
 - “Rood”-gekleurde cellen
 - Gebroken staarten

Primaire afwijkingen kennen hun oorsprong in de testes, secundaire afwijkingen ontstaan in de epididymis en representeren de rijping van de zaadcellen. Tertiaire afwijkingen ontstaan na het opvangen van het ejaculaat en kunnen zo representatief zijn voor het slecht manipuleren van sperma. Koude-shock en onoordeelkundig gemaakte uitstrijkjes komen veelvuldig voor tijdens het behandelen en onderzoeken van sperma en leiden voornamelijk tot zaadcellen met losse staarten (Barth en Oko, 1989). Nadat men minimaal 100 zaadcellen morfologisch heeft geanalyseerd en de afwijkingen in bovengenoemde categorieën heeft ingedeeld, kan men een uitspraak doen over de waarschijnlijke oorzaak van deze afwijkingen.

De relatie tussen morfologisch normale zaadcellen en vruchtbaarheid is reeds uitgebreid beschreven bij mensen, stieren, hengsten, rammers en geitenbokken (Gravance et al., 1998). Deze auteurs rapporteerden in hun onderzoek dat afwijkingen aan de spermakoppen leidden tot toegenomen embryonale sterfte, gedaalde fertiliteit en embryokwaliteit en gedaalde capaciteit van deze spermatozoa om zich te binden aan de eicel. Morfologische evaluatie van zaadcellen is vaak subjectief en afhankelijk van onderzoeker en laboratorium (Hidalgo et al., 2006). Ze kent een lage inter-scorer-betrouwbaarheid. Dit reduceert het nut van morfologisch spermaonderzoek bij het voorspellen van de kwaliteit voor de fertiliteit (Ombelet et al., 1995).

Morfometrische parameters zijn gelinkt aan de motiliteit van zaadcellen (Malo et al., 2006), aan cryopreservatie (Esteso et al., 2006), aan sperma-subpopulaties (Esteso et al., 2009; Beracochea et al., 2014) en rechtstreeks aan de fertiliteit (Casey et al., 1997). Om morfologische evaluatie enigszins te objectiveren en te automatiseren kan men de parameters bepalen via *Computer-Assisted Morfometric Sperm Analysis* (CAMSA) (Davis et al., 1992; Kruger et al., 1993) of via *Integrated Semen Analysis System* (ISAS®) software. Morfometrische kenmerken van zaadcellen, vastgesteld via CAMSA, worden door verschillende factoren beïnvloed, onder meer door staalvoorbereiding, door fixatie en kleuring van de spermatozoa en door de instellingen van de software (Verstegen et al., 2002; Gravance et al., 1998; Hidalgo et al., 2006; Davis en Gravance, 1993; Holt et al., 1994; Gravance en Davis, 1995; Gravance et al., 1995; Boersma et al., 1999, 2001). Zo is het moeilijk om resultaten uit verschillende studies te vergelijken, ook bij onderzoek van eenzelfde diersoort. Men moet zeker streven naar een gestandaardiseerde manier van werken bij analyses met behulp van computer gestuurde software.

Microscopisch onderzoek kan nog meer gegevens opleveren die het mogelijk maken om de fertiliteit van een hertenbok te bepalen. Zo kan de **integriteit van de plasma- en acrosom-membraan** van zaadcellen in het ejaculaat bepaald worden, en die kan een duidelijke rechtstreekse weergave zijn van de fertiliteit. Men kan ze zoals reeds eerder besproken, bepalen met behulp van een supravitaalkleuring van het staal, door fluorescerende kleuringen en door een **hypo-osmotische zwellingstest** (HOS) (Jeyendran et al., 1992).

Het acrosom bevat belangrijke enzymen voor de capaciteit tot penetratie van de *membrana pellucida* en zo voor de bevruchting in het algemeen. Een intacte acrosom-membraan is onontbeerlijk voor een goede fertiliteit van de spermatozoa. Zaadcellen zonder acrosom zijn een oorzaak van primaire infertiliteit bij mannelijke individuen (Jeyendran et al., 1985). De hypo-osmotische zwellingstest kan gebruikt worden om de functionele integriteit van de plasmamembraan na te gaan (Jeyendran et al., 1992). De methode om de hypo-osmotische zwellingstest bij herten uit te voeren, wordt beschreven in Garde et al. (1998), Soler et al. (2005), Fernández et al. (2013) en Beracochea et al. (2014), respectievelijk bij epididymaal, epididymaal en beide laatste via elektro-ejaculatie gewonnen zaadcellen. De exacte procedure voor de HOS-test verschilt licht in de genoemde onderzoeken. Vergelijkbaar met de eosine-nigrosine test, worden er 100 spermatozoa geteld in elk staal. De incidentie van zaadcellen met verschillende morfologische afwijkingen wordt bepaald, evenals de

acrosoom integriteit (intact, beschadigd, verloren) gefixeerd op 2% glutaraaldehyde in cacodylaat/HCl buffer (Pursel en Johnson, 1972).

Men kan de **integriteit van de plasma- en acrosoom-membraan** van spermatozoa bij herten ook beoordelen aan de hand van *fluorescerende kleuringen* (edelhert; Malo et al., 2005; Soler et al., 2005; Martínez et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2009). Door middel van fluorochrome combinaties, bestaande uit *propidiumjodide* (PI) en *fluoresceïne isothiocyanaat-geconjugeerd pinda* (*Arachis hypogea*) *agglutinine* (PNA-FITC), kan men gelijktijdig acrosomale- en plasmamembraan integriteit (i.e. leefbaarheid) evalueren. De PNA-FITC wordt gebruikt om de integriteit van het sperma acrosoom te onderzoeken. Zaadcellen met intact acrosoom vertonen geen fluorescentie, cellen waarbij het acrosoom beschadigd of veranderd is zullen een groene fluorescentie hebben. Propidiumjodide is een DNA-specifieke kleurstof die niet kan binnentreden in een zaadcel met een intacte plasmamembraan. Zo kan men levensvatbare cellen identificeren omdat die geen kleuring vertonen. Spermatozoa zonder PNA-FITC kleuring worden beschouwd als zaadcellen met intact acrosoom; spermatozoa zonder PI kleuring worden beschouwd als levend. Op basis van het PNA-FITC / PI kleuringspatroon kan men de zaadcellen opdelen in vier categorieën: 1) rood, niet levend, acrosoom intact; 2) rood-groen, niet levend, acrosoom beschadigd; 3) groen, levend, acrosoom beschadigd; 4) niet gekleurd, levend, acrosoom intact. Honderd zaadcellen dienen geteld en gegradeerd te worden. De basismethode om de acrosoom- en plasmamembraan van spermatozoa te kunnen beoordelen, wordt beschreven in Cheng et al. (1996) voor hengstensperma. Martinez et al. (2008) en Martinez-Pastor et al. (2009) modificeerden de methode om zaadcellen van Iberische edelherten te kunnen analyseren.

Met microscopisch onderzoek kan men verder nog de **mitochondriale functie** van spermatozoa beoordelen aan de hand van fluorescerende kleuringen, meer bepaald met de *carbocyanine kleurstof*, JC-1 (5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine Iodide) (Iberisch edelhert; Soler et al., 2005; Martínez-Pastor et al., 2009). Mitochondriale activiteit is sterk significant gecorreleerd met de motiliteit, $r < 0.96$, aangezien de mitochondriën energie leveren voor de vitale functies van de zaadcel (Ericsson et al., 1993; Garner et al., 1997). De mitochondriale activiteit kan dus indirect de mate van motiliteit van de spermatozoa weerspiegelen, en er zelfs een goede voorspeller voor zijn. De test heeft een hoge sensitiviteit. Zaadcellen worden onderverdeeld in drie categorieën op basis van hun JC-1 kleuringspatroon: spermatozoa met rood-oranje middenstukken zijn zaadcellen met mitochondriën met hoge membraanpotentiaal (H-JC-1); spermatozoa met groene middenstukken zijn zaadcellen met mitochondriën met lage membraanpotentiaal (L-JC-1); spermatozoa met middenstukken gekleurd in rood-oranje met groene gebieden hebben mitochondriën met gemengd membraanpotentiaal (M-JC-1) (Gravance et al., 2000; Soler et al., 2005). Honderd zaadcellen dienen geteld en gegradeerd te worden. Deze methode wordt ook beschreven in Cheng et al. (1996) voor hengstensperma. Martinez et al. (2008) en Martinez-Pastor et al. (2009) modificeerden de methode voor Iberische edelherten.

4.3 BIOCHEMISCH ONDERZOEK

Op een spermastaal kunnen ook een aantal biochemische tests uitgevoerd worden. Bij gedomesticeerde huisdieren worden deze testen zelden aangevraagd, gezien de beperkte toegevoegde waarde bij de kwaliteitsbeoordeling van sperma. Voor de volledigheid worden toch enkele biochemische testen toegelicht die in de literatuur specifiek voor hertensperma beschreven werden.

De **pH** van hertensperma is gemakkelijk te meten met een elektronische pH-meter of met een pH-stick. Dit deden o.a. Giżejewski (2004) en Martínez et al. (2008) bij edelherten en Umapathy et al. (2007) bij het axishert. Martínez et al. (2008) zagen dat epididymaal gewonnen stalen een lagere pH-waarde hadden dan ejaculaten. Daarbij merkten de auteurs ook op dat de pH van sperma bekomen na ejaculatie, steeg naargelang de leeftijd van de dieren. Men veronderstelde dat veranderingen bij toenemende leeftijd in de secreties van zaadplasma hiervoor aan de basis zouden liggen.

Giżejewski (2004) onderzocht bij edelherten de pH van verschillende fracties van zaadlozingen, bekomen via elektro-ejaculatie. De pH van de gele fractie is relatief stabiel maar afhankelijk van het seizoen. Waarden van 6.65-7.45 kunnen worden waargenomen. In het begin van het paarseizoen is de pH-waarde van de gele fractie zeer variabel. Tegen eind september is ze meestal gestabiliseerd, waarbij een progressieve toename wordt genoteerd tot en met het einde van de paarperiode. De pH-waarde van de witte fractie is ook relatief stabiel en neemt, zoals de gele fractie, toe tegen het einde van het paarseizoen. Waarden van 6.80-7.41 worden genoteerd. De pH van de grijze fractie fluctueert dan weer sterk doorheen het seizoen en varieert van 6.07 tot 8.69.

Ook de **osmolaliteit** van de verdunner kan een duidelijk effect hebben op de spermakwaliteit. Martínez-Pastor et al. (2006b) adviseerden dat men best een verdunner aanwendt met een osmolaliteit van 320 mOsm/kg om een optimale cryoprotectie te garanderen van elektro-geëjaculeerde zaadcellen. De auteurs onderzochten bij Iberische edelherten onder andere het effect van de osmolaliteit van de verdunner (320, 380, 430 mOsm/kg) op de kwaliteit van het sperma na ontdooien. 320 mOsm/kg werd ideaal gevonden, de resultaten met 380 mOsm/kg verschilden echter niet significant. De situatie is anders voor *post-mortem* epididymaal gewonnen stalen. In dergelijke situaties kenden verdunners met een osmolaliteit van 430 mOsm/kg de beste resultaten, i.e. de hoogste motiliteit en de kleinste hoeveelheid gezwollen spermatozoa na ontdooien (Martínez-Pastor et al., 2006b; Fernandez-Santos et al., 2007).

Belangrijk, met het oog op verdunners, is nog dat de fysiologische parameters van zaadcellen, bekomen via EE en PM, significant verschillen van elkaar (Martínez et al., 2008). PM-collectie resulteerde in sperma met een hogere concentratie en osmolaliteit en een lagere pH. Daarom geven hogere glycerolconcentraties en osmolaliteit van verdunners betere resultaten in invriesprotocollen voor epididymale zaadcellen. Dit staat in tegenstelling tot spermastalen bekomen via elektro-ejaculatie, waar lagere glycerolconcentraties en osmolaliteit vereist zijn voor efficiënt invriezen (Martínez-Pastor et al., 2006b).

4.4 BACTERIOLOGISCH, MYCOLOGISCH EN VIROLOGISCH ONDERZOEK

Microbiologisch onderzoek vervolledigt de screening van sperma en kan bestaan uit een bacteriologisch, mycologisch en virologisch onderzoek. Het wordt enkel uitgevoerd als een sterke infertiliteit van het sperma wordt vastgesteld en als hiervoor een infectie met micro-organismen als oorzaak wordt aanzien. Het analyseren in gespecialiseerde laboratoria van een voor de aanwezigheid van een bepaalde kiem verdacht staal, kan hierover uitsluitel geven. Verdieping in de oorzaken, risicofactoren, pathogenese, prognose, analysemethoden van stalen, is te vinden in gespecialiseerde literatuur.

5 INSEMINATIE

Tot op heden is kunstmatige inseminatie (KI) slechts uitgevoerd bij enkele verschillende hertensoorten. Levende nakomelingen werden bekomen bij sikaherten, edelherten, wapiti's, damherten, Père David's-herten, axisherten, witstaartherten en rendieren (Morrow et al., 2009). Kunstmatige inseminatie is wereldwijd de meest gebruikte methode van *assisted reproductive technologies* (ART) (Comizzoli et al., 2000; Cseh en Solti, 2000). Het is de belangrijkste techniek om zeer gewenste genen op grote schaal te kunnen aanwenden, wat via natuurlijke paringsstrategieën onmogelijk zou zijn (Asher et al., 2000). De combinatie van diepgevroren sperma en KI is ook bij herten de meest aangewende ART-methode (Asher et al., 2000). In de jaren '80 waren de eerste diepgevroren sperma technieken en KI commercieel beschikbaar voor hertenkwekers in Nieuw-Zeeland (Asher et al., 2000). Het gebruik van KI bij niet-gedomesticeerde diersoorten kent een aantal uitdagingen waaronder: (1) uitgebreide kennis over de genetica en reproductie van een species; (2) de mogelijkheid om de dieren te kunnen manipuleren zonder overdreven stress of trauma te induceren; (3) het behoud van een eventuele dracht, waarbij neonataal verlies tegelijkertijd beperkt wordt (Morrow et al., 2009).

Om acceptabele resultaten te verkrijgen dient men gemiddeld $2.5-10 \times 10^6$ spermatozoa *intra-uterien* te insemineren (Asher et al., 1992, 2000). Bij herten bedragen drachtpercentages na KI meestal 50-80% (Soler et al., 2003c; Morrow et al., 2009). Verschillende factoren kunnen dit beïnvloeden, zoals de optimale timing voor inseminatie en de inseminatiemethode. Trans-cervicale en laparoscopische *intra-uteriene* inseminatie zijn de meest gebruikte methoden voor KI bij herten (Pintus en Ros-Santaella, 2014). Toch heeft Aller et al. (2009) kunnen aantonen dat de rectale-trans-cervicale KI methode eveneens succesvol werkt bij edelherten. Gizejewski (2004) meldde dat de periode met hoogste libido gepaard gaat met de hoogste spermaconcentratie en de grootste hoeveelheid zaadcellen. Eén staal name tijdens deze periode volstaat voor 20-30 KI dosissen wanneer men opteert voor 20×10^6 zaadcellen met 70% motiliteit. Gosch en Fischer (1989) toonden aan dat het sperma van damherten, bekomen via elektro-ejaculatie van september tot maart, aan de vereisten voor kunstmatige inseminatie voor runderen voldoet, namelijk $\geq 800 \times 10^6$ spermatozoa/ejaculaat, % normale spermatozoa ≥ 60 , % motiele zaadcellen ≥ 60 , graad van motiliteit ≥ 3 .

Verschillende studies rapporteren dat de hoeveelheid spermatozoa, zowel bij *post-mortem* collectie als bij elektro-ejaculatie, hoog genoeg is om verschillende inseminatie dosissen per staal te bereiden. Voor wat betreft inseminaties met epididymaal gewonnen spermastalen is onderzoek verricht bij verschillende hertensoorten, o.a. Europese edelherten (*C. elaphus carpaticus* var. *Montanus*) (Gizejewski et al., 1998), Sikaherten (*C. nippon*) (Hishinuma et al., 2003) en Iberische edelherten (*C. elaphus hispanicus*) (Malo et al., 2005; Martínez et al., 2008). Andere studies zijn uitgevoerd met behulp van elektro-ejaculatie: bij damherten (*Dama dama*) (Mulley et al., 1988), bij edelherten (*C. elaphus*) en damherten (Asher et al., 1993), bij het gevlekte hert (*Axis axis*) (Umapathy et al., 2007) en bij het Iberische edelhert (Martínez et al., 2008). De studies tonen duidelijk aan dat de onderzochte stalen voldoende dosissen spermatozoa bevatten om inseminatiestalen te kunnen produceren. Toch zijn er verschillen qua grootteorde en het is moeilijk om uniforme en vergelijkbare resultaten te

bekomen. Er is behoefte aan een standaardprotocol voor sperma-afname en -analyse. Opvallend is dat in deze studies stalen op verschillende momenten werden genomen. Omdat hertenbokken een duidelijk afgebakende fertiele periode kennen tijdens het jaar, kan dit gegeven alleen al voor grote verschillen in resultaten zorgen.

Bij hertachtigen uit gematigde streken vertonen de vrouwelijke dieren een duidelijke anoestrus-periode tijdens de lente en zomermaanden. Over het algemeen reageren ze niet op oestrus-synchronisatie behandelingen tot en met het begin van de bronst in de herfst (Morrow et al., 1992). Daarom worden kunstmatige inseminaties alleen uitgevoerd tijdens de bronstperiode en onmiddellijk daarna (Asher et al., 1993).

Mellado et al. (2013) hebben recent de effecten van de inseminatiemethode, enerzijds trans-cervicaal en anderzijds laparoscopisch, geëvalueerd met betrekking tot worppercentages, worpgrootte, het gewicht en de neonatale sterfte van de nakomelingen bij witstaartherten. De studie toonde aan dat het worppercentage en de worpgrootte niet significant verschilden tussen beide methoden. Dit staat in contrast met Aller et al. (2009) die vonden dat het drachtpercentage significant hoger was voor de laparoscopische *intra-uteriene* inseminatie methode, terwijl Willard et al. (1998b) geen verschillen rapporteerden tussen beide methoden bij wapiti's en bij sikaherten. Verder onderzoek kan deze tegenstellingen uitklaren.

Het succes van KI is verder inherent verbonden met een optimale oestrusdetectie of oestrussynchronisatie, zodat de inseminatie van het sperma zo dicht mogelijk bij de ovulatie plaatsvindt. Kleine tijdsverschillen tussen inseminatie en ovulatie kunnen er reeds voor zorgen dat fertiel sperma niet aanwezig is op het moment dat er een fertiele eicel aanwezig is in de geslachtstractus van het vrouwelijke dier (Holt et al., 1996). Hierbij is echografie een onmisbaar hulpinstrument voor ART, zowel bij gedomesticeerde als bij wilde dieren (Hildebrandt et al., 2003). Ook bij herten werd echografie reeds meermaals succesvol gebruikt om de reproductieve biologie van de dieren na te gaan, onder meer als methode voor drachtdetectie (bij edelherten: Revol en Wilson, 1991; bij sikaherten: Willard et al., 1996; bij damherten: Willard et al., 1998a; bij rendieren: Savelle et al., 2009; bij Iberische edelherten: Gomez-Nieto et al., 2011). Echografie kan ook ovariële folliculaire dynamieken monitoren (bij edelherten: McCorkell et al., 2006, 2007, 2008) evenals ovum *pick-up* (bij edelherten en sikaherten: Comizzoli et al., 2001; Berg en Asher, 2003).

De meest gebruikte methode voor oestrussynchronisatie bij herten is de *controlled intravaginal drug-releasing device* (CIDR), die progesteron bevat. Ze wordt gevolgd door een injectie met equine chorion gonadotropine (eCG) na verwijderen van CIDR of voordat de KI wordt uitgevoerd. Het gebruik van PGF2 α bij herten is beperkt tot de cyclerende dieren, wat leidt tot een belangrijke limitatie bij seizoensgebonden voortplanting (Morrow et al., 2009). Gentry et al. (2012) vonden echter dat het gebruik van eCG niet essentieel is voor acceptabele drachtpercentages bij witstaartherten. De auteurs noteerden in hetzelfde onderzoek dat een toegenomen drachtpercentage reeds bekomen wordt na *fixed-time* KI, ≥ 60.5 uur na verwijderen van CIDR. Umapathy et al. (2007) testten een alternatief voor CIDR voor oestrussynchronisatie bij het axishert, namelijk een implant intradermaal in de oor basis

met 3mg norgestomet, waarbij een oplossing met 3mg norgestomet en 5mg oestradiolvaleraat intramusculair werd geïnjecteerd bij plaatsing van de implant. Voor exacte synchronisatie-protocollen bij verschillende hertensoorten en voor referenties, wordt verwezen naar de publicatie van Morrow et al. (2009).

ONDERZOEK

1 INLEIDING - DOELSTELLING

Ook bij herten is het bewaren van sperma een zeer belangrijke stap voor *assisted reproductive technologies* (ART), en ook voor het aanleggen van spermabanken (Garde et al., 2006). Het is een van de meest kritieke stappen omdat het fertiele karakter van de zaadcellen behouden moet blijven en dit door veel factoren beïnvloed wordt. Vooraleer men ART kan toepassen dient men een uitgebreide kennis te bezitten over de reproductiebiologie van de diersoort (Asher et al., 1993; Jabbour et al., 1997; Berg en Asher, 2003; Pukazhenthil et al., 2006; Fickel et al., 2007). Bij herten is deze kennis nog beperkt tot enkele soorten, het edelhert vooraan. Dit onderzoek wil specifiek sperma-kwaliteit, spermabewaring en -analyse belichten en daarbij gelijkenissen en verschillen aanstippen tussen het damhert (*Dama dama*) en het sikahert (*Cervus nippon*) en drie Afrikaanse antilopeachtigen waarover literatuurgegevens beschikbaar zijn, namelijk de springbok (*Antidorcas marsupialis*), de blesbok (*Damaliscus pygargus phillipsi*) en de impala (*Aepyceros melampus*). Soorten waarover redelijk wat informatie beschikbaar is, kunnen model staan voor onderzoek bij minder goed gekende soorten. Op deze manier kunnen belangrijke vraagstukken waar onderzoekers momenteel mee kampen, opgelost of verduidelijkt worden. Dit onderzoek wil een bescheiden stap in die richting zijn.

Spermabewaring is essentieel voor het gebruik van ART, daarom zijn optimale bewaringsprotocollen hiervoor van primordiaal belang. De afgelopen decennia is relatief weinig onderzoek gevoerd naar verdunners die specifiek bij herten aangewend kunnen worden. Wellicht is dit te verklaren door het feit dat bestaande verdunners voldoende acceptabele resultaten geven (Asher et al., 2000; Garde et al., 2006; Martínez-Pastor et al., 2009). De meeste verdunners die succesvol gebruikt kunnen worden bij herten en Afrikaanse antilopeachtigen zijn afgeleiden van de veel gebruikte suiker-gebaseerde tris en/of citraat-gebufferde verdunners, origineel gebruikt bij kleine herkauwers (stieren, bokken of rammen) waarbij eidooier tegen koude-shock en glycerol als cryoprotectants worden toegevoegd (Krzywinski en Jaczewski, 1978; Evans en Maxwell, 1987; Asher et al., 2000). Specifiek bij het damhert werden ook zelfgemaakte en commerciële verdunners uitgetest. Voor de bewaring van epididymale zaadcellen gaven Triladyl® en Bioxcell® goede resultaten (Zomborszky et al., 2005). Ook natriumcitraat(2.9%)-eidooier(20%)-glycerol(8%) en Tris-eidooier(2.5%)-glycerol(5%) verdunners zijn efficiënt gebleken voor het bewaren en invriezen van geëjaculeerd damhertensperma (respectievelijk, Jabbour et al., 1993; Soler et al., 2003b).

Motiliteit is de meest gebruikte parameter voor de evaluatie van sperma (Katila, 2001) omdat die de bevruchtingscapaciteit van de dieren zeer goed voorspelt (Krause, 1995; Holt et al., 2007). De sperma motiliteit weerspiegelt enkele essentiële kenmerken van het metabolisme van zaadcellen en is duidelijk gecorreleerd met de gezondheid van de cellen (Kenney et al., 1983). Met name bij paarden is de duur van de motiliteit significant gecorreleerd met bevruchtingspercentages (Katila et al., 2000). Daarom is de evaluatie van de motiliteit bij toenemende bewaartijd een belangrijk onderdeel van dit onderzoek. Er is getracht om het effect van verschillende verdunners op de bewaring en de kwaliteit van damhertensperma te onderzoeken. Hierbij werd vooral het effect van vier verdunners getest en dit

op drie tijdstippen: onmiddellijk na afname, 24 uur en 48 uur later. Dit geeft een indicatie over welke verdunners de bevruchtingscapaciteit van de zaadcellen het beste bewaren. Een vervolgstudie over de invriesbaarheid van sperma in deze verdunners zou zeer nuttig zijn.

Er is getracht om zoveel mogelijk proefdieren voor dit onderzoek te vinden, maar dit bleek geen sinecure. Verscheidene zoo's werden gecontacteerd met de vraag om mee te werken aan het onderzoek, door verschillende hertensoorten en/of *Afrikaans antilopeachtigen* beschikbaar te stellen. Er werd ofwel niet gereageerd ofwel geweigerd. Daarnaast is getracht om dam- of edelherten via particulieren te bereiken, vaak ook zonder resultaat. De vereiste anesthesie van de dieren om de elektro-ejaculatie uit te voeren, bleek een heikel punt te zijn voor eigenaars. Daarom moest dit onderzoek beperkt blijven tot slechts enkele damherten en één sikahert.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 VERDUNNERS EN PRODUCTEN

In dit onderzoek werden 4 verdunners gebruikt: Inra 96, BotuBof, Gebo en Gent (zie tabel 7). De exacte specifieke bestanddelen zijn niet bekend omdat het commerciële producten betreft.

Tabel 7: Overzicht van de basiscomponenten van de in dit onderzoek gebruikte verdunners. AB, antibiotica; ED, eidooier.

Verdunner	Basis
Inra 96	Magere melk, AB
BotuBof	ED
Gebo	Triladyl®
Gent	ED, AB

Inra 96 is op de markt voor het verdunnen en transporteren gedurende 48 uur van vers hengstensperma. Het bevat dus geen cryoprotectants. Ook de Gent-verdunner is een verdunner voor de bewaring van hengstensperma en bevat eveneens geen glycerol. Botubof is een commerciële verdunner voor de bewaring van rundersperma. Gebo is een verdunner op basis van Triladyl®.

2.2 DIEREN EN ELEKTRO-EJACULATIE

In dit onderzoek werden drie damherten (*Dama dama*) en één sikahert (*Cervus nippon*) onderworpen aan een sperma-onderzoek. Het waren gezonde trofeedieren die werden verkocht voor de jacht. De stalen werden genomen tussen 21 februari en 14 maart. Volgens Gosch en Fischer (1989) beslaat de post-paar periode van damherten december tot en met maart, de niet-paar periode start vanaf april. De damherten waren tussen 2 en 8 jaar oud, het sikahert was 18 maanden. De dieren waren dus volwassen en reeds fertiel. De dieren waren dus fertiel volwassen. Ze verbleven na verkoop kort bij de koper/verkoper die geen informatie gaf over hun afkomst of herkomst. Ze werden met een

verdoovingsgeweer van op afstand verdoofd met 340mg Rompun® (Bayer). Na immobilisatie werd een kort klinisch onderzoek uitgevoerd bestaande uit een evaluatie van ademhaling, pols, temperatuur, cardiovasculaire vullingstijd, voedingstoestand en het uitzicht van de dieren. Daarnaast werden ook de lengte en breedte van beide testes en de omtrek van het scrotum bepaald met een gegradeerde caliper en een meetlint. Vervolgens werd het volume berekend aan de hand van $V = \frac{4}{3} \pi a \cdot b^2$ (a = longitudinale, b = transversale radius) zoals in Gosch en Fisher (1989). De consistentie van de teel- en bijballen werden eveneens manueel bepaald en ingeschat, alsook de mate van ontwikkeling van deze laatste.

De elektro-ejaculatie gebeurde met behulp van de elektro-ejaculator (Minitüb Elektro-Ejaculator e320). Na goede fixatie van het dier, werd de probe (16cm lengte; 13cm omtrek; 3 elektroden, 60Hz) rectaal ingebracht. De penis werd zo goed mogelijk uitgeschacht en de spanning op de probe werd stapsgewijs opgevoerd tot het dier ejaculeerde. Het sikahert moest strak gefixeerd worden omdat er reeds bij lage stroomspanningen van de elektro-ejaculator sterke lichamelijke contracties optraden tijdens de ejaculatie. Dit kwam vermoedelijk door het gebruik van een te hoge stroomspanning. Door en tijdens deze spasmen is een hoeveelheid sperma verloren gegaan, waardoor het niet mogelijk was om verschillende verdunners op dit sperma te testen.

2.3 SPERMAVERWERKING EN KWALITEITSBEOORDELING

Tijdens de ejaculatie werd het sperma opgevangen in een plastieken recipiënt op lichaamstemperatuur. **Volume, kleur, consistentie** en **homogeniteit** en eventuele **bijmengingen** werden nagegaan. Ten velde werden volgende handelingen uitgevoerd: er werden verdunningen gemaakt van respectievelijk 5µl sperma in 1000µl verdunner (37°C) (1:200), 50µl in 500µl (1:10) en 100µl in 1000µl (1:10); afhankelijk van de hoeveelheid bekomen sperma werden ofwel alle verdunningen in de 4 verdunners gemaakt, ofwel werden slechts enkele specifiek geselecteerd. Daarnaast werden 5µl sperma met 10µl eosine/nigrosine-supravitaalkleuring gemengd op een draagglaasje (37°C), na 30 seconden wachten werden uitstrijkjes gemaakt door met een tweede draagglaasje (37°C) in een hoek van 45° de druppel uit te strijken over het onderste draagglaasje en te laten drogen aan de lucht. Vervolgens werd 5µl sperma gemengd met 495µl fysiologische zoutoplossing om de spermatozoa te doden, zodat een latere concentratiebepaling kan gebeuren. Voor een latere morfologische analyse werd 250µl sperma gefixeerd in 250µl paraformaldehyde 4%, of respectievelijk 500µl in 500µl, afhankelijk van de hoeveelheid beschikbaar sperma. Tenslotte werd ook de **pH** van het sperma nagegaan met behulp van pH-papier. De verschillende verdunningen van het sperma werden met behulp van koelementen in een isomo doos gekoeld getransporteerd, naar de faculteit diergeneeskunde in Merelbeke en onmiddellijk onderworpen aan verdere analyse.

De verdere beoordeling omvatte de hiernavolgende handelingen: de **concentratie** van het sperma werd zowel met een Bürkse telkamer, bepaald op een water verdund spermastaal (5µl sperma in 495µl fysiologische zoutoplossing), als via *computer assisted sperm analysis* (CASA). Zo kan men inschatten in hoeverre de waarden via beide methoden met elkaar overeenkomen, zodat men later eventueel een voorkeurmethode kan aanwenden. Met de Bürkse telkamer werden er zaadcellen in 40 verschillende telkamers geteld (inhoud van één vierkantje = 1/4000mm³) onder een gewone optische microscoop (Medilux-12; x200). Van spermacellen die op de zijden van het vierkant lagen, werden slechts twee zijden mee in beschouwing genomen. Dit aantal werd vermenigvuldigd met factor 10⁵, zodat men het aantal zaadcellen per ml bekomt. Vervolgens werd gecorrigeerd voor de verdunning (1:100).

Volgende parameters voor spermakwaliteit werden nagegaan: (1) de motiliteit van de spermacellen; (2) een levend/dood verhouding door kleuring met eosine/nigrosine; (3) acrosoom- en membraan integriteit; (4) mitochondriale functie testen. Daarnaast werd ook een morfologische studie uitgevoerd op de spermatozoa, om na te gaan of er zaadcellen met afwijkende vorm aanwezig zijn.

De **motiliteit** van de spermacellen werd bepaald aan de hand van de traditionele methode en met CASA. Voor de traditionele methode werd een druppel vers sperma in verdunner met een micropipet op een voorverwarmd draagglaasje (37°C) geplaatst. Het werd onderzocht onder een gewone optische microscoop (Medilux-12; x200) met heatblock (37°C) (Omron-E5CN). Het totale percentage motiele zaadcellen werd voor de verschillende verdunners geschat en gegradeerd aan de hand van een 0-5 score: (0) geen motiliteit; (1) zwakke staartbewegingen zonder voorwaartse progressie; (2) trage voorwaartse beweging, vaak in een circulair patroon; (3) matige voorwaartse beweging; (4) snelle voorwaartse beweging; (5) zeer snelle voorwaartse beweging (methode beschreven door Evans en Maxwell (1987)). Vervolgens werd ook de CASA-analyse uitgevoerd. Een 10µl spermadruppel met verdunner wordt op een draagglaasje (37°C) aangebracht, bedekt door een coverglaasje, en geanalyseerd door de CASA. Er werden 5 velden gekozen waarin het programma 4 tellingen uitvoerde. Hiervoor werd een contrastfase microscoop (Olympus CH30) met heatblock (37°C) (Tokai hit) op 200x gebruikt en de Sony XC-75CE camera met Motility Analyzer v. 7.4G (Hamilton-Thorne ResearchTM). Via deze methode werd een concentratie, een totaal percentage motiele en progressief motiele zaadcellen bekomen. Een dergelijke analyse werd uitgevoerd voor de verschillende verdunners en verdunningen. Een tweede en derde volledig identieke beoordeling van de motiliteit van de zaadcellen werden uitgevoerd op 24 uur en 48 uur na de eerste analyse met de CASA-methode. De verschillende verdunningen werden gedurende deze tijd gekoeld bewaard (4°C) op een rollator.

Vervolgens werd een differentiatie gemaakt tussen **levende en dode cellen** op het uitstrijkje met sperma en de eosine/nigrosine-kleuring. Hierbij werden 100 zaadcellen geteld om de verhouding levend/dood na te gaan. De uitstrijkjes werden bekeken onder een gewone optische microscoop (Olympus BX51) met een 1000x vergroting met emulsieolie. Zaadcellen met een paarse tint zijn dood; ongekleurde zijn levend. Ook de basis **morfologie** van de zaadcellen werd nagegaan op hetzelfde uitstrijkje. Hiervoor werden kop, middenstuk en staart van 100 levende zaadcellen geëvalueerd. Het

percentage spermatozoa met normale morfologie (N), abnormale koppen (AK) en staarten (AS) en proximale- (PPD) en distale protoplasma druppels (DPD) werd nagegaan.

2.4 INSTELLINGEN CASA EN BIJKOMENDE FLUORESCENT-GEBASEERDE ANALYSE

De instellingen van het CASA-programma waarmee motiliteit en concentratie van de zaadcellen werden bepaald, waren die voor *runderen* en hielden volgende waarden in.

Als bijkomende spermabeoordeling, hoewel minder onderdeel van een standaard sperma-onderzoek, werden **fluorescentietesten** voor **membraan integriteit** en **mitochondriale functie testen** uitgevoerd. Ze werden in het laboratorium op de faculteit verricht op een spermastaal, 1:10 verdund met Inra 96. De analyse gebeurde 5 uur na het collecteren en verdunnen van het zaad. Het protocol van deze analyse omvatte het volgende: de levende spermatozoa werden gevisualiseerd door toevoeging van 2 μ M JC-1 (5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine Iodide) in Hepes-gebufferd spoelmedium gedurende 15 min aan 37°C in 5% CO₂ lucht door de mitochondriën te kleuren in het middenstuk van de zaadcel. Deze fluorochrome stof kan geel-rode (aeroob sperma metabolisme) of groene (anaeroob metabolisme) emissie uitstralen, veroorzaakt door depolarisatie van de binnenste mitochondriale membraan (Garner en Thomas, 1999). JC-1 werd gecombineerd met een levend/dode celkern kleuring, namelijk met SYBR14 (20 μ M) en PI (50 nM) (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit; Moleculaire probes, Leiden, Nederland). De gekleurde zaadcellen werden tweemaal gewassen in Hepes-spoelmedium en geaddeerd op een silicone glasplaat (Marienfeld, Duitsland) met een factor 1.4-diazabicyclo[2.2.2] octaan (DABCO) als *antifade*, en verzegeld met nagellak. Groene spermakoppen werden levensvatbaar beschouwd, terwijl rode spermakoppen als dood werden aanzien. Ten slotte werden de relatieve percentages van levensvatbare en aëroob metaboliserende spermatozoa gescoord door de levensvatbare cellen in vijf microscopische velden te tellen. De monsters werden onderzocht met een Leica DMR microscoop uitgerust met een kwiklamp en bijhorende filters, bij een vergroting van 400x. Ze worden onderverdeeld in drie categorieën op basis van hun JC-1 kleuringspatroon: spermatozoa met rood-oranje middenstukken, zijn zaadcellen met mitochondriën met hoge membraanpotentiaal (H-JC-1); spermatozoa met groene middenstukken, zijn zaadcellen met mitochondriën met lage membraanpotentiaal (L-JC-1); spermatozoa met middenstukken gekleurd in rood-oranje met groene gebieden, hebben mitochondriën met gemengd membraanpotentiaal (M-JC-1) (Gravance et al., 2000; Soler et al., 2005).

Daarnaast werd ook de **acrosoom status** van de spermatozoa onderzocht op een 1:1 verdund spermastaal met paraformaldehyde 4% met behulp van fluoresceïne-isothiocyanaat geconjugeerd pinda agglutinine (PNA-FITC), zodat acrosoom-intacte en acrosoom-beschadigde zaadcellen van elkaar onderscheiden kunnen worden (Rathi et al., 2001). De spermatozoa werden kort gespoeld met PBS gedurende 15 min op kamertemperatuur, na fixatie in paraformaldehyde 4% en werden verder gepermeabiliseerd door incubatie in 0,1% Triton X-100 in PBS gedurende 10 min bij kamertemperatuur. Na het wassen in PBS, werden de zaadcellen gekleurd met 1 μ g/ml PNA-FITC

gedurende 15 min op kamertemperatuur. Na twee extra wassingen met PBS werden zaadcellen geaddeerd op een silicone glasplaat, zoals hoger beschreven. Spermatozoa met PNA-FITC-gelabeld acrosoom werden als acrosoom-intact beschouwd, terwijl spermatozoa zonder fluorescentie op het acrosoom werden beschouwd als acrosoom-gereageerd. De relatieve percentages van acrosoom-intacte spermatozoa werden geschat. De stalen werden onderzocht met een Leica DMR microscoop uitgerust met een kwiklamp en bijhorende filters, bij een vergroting van 400x.

3 RESULTATEN

3.1 DIEREN EN ELEKTRO-EJACULATIE

Bij een korte klinische evaluatie van ademhaling, pols, temperatuur, mucosae en conditie bleken alle dieren in goede gezondheid te verkeren. De gemiddelde afmetingen van de testes waren 7 en 8cm in lengte, respectievelijk links en rechts, met een gemiddelde breedte van 3,5cm zowel links als rechts. Aan de hand van de formule $V = 4/3 \pi a.b^2$ (a = longitudinale, b = transversale radius), werd een gemiddeld volume bekomen van 45cm³ en 51cm³ respectievelijk links en rechts. De teel- en bijballen vertoonden bij de verschillende dieren een normale consistentie, daarbij was de epididymis eveneens normaal ontwikkeld. Ejaculatie trad bij de damherten relatief gemakkelijk op. De eerste werd na 2min bekomen door een stroomspanning van 9,5A, bij het tweede dier is geopteerd om een hogere stroomspanning in te stellen, namelijk van 14A. Ejaculatie trad ook hier gemakkelijk op na 1,5min. Het derde damhert ejaculeerde na 1min op een stroomspanning van 8,5A. Het sikahert ejaculeerde op een stroomspanning van 4,5A na 1,5min.



Fig. 2: damhert 1 na afloop van de sperma-afname.



Fig. 3: (links) het toestel van de elektro-ejaculator met de probe waarop glijmiddel wordt aangebracht. (Rechts) overzicht van het proefopzet. Het damhert is correct gesedeerd en gefixeerd, een blinddoek over de ogen, waarbij de neusgaten worden vrijgelaten, de voorste persoon houdt het gewei met een voet tegen de grond, de achterste persoon fixeert één achterpoot in de hand, en de andere met de voet. Een goed overzichtelijke proefopzet is eveneens aan te raden.

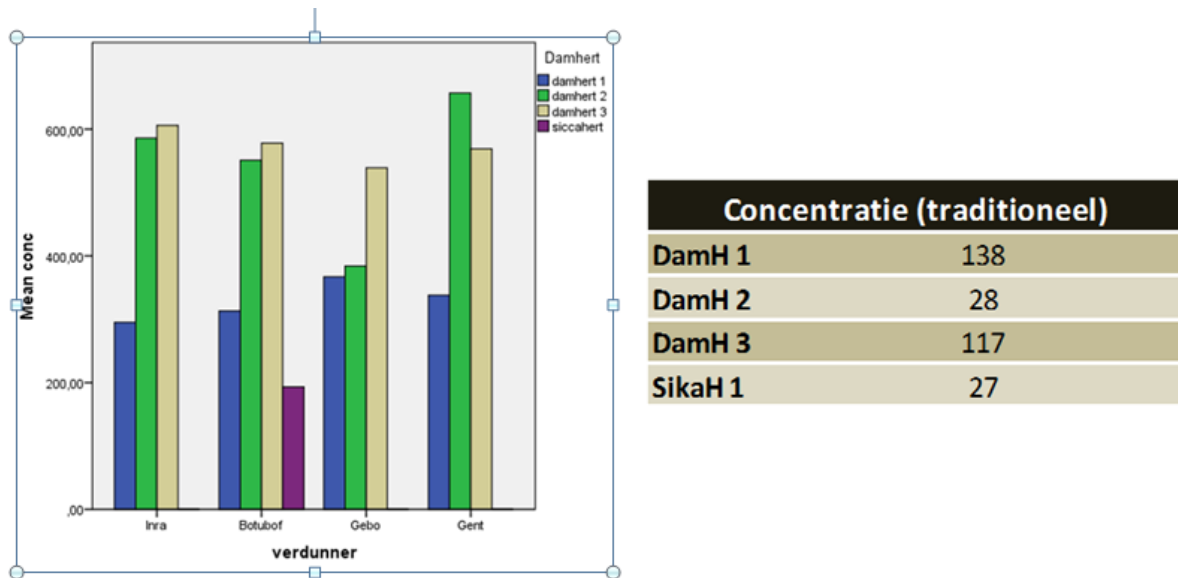


Fig. 4: (links) sedatie en fixatie van het sikahert. (Rechts) uitschachting en fixatie van de penis tijdens het collecteren van het sperma.

3.2 MACROSCOPISCHE SPERMABEOORDELING EN CONCENTRATIE

Het sperma van alle dieren had een licht waterige consistentie en een grijze kleur, een gemiddeld volume van 1.4cc (1.4 ± 0.4) bij de damherten, waarbij een toename werd genoteerd van 80% van het spermavolume tussen respectievelijk 9.5A en 14A stroomspanning van de elektro-ejaculator. Het sikahert gaf een spermavolume van slechts 50 μ l. Door de sterke spasmen van het lichaam is er tijdens de ejaculatie redelijk wat zaad verloren gegaan bij het opvangen. De pH van het

damhertensperma had bij de drie afnames respectievelijk een waarde van 7.9, 8.3 en 7. Bij het sikaht was er te weinig sperma voorradig om de pH te meten. Er werden geen bijmengingen in de spermastalen vastgesteld, en de stalen waren eveneens homogeen van consistentie. De concentratie van het sperma bekomen via de traditionele manier, i.e. via de Bürkse telkamer, en bekomen via de CASA zijn weergegeven in figuur 5 en tabel 8.



Figuur 5 en Tabel 8: de concentratie van de spermastalen inde verschillende verdunners, berekend via het CASA-systeem (links) en de traditionele methode met de Bürkse telkamer (rechts). De gemiddelde waarden, bekomen via de CASA, staan in M/ml; duidelijke fluctuatie. De getallen in de tabel, dienen vermenigvuldigd te worden met $\times 10^7$ zaadcellen per milliliter.

3.3 EVALUATIE VAN SPERMAKWALITEIT PARAMETERS

3.3.1 Levend/dood kleuring met eosine/nigrosine

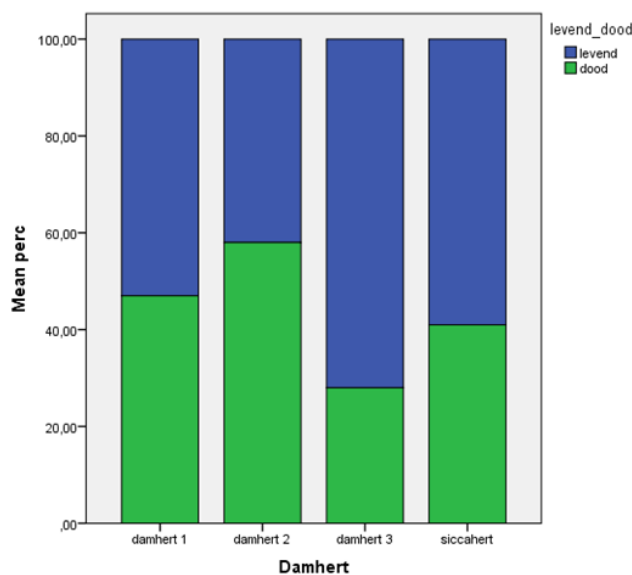


Fig. 6: het percentage van de levend/dood bepaling van de zaadcellen met eosine/nigrosine kleuring.

3.3.2 Membraanpotentiaal, Acrosoom integriteit en Mitochondriale status

De evaluatie van de plasmamembraan-potentiaal en van de mitochondriale status werd verricht op twee spermastalen 1:10 verdund met Inra 96. Hierbij viel onmiddellijk op dat de zaadcellen een zeer vitaal uitzicht hadden en dat >80% een intacte membraan-potentiaal (groene koppen) had. Daarnaast toonden 50% van de mitochondriën een duidelijk aeroob (geel-rood) metabolisme.

De acrosoom-integriteit werd eveneens beoordeeld. Hierbij werden $\geq 75\%$ zaadcellen met intact acrosoom genoteerd.

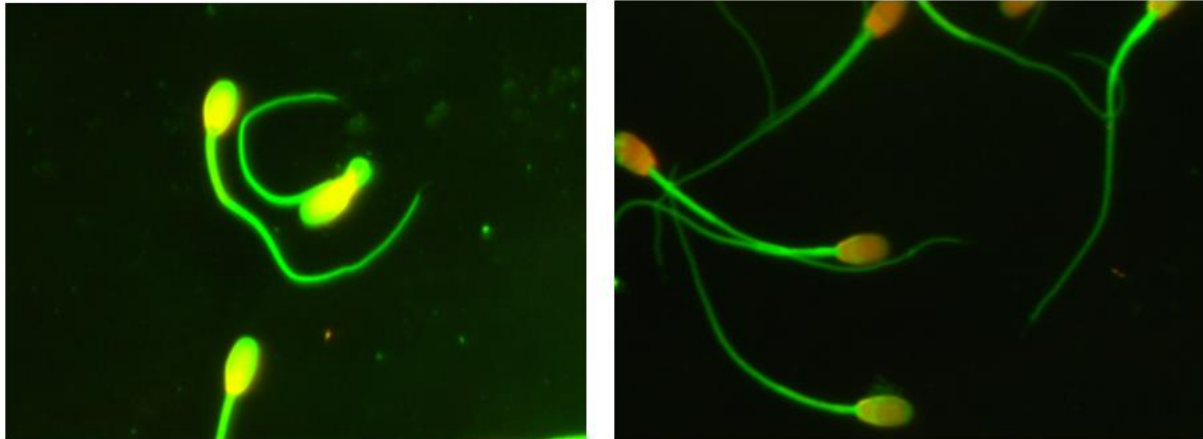


Fig. 7: (Links) groene spermakoppen op fluorescente JC-1 en SYBR14-PI kleuring ter evaluatie van de integriteit van plasmamembraanpotentiaal en mitochondriale status; membraan intact en anaeroob metabolisme in de mitochondriën van de middenstukken. (Rechts) oranje-rode koppen, membraanpotentiaal niet-intact; groene middenstukken, anaeroob metabolisme.

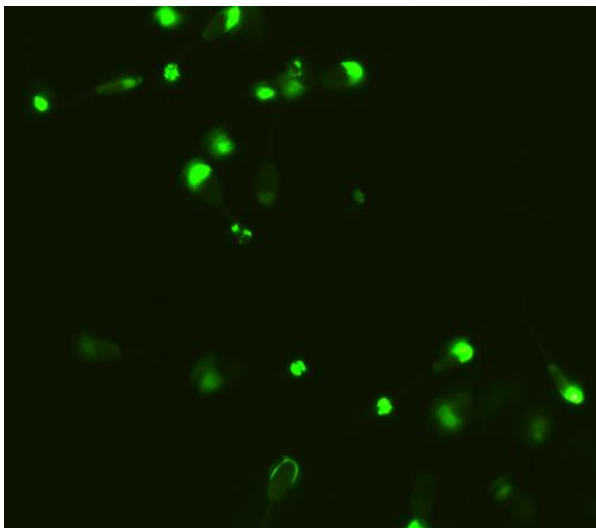


Fig. 8: Acrosoom integriteit evaluatie na fluorescente PNA-FITC kleuring; de acrosomen met groene kleuring zijn intacte acrosomen

3.3.3 Motiliteit

De totale- en progressieve motiliteit van het sperma is weergegeven in figuur 9. De CASA-parameters LIN, VCL, ALH, BCF, STR zijn weergegeven in respectievelijk figuur 10, 11 en 12. Voor de geschatte motiliteit van de zaadcellen wordt eveneens verwezen naar figuur 10, rechts. De motiliteitscore van het sperma bedroeg voor elke verdunner, op tijdstip 0uur, 2. In tegenstelling tot Inra 96 voor damhert 1 en botubof voor het sikahert, waar de motiliteitscore 3 bedroeg.

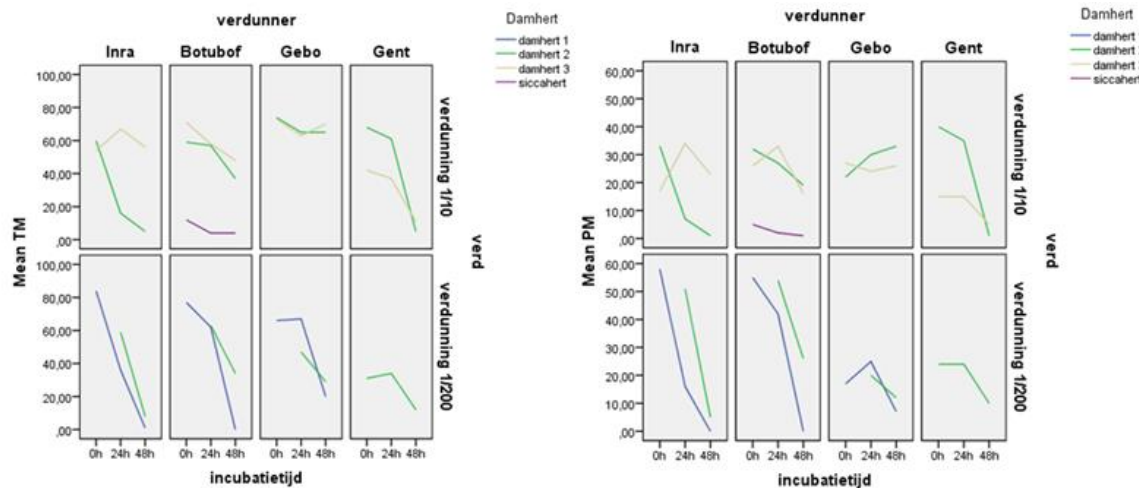


Fig. 9: De totale- en progressieve motiliteit (resp., links en rechts) van de spermatozoa in de verschillende verdunners, in 1/10 (boven) en 1/200 (onder) verdunningen, op een 0uur, 24uur en 48uur evaluatie voor damhert 1, 2 en 3 en het sikahert. Een stijgende TM en PM met toenemende bewaartijd voor de Gebo verdunner in 1/10, lijkt onwaarschijnlijk, echter de bekomen waarden via het CASA-systeem.

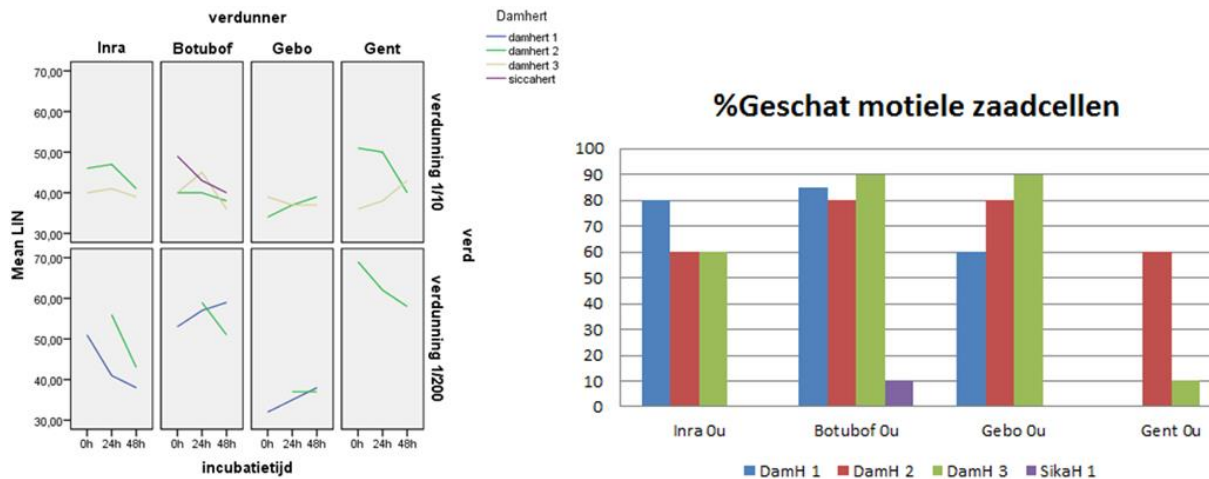


Fig. 10: (Links) CASA-parameter LIN van de zaadcellen in de verschillende verdunners, in 1/10 (boven) en 1/200 (onder) verdunningen, op een 0uur, 24uur en 48uur evaluatie voor damhert 1, 2 en 3 en het sikahert. (Rechts) percentage geschat motiele zaadcellen op 0uur voor damhert 1, 2 en 3 en het sikahert.

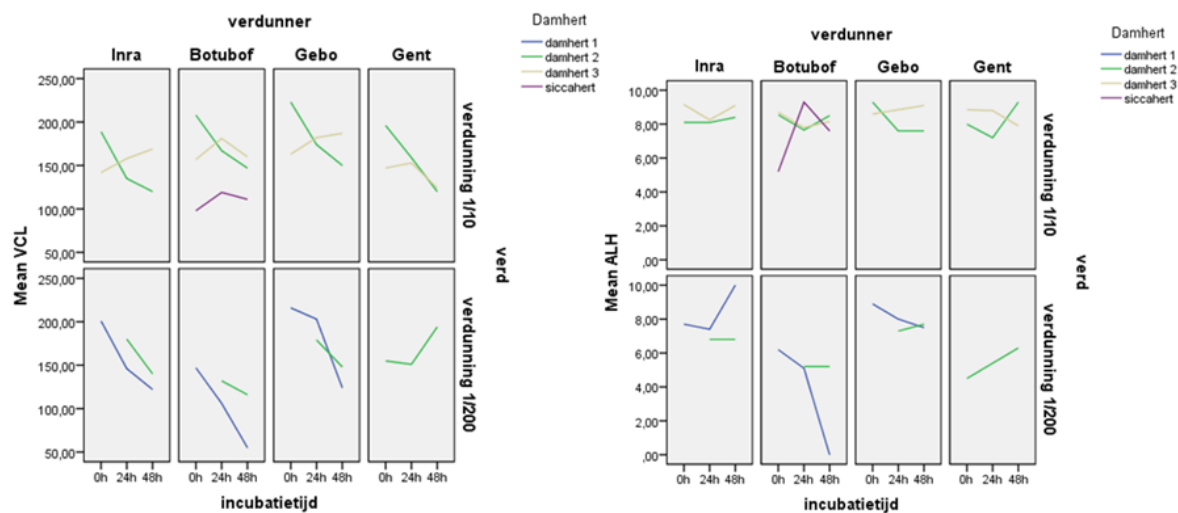


Fig. 11: CASA-parameters VCL en ALH (resp., links en rechts) van de zaadcellen in de verschillende verdunners, in 1/10 (boven) en 1/200 (onder) verdunningen, op een 0uur, 24uur en 48uur evaluatie voor damhert 1, 2 en 3 en het sikahert.

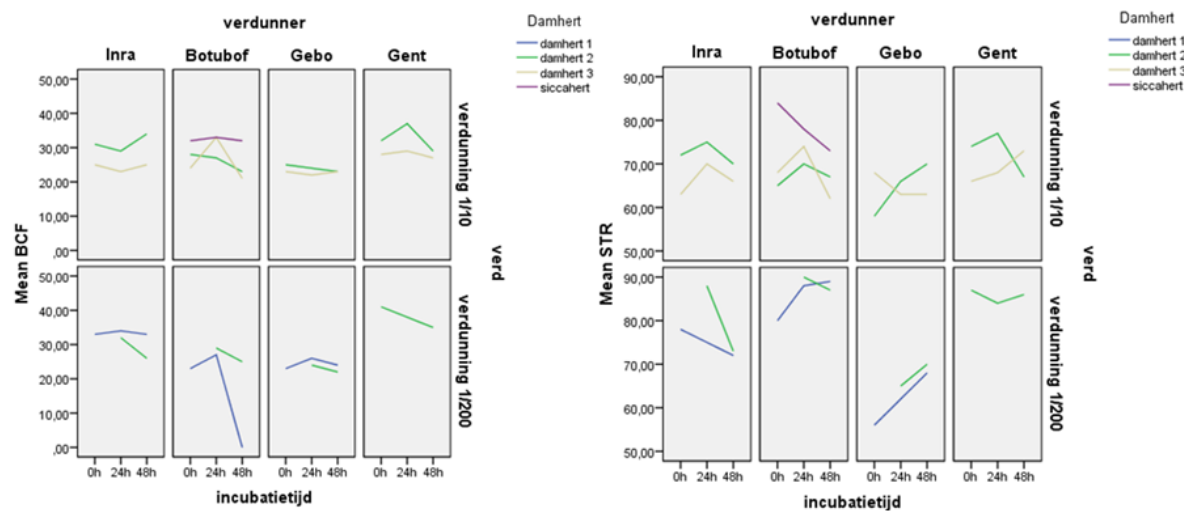


Fig. 12: CASA-parameters BCF en STR (resp., links en rechts) van de zaadcellen in de verschillende verdunners, in 1/10 (boven) en 1/200 (onder) verdunningen, op een 0uur, 24uur en 48uur evaluatie voor damhert 1, 2 en 3 en het sikahert.

3.3.4 Morfologie

Hierna worden de resultaten van de morfologische analyse van de zaadcellen na eosine/nigrosine kleuring, weergegeven.

Tabel 8: Tabel met het %levende zaadcellen; van dit percentage werd de spermaformule voor afwijkende zaadcelmorfologie opgesteld. Het %normale spermatozoa %No; %abnormale koppen, %AK; %abnormale staarten, %AS; %proximale protoplasmadruppels, %PPD; %distale protoplasmadruppels, %DPD.

Morfologie en %levende zaadcellen						
	%Levend	%No	%AK	%AS	%PPD	%DPD
DamH 1	53	66	2	23	8	2
DamH 2	42	65	1	24	4	5
DamH 3	72	59	0	16	2	23
SikaH 1	59	74	3	18	5	0

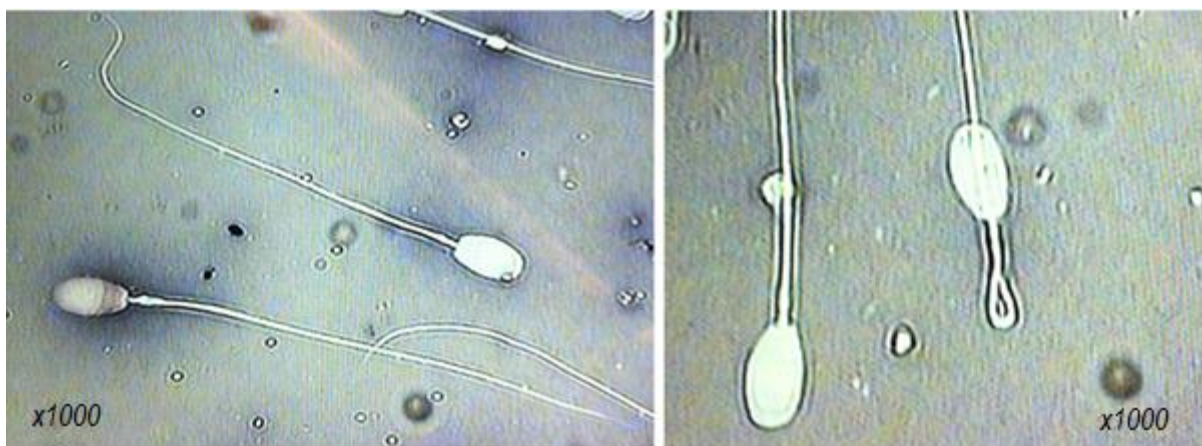


Fig. 13: morfologische evaluatie van zaadcellen van damherten met eosine/nigrosine; (links) levend/dood evaluatie van het sperma. Zaadcelkoppen met een paarse kleur, zijn dood; deze met een witte kleur, zijn levend. (Rechts) afbeelding van twee levende cellen; de linkse zonder morfologische afwijkingen, de rechtse met een teruggeslagen staart.



Fig. 14: morfologische evaluatie van zaadcellen van damherten; (links) eosine/nigrosine; a) Afgebroken staart, b) midpiece-reflex, c) losse kop. (Rechts) 4% paraformaldehyde; a) proximale protoplasmadruppel, b) distale protoplasmadruppel, c) opgerolde staart, d) teruggeslagen staart.

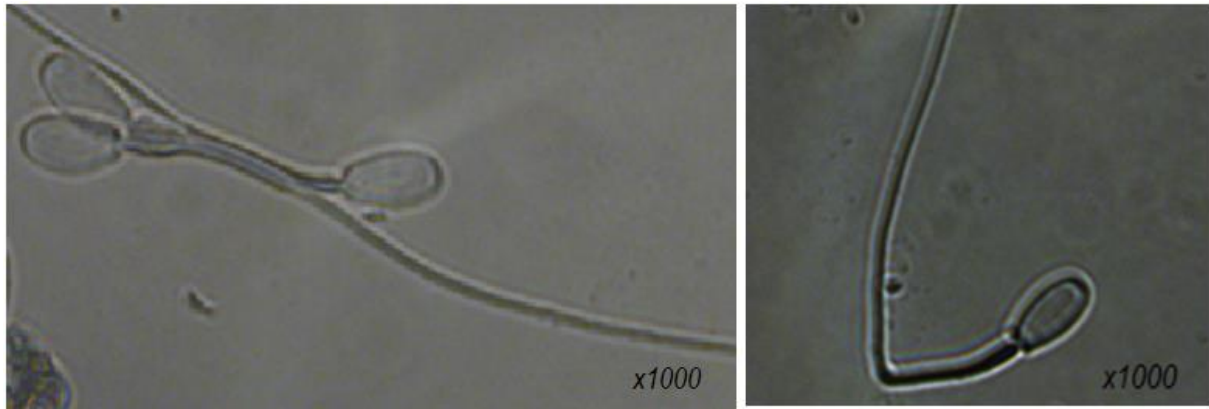


Fig. 15: morfologische evaluatie van damhertensperma, gefixeerd in 4% paraformaldehyde; (links) dubbele-kop-vorm. (Rechts) gebroken staart.

DISCUSSIE

Ondanks het feit dat damherten een belangrijk deel vertegenwoordigen van het hertenbestand in Europa, is de literatuur over hun spermakarakteristieken en –kwaliteit relatief schaars, zeker in vergelijking met die over gedomesticeerde hoefdieren en over edelherten.

Verscheidende auteurs stelden dat elektro-ejaculatie relatief gemakkelijk uit te voeren is bij damherten (Seager et al., 1978; Gosch en Fisher, 1989; Veldhuizen, 1994; Asher et al., 1996). Ook in dit onderzoek werd ze bij alle onderzochte dieren succesvol uitgevoerd.

Zowel de grijze kleur van het sperma, als het gemiddelde volume en de homogeniteit van het spermastaal komen overeen met bevindingen van Gosch en Fischer (1989) en van Veldhuizen (1994). Ook qua volume en qua consistentie van de teelballen komen de bevindingen overeen met die van Gosch en Fisher (1989). De waargenomen concentratie van spermastalen bekomen in februari en maart, waren van vergelijkbare grootteorde als deze in Gosch en Fischer (1989). De trend dat spermastalen van damherten sterker geconcentreerd zijn in februari dan in maart, werd hier ook vastgesteld, respectievelijk 1380×10^6 versus 1170×10^6 spermacellen/ml. Dit is waarschijnlijk te verklaren door het feit dat het einde van het post-paar seizoen en de infertiele periode nadert waardoor de kwaliteit van het zaad afneemt.

Het valt op dat de *spermaconcentratie* gemeten via de CASA-software duidelijke schommelingen vertoont afhankelijk van de beschouwde verdunner. Dit is waarschijnlijk aan de CASA te wijten, aangezien het weinig waarschijnlijk is dat er in het spermastaal zelf interne concentratieverschillen zouden bestaan wanneer het staal onmiddellijk verwerkt wordt. De schommelingen zouden een vertekend beeld kunnen geven bij het evalueren van de concentratie. Daarom geniet de traditionele methode, i.e. met de hemocytometer, de voorkeur om spermaconcentratie te meten.

Men kan de viabiliteit van spermatozoa beoordelen aan de hand van volgende parameters: (1) een levend/dood verhouding door kleuring met eosine/nigrosine; (2) acrosom- en membraan integriteit; (3) mitochondriale functietesten; (4) motiliteit van de spermacellen. Daarnaast kan men nog een morfologische studie uitvoeren om na te gaan of er zaadcellen met afwijkende vorm aanwezig zijn, die zijn vaak inherent verbonden aan gedaalde fertiliteit van het sperma.

Hoe hoger het percentage *levende zaadcellen*, hoe hoger de vruchtbaarheid van het zaad. Aan de hand van de E-N-kleuring kan men de integriteit van de plasmamembraan evalueren en zo differentiëren tussen levende en dode spermatozoa. Levende zaadcellen kunnen niet gekleurd worden met behulp van eosine, omdat de celmembraan hiervoor niet doorgankelijk is. Levende cellen blijven wit tot zilver op een lichtpaarse achtergrond.

Het percentage levende zaadcellen verschilde sterk tussen de geteste dieren. Zo bedroeg het 42% bij damhert 2, en 72% bij damhert 3. Aangezien alle stalen op dezelfde manier werden bekomen en ook de uitstrijkjes op dezelfde manier werden gemaakt, lijkt het onwaarschijnlijk dat het verschil in percentage levende zaadcellen door afname of manipulatietechnieken verklaard moet worden. Eerder

weerspiegelt het verschil tussen de dieren zelf. De levend/dood bepaling is een universeel aanvaarde techniek die door onderzoekers wordt gebruikt om de kwaliteit van sperma te graderen. Het is evenwel ook een relatief subjectieve techniek, waardoor percentages over- of onderschat kunnen worden en vergelijkingen tussen verschillende onderzoeken vaak onmogelijk zijn. Toch geeft de levend/dood bepaling een goede indicatie voor de algemene viabiliteit van het sperma. Op basis van de gegevens in dit onderzoek heeft damhert 2 duidelijk minder levende zaadcellen dan damhert 3, en zal de viabiliteit van het sperma van damhert 3 hoger zijn.

Microscopisch onderzoek kan nog meer gegevens opleveren over de viabiliteit van spermatozoa. Zo kunnen ook de *integriteit van de plasma- en acrosom-membraan* en de *mitochondriale functie* van zaadcellen in het ejaculaat bepaald worden, en die kunnen een duidelijke rechtstreekse weergave zijn van de vruchtbaarheid. Men kan ze bepalen met behulp van een supravitaalkleuring van het staal, door fluorescente kleuringen en door een hypo-osmotische zwellingstest (HOS) (Jeyendran et al., 1992). In dit onderzoek is gebruik gemaakt van fluorescente kleuringen.

Fernández et al. (2013) analyseerden de plasmamembraan- en acrosom-integriteit van damhertensperma, maar verder is er in de literatuur geen informatie specifiek voor damherten, beschikbaar over het gebruik van fluorescente kleuringen om membraan- en acrosom integriteit en mitochondriale functie van zaadcellen te evalueren. Meer nog, JC-1 en SYBR14-PI/PNA-FITC, gebruikt in deze studie, zijn tot op heden bij hertachtigen enkel beschreven voor het edelhert (Malo et al., 2005; Soler et al., 2005; Martínez-Pastor et al., 2005c, 2006a,b,c, 2009; Fernández-Santos et al., 2007a,b; Martínez et al., 2008; Anel-López et al., 2012; Mata-Campuzano et al., 2012) en voor het sikahert (Cheng et al., 2004). De basismethode met JC-1 en PI/PNA-FITC kleuring, werd origineel beschreven in Cheng et al. (1996) voor hengstensperma, en wordt sindsdien routinematig gebruikt en geperfectioneerd.

De resultaten bekomen in dit onderzoek toonden duidelijk aan dat een groot deel van de zaadcellen van damherten in februari-maart nog morfologisch intact zijn. Bij een eerste evaluatie viel onmiddellijk op dat een groot aantal spermatozoa een zeer vitaal uitzicht hadden. $\geq 75\%$ zaadcellen met intact acrosom en $\geq 80\%$ met een intacte membraanpotentiaal in de Inra 96-verdunner ondersteunen deze bewering. Aangezien de analyse is uitgevoerd ongeveer 4 uur na collecteren van het zaad, toont dit aan dat de manier van collecteren en kortstondig bewaren van het damhertensperma in Inra 96 goed werkt voor deze diersoort. Er is echter geen garantie dat op een 24 uur en 48 uur tijdstip dezelfde morfologisch intacte zaadcellen zullen worden terug gevonden. De evaluatie van de integriteit van de plasmamembraan, met behulp van SYBR14-PI, bevestigt eveneens de goede resultaten van de levend/dood kleuring met eosine/nigrosine. Bij 50% van de zaadcellen werden echter vooral zaadcellen aangetroffen met groene JC-1-gekleurde middenstukken, wat wijst op een anaeroob metabolisme van de cel. Dit anaeroob metabolisme is een kortstondig reddingsmiddel, waarna de zaadcel snel zal afsterven. Dit kan erop wijzen dat de Inra 96 verdunner misschien toch niet de optimale verdunner is voor het damhertensperma, en dat andere opties beter overwogen kunnen worden. Wegens het budget van de masterproef, is bij damhert 2 geen fluorescente kleuring van het sperma uitgevoerd. Dit hert had een relatief lage levend/dood verhouding, namelijk 42%, waardoor het

verschil in fluorescente kleuring van het zaad met de andere herten, interessant had kunnen zijn. Er is in de literatuur geen referentie beschikbaar over gebruikelijke waarden van fluorescente kleuringen van damhertensperma. Daarom is het moeilijk vergelijken welke parameters nu als normaal of abnormaal kunnen worden aanzien voor deze diersoort. De waarden gevonden in dit onderzoek kunnen daarom enkel als een initiële basisindicatie worden beschouwd. Verder onderzoek op een groter aantal dieren is aan te raden om de getallen meer kracht bij te zetten.

Algemeen toonde de studie een dalende trend in de kwaliteitsparameters van het sperma met toenemende bewaartijd. In een *follow-up* studie zou ook een nieuwe evaluatie van membraan- en acrosoom-integriteit en van mitochondriale functies interessant zijn op 24uur en 48uur na collecteren. Op deze manier kan men evalueren hoe deze parameters evolueren met toenemende bewaartijd. Daarnaast kan het ook interessant zijn om in vervolgonderzoek fluorescente kleuringen uit te voeren op sperma verdund met Gebo en Botubof, die bij damherten de spermakwaliteit beter bewaren dan Inra 96, en ze te vergelijken met de resultaten van deze laatste bekomen in dit onderzoek.

De *motiliteit* is eveneens zeer belangrijk voor de viabiliteit van sperma, en een belangrijke parameter in sperma-onderzoek. De resultaten worden sterk beïnvloed door uitwendige factoren, vooral tijdens de verwerking van stalen bij een lage omgevingstemperatuur. Men kan enerzijds de traditionele methode (Evans en Maxwell, 1987) aanwenden die niet geautomatiseerd en subjectief is, of anderzijds de geautomatiseerde CASA-methode gebruiken om de motiliteit van sperma te graderen.

Beide methoden zijn in deze studie bij de verschillende verdunners uitgevoerd op het 0uur tijdstip, dit om te evalueren of de traditionele methode als een goed alternatief kan dienen voor de CASA op momenten dat die niet beschikbaar is. Bijvoorbeeld, ten velde kan, zeker voor wilde dieren, de toegang tot het CASA-systeem onmogelijk zijn. Wat onmiddellijk opviel uit de resultaten was dat de geschatte waarden van de motiele zaadcellen via de traditionele methode de trend volgden van de CASA, maar steeds een overschatting waren van de totale motiliteit. De traditionele methode kan dus als alternatief dienen om de algemene grootte van de motiliteit te voorspellen, zonder daarbij absolute cijfers in beschouwing te nemen. De motiliteitscore was minder nuttig, omdat in dit onderzoek bijna elk staal een score 2 kreeg toegewezen. Inra 96 bij damhert 1 en botubof bij het sikahert, vormden hierop de uitzondering en waren de enige verdunners waar een score 3 kon worden toegekend. Er kon dus geen differentiatie gemaakt worden in het percentage progressiviteit van de zaadcellen van de verschillende spermastalen in verschillende verdunners. Gosch en Fisher (1989) konden in hun onderzoek van damhertensperma in februari en maart gemiddeld 10% hogere geschatte motiele zaadcellen aantonen, dan in dit onderzoek. De gemiddelde motiliteitscore lag in hun onderzoek echter danig hoger, namelijk gemiddeld 3-4. Hun analyses gebeurden echter op vers onverdund sperma, wat de verschillen kan verklaren.

De geautomatiseerde CASA-methode kan dus best overwogen worden om de motiliteit van het hertensperma beter te graderen. CASA berekent verschillende kinetische parameters die een grotere informatieve waarde bezitten in het graderen van de motiliteit van het sperma en geeft daarnaast ook een belangrijke indicatie over de algemene spermakwaliteit en viabiliteit. CASA-analyse van sperma is

bij herten enkel al bij edelherten uitgevoerd (Martínez et al., 2008; Martínez-Pastor et al., 2005a,d, 2006a,b,c, 2009; Domínguez-Rebolledo et al., 2010; Anel-López et al., 2012; Mata-Campuzano et al., 2012; Ramón et al., 2012; Ritten et al., 2012).

Naast de standaard CASA-parameters TM en PM, werden VAP, VSL, VCL, ALH, BCF en LIN in vele studies bij andere diersoorten geëvalueerd wegens hun significante correlatie met de vruchtbaarheid van sperma (Cancel et al., 2000). VAP, VSL, ALH, LIN en STR duiden rechtlijnigheid van de beweging van zaadcellen aan, hetgeen zeer belangrijk is voor de voortbeweging van het zaad in de vrouwelijke geslachtstractus.

VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR en LIN beschrijven de beweging van een zaadcel in een medium van een artificieel punt A naar B. Op basis van deze parameters kunnen zaadcellen bestempeld worden als *progressief motiel* (i.e. actief bewegend onafhankelijk van de snelheid, ofwel rechtlijnig of in grote cirkels), *niet-progressief motiel* (alle andere vormen van bewegingspatronen, in afwezigheid van vooruitgang) of *onbeweeglijk* (WHO, 2010). Een zaadcel wordt als traag progressief motiel beschouwd als $VAP > 5\mu\text{m/s}$, snel progressief motiel als $VAP > 25\mu\text{m/s}$ met $STR > 80\%$ en niet progressief motiel als $VAP < 5\mu\text{m/s}$.

De literatuur over het gebruik van deze parameters bij hertachtigen is relatief schaars. Martinez-Pastor et al. (2009) onderzochten het effect van cryopreservatie van zaadcellen op deze parameters bij edelherten. Daarnaast onderzochten Chatiza et al. (2012) ook deze CASA parameters en hun relatie tot de motiliteit van zaadcellen bij springbokken, impala's en blesbokken. In deze studie werden zaadcellen bestempeld als progressief bewegend wanneer de STR-waarde $>80\%$ was en rechtlijnig wanneer $LIN \geq 50\%$; circulair wanneer $LIN < 50\%$. Daarnaast worden de parameters VAP, VCL, ALH en BCF geassocieerd met hyperactiviteit en capacitatie van zaadcellen (Chatiza et al., 2012). Hyperactieve motiliteit van zaadcellen is bij zoogdieren een vorm van krachtige niet-lineaire beweging, die zaadcellen vertonen bij doorgang doorheen de eileider van vrouwelijke dieren (Yanagimachi, 1994; Suarez en Pacey, 2006). Het wordt aanzien als de laatste stap van de capacitatiefase en is aldus belangrijk voor het bevruchtungsvermogen (Katz en Drobnis, 1989). Vooral gestegen VCL-waarden zijn karakteristiek voor zaadcellen die een krachtig hyperactief bewegingspatroon vertonen. Daarnaast zijn ze ook indicatief voor een medium dat capacitatie van zaadcellen bevordert (Chatiza et al., 2012). Hyper geactiveerd sperma zal toegenomen waarden van ALH en VCL bezitten, samen met gedaalde LIN en STR (Cancel et al., 2000; McPartlin et al., 2009). Chatiza et al. (2012) zagen dat deze bevindingen ook opgingen voor zowel springbok, blesbok als impala. Specifiek voor herten is er weinig tot geen informatie bekend over de relatie van deze parameters met hyperactiviteit en fertiliteit.

In dit onderzoek over het effect van verschillende verdunners op de karakteristieken van damhertensperma, is vooral visueel gebleken dat Gebo zeer duidelijke hyperactiviteit van het sperma veroorzaakte. In de andere verdunners vertoonden de spermatozoa eveneens een belangrijke mate van hyperactiviteit, maar er waren minder zaadcellen met deze uitgesproken eigenschap. Dit wordt ook gereflecteerd in gestegen VCL- en ALH-waarden (zie fig. 11), en in gedaalde LIN- en STR-waarden (zie fig. 10 en 12) voor de Gebo-verdunner in vergelijking met de andere verdunners. Er zijn

echter geen controle metingen gebeurd, i.e. analyse van onverdunde stalen onmiddellijk na collectie, waardoor het niet mogelijk is om hier te besluiten dat de parameters in deze studie verhoogd of verlaagd zijn. Aangezien dit de eerste studie is waar damhertensperma is geëvalueerd met het CASA-systeem, was het ook niet mogelijk om de resultaten te vergelijken met die vermeld in de literatuur.

Een gelijkaardige bedenking geldt voor studies op *Afrikaanse antilopeachtigen*. CASA-analyses zijn zelden in onderzoek opgenomen (Chatiza et al., 2012). Zo is er weinig vergelijkingsmateriaal voorhanden en ook geen standaardwaarden. Onderzoek staat hier nog in de kinderschoenen, ondanks toegenomen belangstelling voor en zorg om de biodiversiteit van antilopensoorten.

Men moet er ook rekening mee houden dat er duidelijke species verschillen bestaan voor wat betreft deze parameters en hun relatie op de motiliteit en fertiliteit van zaadcellen. Zo zijn VCL en VSL duidelijk gecorreleerd met het bevruchtingskarakter bij stieren (Aiken et al., 1994; Wittemer et al., 1997; Liu et al., 2007), terwijl VCL, LIN, ALH en TM geen significante correlatie kennen bij merries (Palmer en Magistrini, 1992). In hoeverre dit bij damherten opgaat, is in de literatuur niet terug gevonden.

Uit de resultaten bekomen via CASA, kan men in dit onderzoek afleiden dat de TM, PM en VAP van de zaadcellen bij de vier verdunners progressief zal dalen met toenemende bewaartijd. Er bestond eveneens individuele variatie tussen de damherten. Voor damhert 3 scoorde de Inra 96 verdunner opmerkelijk beter dan voor damhert 2; de Gent verdunner scoorde dan weer beter voor damhert 2 dan voor damhert 3, echter slechts gedurende 24uur. In hoeverre verschillende verdunners steeds beter scoren bij verschillende individuen, kan niet gezegd worden op basis van dit onderzoek, en dient te blijken uit verdere studies op een grotere steekproef.

Om representatieve conclusies te kunnen trekken moet men zich ervan vergewissen dat men steeds dezelfde instellingen van de CASA apparatuur heeft gebruikt, wil men studies onderling vergelijken. Verschillende cut-off waarden voor bijvoorbeeld VAP en STR kunnen ertoe leiden dat dezelfde zaadcellen ofwel als progressief ofwel als niet-progressief motiel zullen bestempeld worden. Dergelijke meetfouten blijken nog vaak een heikel punt (Hoogewijs et al., 2010). Gestandaardiseerde instellingen bij verschillende diersoorten zijn dus aan te raden.

Het sperma van damhert 3 werd beter bewaard in Inra 96, Botubof en Gebo vergeleken met dat van de andere dieren. Daarnaast kan men stellen dat Gebo het best de TM, PM en VAP bewaart bij alle geteste individuen. Triladyl®, dat in Gebo aanwezig is, werd ook door Zomborszky et al. (2005) beschouwd als een goed alternatief voor de bewaring van damhertensperma. In hun onderzoek werden evenwel epididymale zaadcellen geëvalueerd. Zoals gezegd, bleef de evaluatie van het sperma van het sikahert in dit onderzoek beperkt tot de Botubof-verdunner, omdat er te weinig sperma voorhanden was. Het is dus niet mogelijk om een vergelijking te maken of om conclusies te trekken. De motiliteit van de zaadcellen van het sikahert in de Botubof-verdunner was over het algemeen slecht in vergelijking met die van het damhert.

Met toenemende bewaartijd, werden er op sommige tijdstippen echter onverwachte en onwaarschijnlijke stijgingen en fluctuaties in de data genoteerd voor verschillende parameters (zie fig. 9-12). Men moet hierbij in het achterhoofd houden dat de gegevens bekomen in dit onderzoek, afkomstig zijn van één staal van een beperkt aantal damherten, die dus slechts één meting leveren. Wanneer men meer dieren, meer metingen en meer replicaten opneemt in een studie, kan men verwachten dat afwijkende waarden, veroorzaakt door onnauwkeurigheden, meetfouten en andere fouten tijdens de analyse en onderzoek, normaal gezien worden uitgemiddeld en aldus meer representatieve resultaten bieden. Om betrouwbare vergelijkingen te kunnen maken moet dit experiment minimaal 3x herhaald worden. Gezien het budget voor een masterproef en de lage beschikbaarheid van proefdieren was dit echter onmogelijk. Het kan wel een interessante piste zijn voor toekomstig onderzoek.

Hafez (1962) toonde aan dat *spermamorfologie* het bevruchtende potentieel van zaadcellen kan voorspellen. Daarom werd morfologie ook in deze studie aanzien als een belangrijke parameter voor de spermakwaliteit. De relatie tussen morfologisch normale zaadcellen en vruchtbaarheid is reeds uitgebreid beschreven bij mensen, stieren, hengsten, rammes en geitenbokken (Gravance et al., 1998). Bij verschillende diersoorten is het negatieve effect van afwijkende spermamorfologie op de fertiliteit duidelijk aangetoond (Maroto-Morales et al., 2010). Andere auteurs zagen dan weer geen effect op de vruchtbaarheid (Voss et al. 1981). Er moet evenwel gesteld worden dat 5-15% morfologisch afwijkende zaadcellen in een ejaculaat of epididymaal staal als acceptabel wordt aanzien (Sanger, 2004). Wanneer meer dan 20% morfologisch afwijkende zaadcellen worden aangetroffen, zal de vruchtbaarheid kunnen worden aangetast (Sanger, 2004). In het morfologisch onderzoek wordt het percentage en de aard van de pathologisch afwijkende zaadcellen nagegaan. Analyse van morfologische abnormaliteiten kan zowel gebeuren met behulp van een fasecontrastmicroscop, waarbij ongekleurde uitstrijkjes worden bekeken, als met een lichtmicroscop en specifieke kleuringen. In studies bij herten maakte men vooral gebruik van giemsa, congo-rood, briljant cresyl blauw en eosine-nigrosine kleuringen (Blottner et al., 1996; Nagy et al., 2001; Goeritz et al., 2003; Soler et al., 2003; Cheng et al., 2004; Malo et al., 2005; Soler et al., 2005; Zomborszky et al., 2005; Estes et al., 2006; Fernández-Santos et al., 2007; Fernández et al., 2013). Vooral de eosine-nigrosine kleuring wordt frequent bij herten toegepast, omdat men via deze methode eveneens de levend/dood verhouding kan bepalen. Het is bij het maken van deze uitstrijkjes belangrijk dat men geen grote temperatuurverschillen tussen draagglasjes, kleurstof, pipetten en het sperma creëert om koude-shock en foutieve morfologische beoordelingen te voorkomen. Koude-shock en onoordeelkundig gemaakte uitstrijkjes komen echter veelvuldig voor tijdens evaluatie van sperma en leiden voornamelijk tot zaadcellen met losse, gebroken of gekrulde staarten (Barth en Oko, 1989; Tartaglion en Ritta, 2004).

Voor wat betreft de morfologie, verschillen de zaadcellen van de meeste hertensoorten weinig van de spermatozoa van andere zoogdieren. Dit werd geconstateerd in studies bij edelherten (Giżewski, 2004), damherten (Gosch en Fischer, 1989), wapiti's (Haigh et al., 1984, 1985), elanden (*Alces alces*; Andersen, 1973), witstaartherten (Bierschwal et al., 1970), rendieren (*Rangifer tarandus*; Dott en Utsi,

1971) en sikaherten (Wislocki, 1949). Gosch en Fisher (1989) beschrijven de conformatie van de zaadcellen van damherten als vlakke en peddel-vormige kop met een apicale acrosoom-kap. Een korte nek verbindt de kop met de staart, dit is het middenstuk, waar de mitochondriën zich bevinden.

In dit onderzoek had damhert 3, vergeleken met de andere damherten, een opmerkelijk hoger percentage levende zaadcellen (72%), maar wel met een grote hoeveelheid (23%) distale protoplasmadruppels. Damhert 2 had slechts 42% levende zaadcellen, waarvan 24% abnormale staarten bezat. De spermatozoa van de andere damherten hadden respectievelijk 23% en 16% abnormale staarten. De abnormale staarten die werden aangetroffen, vooral teruggeslagen en opgerolde staarten, zijn indicatief voor koude-shock en schade tijdens het maken van uitstrijkjes. Het sikahert leverde 59% levende zaadcellen, daarvan bezat 74% een normale morfologie, 5% had proximale cytoplasmadruppels, 3% had abnormale koppen en 18% had abnormale staarten.

Volgende grote morfologische defecten werden in dit onderzoek aangetroffen, zij het in geringe mate: midpiece-reflex (gevouwen middenstuk), proximale protoplasmadruppels, kernkraters, dubbele- en stompe staarten en misvormde koppen. Microcefale koppen werden niet aangetroffen. Deze grote abnormaliteiten, vooral de kopdefecten, hebben duidelijke negatieve gevolgen voor de vruchtbaarheid van het sperma (Chatiza et al., 2011). Daarom is het belangrijk om het aandeel van deze defecten in het totale spermastaal na te gaan. Kleine morfologische defecten zoals gebogen en opgerolde staarten en distale cytoplasmadruppels, kwamen in dit onderzoek frequenter voor in het damhertensperma. Deze kleine defecten hebben echter weinig of geen impact op de fertiliteit van het sperma (Barth en Oko, 1989). Specifieke fertiliteitstudies in verband met morfologische defecten van zaadcellen bij herten, werden niet gevonden in de literatuur.

Distale cytoplasmadruppels worden steeds als abnormaal aanzien, terwijl proximale enkel abnormaal zijn bij geëjaculeerde zaadcellen omdat ze fysiologisch voorkomen in epididymaal gewonnen spermatozoa bij herkauwers (Cooper, 2005). Damhert 1 had het hoogste percentage (8%) proximale protoplasmadruppels, en slechts 2% distale. Distale druppels gaan verloren tijdens de beweging van spermatozoa doorheen de ductus deferens (Saacke, 1970; Barth en Oko, 1989). Daarom lijken distale druppels ook bij damherten minder zorgwekkend dan proximale protoplasmadruppels bij geëjaculeerde zaadcellen. Bij edelherten is de aanwezigheid van spermatozoa met distale cytoplasmadruppels de meest voorkomende morfologische afwijking (Gizejewski, 2004). Gosch en Fisher (1989) zagen dat grote onregelmatige proximale protoplasmadruppels tijdens de zomermaanden vaak voorkomen in damhertensperma, in de periode wanneer de vruchtbaarheid van het zaad opnieuw toeneemt. Haigh et al. (1985) beschreven gelijkaardige abnormaliteiten in wapitisperma, maar ook op het einde van het vruchtbare seizoen.

Morfologische evaluatie van zaadcellen is vaak subjectief en afhankelijk van onderzoeker en laboratorium (Hidalgo et al., 2006). Ze kent een lage inter-scorer-betrouwbaarheid. Dit reduceert het nut van morfologisch spermaonderzoek bij het voorspellen van de kwaliteit en fertiliteit van het sperma (Ombelet et al., 1995). Het kan echter wel een duidelijke indicatie geven voor de oorzaak van bepaalde fertiliteitsproblemen.

Conclusie:

Men kan op basis van de resultaten bekomen in dit onderzoek concluderen dat damherten nog steeds fertil zijn in februari en maart. Deze bevindingen komen overeen met Gosch en Fisher (1989), die vaststelden dat sperma, bekomen in deze maanden, nog voor nakomelingen kan zorgen na kunstmatige inseminatie.

Gebo lijkt, op basis van de bekomen resultaten, het beste alternatief te zijn als verdunner voor bewaring van damhertensperma.

Dit onderzoek geeft ook de aanzet voor verdere studie naar de correlatie van CASA parameters en vruchtbaarheid van damhertensperma. Het levert meer kennis van de spermafysiologie, bekomen via morfologische en kinetische studies van sperma bij deze dieren, wat kan leiden tot optimalisatie van bewaringsprotocollen. Dit is absoluut vereist voor ART, ook om de resultaten uit andere studies in relatie tot het damhert beter te begrijpen. Verder onderzoek van een groter aantal dieren, metingen en replicaties is echter van primordiaal belang om de resultaten van dit onderzoek te bevestigen of te weerleggen, zodat onderbouwde conclusies kunnen getrokken worden.

BIJLAGEN

Bijlage I: de familie van de hertachtigen (Cervidae), met subfamilies echte herten (Cervinae) en de schijn herten (Capreolinae), met bijhorende mondiale verspreidingsgebied. De hertensoorten in rode letters, zijn diegene die terugkomen in deze masterproef.

Hertensoort	Habitat
Cervinae (Oude wereld hertensoorten):	
Wapiti, edelhert en aanverwanten	
Wapiti (<i>Cervus canadensis</i>)	Noord-Amerika, Azië, Oceanië, Argentinië,
Edelhert (<i>Cervus elaphus</i>)	Noord-Amerika, Azië, Europa, Australië, Nieuw-Zeeland
Paardhert of Sambar (<i>Cervus unicolor</i>)	Zuid-Azië, Australië, Nieuw-Zeeland
Javaanse hert of Sunda Sambar (<i>Cervus timorensis</i>)	Oceanië
Sikahert (<i>Cervus nippon</i>)	Oost-Azië, Noord-Amerika, Europa, Nieuw-Zeeland
Lierhert of Eld's hert (<i>Cervus eldi</i>)	India, China, Myanmar, Thailand, Cambodja, Vietnam
Witliphert (<i>Cervus albirostris</i>)	Tibet, China
Barasingahert (<i>Cervus duvauceli</i>)	Noord- en Oost-India, Nepal,
Filipijnshert (<i>Cervus marianna</i>)	Filipijnen
Andere oude wereld soorten	
Eland (<i>Alces alces</i>)	Noord-Amerika, Noord-Europa, noordelijk Azië
Rendier of Kariboe (<i>Rangifer tarandus</i>)	Scandinavië, Oost-Europa, Rusland, Mongolië, noorden van China, Alaska, Canada
Damhert (<i>Dama dama</i>)	Europa, VS, Australië, Zuid-Afrika, Nieuw-Zeeland, Argentinië
Kuifhert (<i>Elaphodus cephalophus</i>)	Zuid-Oost Azië
Axishert of Chital (<i>Axis axis</i>)	Zuid-Amerika, Australië, Istrië, Kroatië, Hawaï, Nieuw-Zeeland
Zwijnshert of varkenshert (<i>Axis porcinus</i>)	India, Sri-lanka, Indo-China, Victoria (Australië)
Pater Davidshert (<i>Elaphurus davidianus</i>)	China
Capreolinae (Nieuwe wereld hertensoorten):	
Witstaarthert (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Canada, VS, Midden-Amerika, Brazilië, Peru, Nieuw-Zeeland, Finland, Tsjechië, Slowakije
Muieldierhert (<i>Odocoileus hemionus</i>)	VS, Canada, Nieuw-Mexico, Argentinië, Hawaï
Pampahert of vechthert (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>)	Zuid-Amerika
Ree (<i>Capreolus capreolus</i>)	Europa
Spieshert (<i>Mazama</i>)	Zuid-Amerika
Moerashert (<i>Blastocerus dichotomus</i>)	Zuid-Amerika
Poedoe (<i>Pudu</i>)	Zuid-Amerika

Bijlage II: Overzicht van de verschillende verdunners en cryoprotectantia bij verschillende hertensoorten, met bijhorende referentie (uit Pintus en Ros-Santaella). ES, epididymaal sperma; EE, elektro-ejaculatie; CPA, cryoprotectans; ED, ei dooier; TCF, tris-citraat-fructose; WE, *whole egg yolk*; CE, *clarified egg yolk*; UL, tes-tris-fructose; TALP, gemodificeerd Tyrode-medium; BF5F, Beltsville verdunner (Howard et al., 1986a); G, glycerol; EG, ethyleen glycol; PG, propyleen glycol; KT, kamertemperatuur.

Soort	CM	Verdunner	Cryoprotectans	T°C van CPA additie	Spermaconcentratie (Spz/ml)	Dooiing	Referenties
<i>Cervus elaphus hispanicus</i>	ES	Triladyl® - 20%ED	G (6%)	KT	400x10 ⁶	70°C (5s), 60°C (8s), 37°C (20s)	Soler et al., 2003a
	ES	TES - Tris - fructose - 10%ED	G (4%)	37°C, 5°C	100x10 ⁶	65° (6s)	Martinez-Pastor et al., 2006c
	EE / ES	TES - Tris - fructose - 20%ED (320 - 380 - 430mOsm/kg)	G 4% (EE); G 8% (ES)	KT (EE); 5°C (ES)	100x10 ⁶	65° (6s)	Martinez-Pastor et al., 2006b
	ES	TES -Tris - fructose - 10%ED	G (4%)	5°C	100x10 ⁶	65° (6s)	Martinez-Pastor et al., 2006a
	ES	TCF - 20%ED	G, EG, PG (alle 0-3-6-12%)	22°C, 5°C	400x10 ⁶	37°C (30s)	Fernández-Santos et al., 2006a
	ES	TCF (0 - 5 - 10 - 20%) WE of CE	G (3-6%)	KT	200x10 ⁶	37°C (20s)	Fernández-Santos et al., 2006b
	ES	Tris - suiker (fructose, manose, glucose, maltose, sucrose, trehalose, rafinose) gebaseerd mediumm - 20%CE (360 - 600mOsm/kg)	G (6%)	22°C	200x10 ⁶	37°C (30s)	Fernández-Santos et al., 2007a
	ES	TCF - 20%CE en enzym. En niet-enzym. Antioxidanten	G (6%)	22°C	200x10 ⁶	37°C (30s)	Fernández-Santos et al., 2007b
	EE	Andromed® - SBE, Bioxcell® - SBE, Triladyl® - 20%ED, UL - 15%ED, UL - 8%LDL	G (7%), G (6.4%), G (6%), G (4%)	KT, 5°C	160x10 ⁶	65°C (6s)	Martinez-Pastor et al., 2009
<i>Cervus elaphus</i>	ES	Triladyl® - 20%ED, Triladyl® + trehalose	G		400x10 ⁶	37°C (20s)	Malcotti et al., 2012
<i>Cervus elaphus hippelaphus</i> , <i>Dama dama</i>	ES	Triladyl®, Bioxcell®			45-158x10 ⁶ ; 90-235x10 ⁶	38°C (60s)	Zomborszky et al., 2005
<i>Cervus elaphus</i> , <i>Dama dama</i> , <i>Elaphurus davidianus</i>	EE	Tris - 2.5%ED	G (5%)		200x10 ⁶	70°C (5s), 50°C (8s), 37°C (10s)	Soler et al., 2003b
<i>Cervus nippon</i>	ES	Tris-glucose-citraat - 10%ED	G (!%)	KT	5x10 ⁷	35°C (40s)	Hishinuma et al., 2003
<i>Cervus nippon taiouanua</i> , <i>Cervus unicolor swinhoei</i>	EE	Vijf verschillende verdunners (2.25-20%ED)	G (5-6-8%)		150x10 ⁶	37°C	Cheng et al., 2004
<i>Cervus eldii siamensis</i> , <i>Cervus eldii thamin</i>	EE	Tris-gemodificeerde BF5F	G (5%)	5°C	100x10 ⁶	37°C (30s)	Ritter et al., 2012
<i>Axis axis</i>	EE	TALP en TCF - 20%ED	G (4-8%)	37°C	200-250x10 ⁶	37°C (60s)	Umapathy et al., 2007
<i>Dama dama</i>	EE	2.9% NaCitraat - 20%ED	G (8%)		400x10 ⁶	37°C	Jabbour et al., 1993
<i>Mazama americana</i>	EE	Tris-ED, TES-Tris-ED, TES-Tris-ED-Equex®	G (6%)		30x10 ⁶	37°C (20s)	Favoretto et al., 2012
<i>Rucervus eldii siamensis</i>	ES	Tris-fructose-Citraat - 20%ED	G (8%)		200x10 ⁶	37°C (30s)	Thuwanut et al., 2013

Referenties

- Aalseth EP, Saacke RG. Vital staining and acrosome evaluation of bovine sperm. *Gamete Res* 1986; 15:73-81.
- Aghajanian GK, Van der Maelen CP. Alpha-2-adrenoceptor-mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Sci* 1982; 215:1394-1396.
- Aiken J, Buckingham D, Harkiss D. Analysis of the extent to which sperm movement can predict the results of ionophore-enhanced functional assays of the acrosome reaction and spermoocyte fusion. *Hum Reprod* 1994; 9:1867-1874.
- Anel-López L, Álvarez-Rodríguez M, García-Álvarez O, Álvarez M, Maroto-Morales A, Anel L, de Paz P, Garde JJ, Martínez-Pastor F. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2012; 135(1-4):37-46.
- Asher GW, Macmillan KL. Induction of oestrus and ovulation in anoestrous fallow deer (*Dama dama*) by using progesterone and GnRH treatment. *J Reprod Fert* 1986; 78:693-697.
- Asher GW, Day AM, Barrell GK. Annual cycle of liveweight and reproductive changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. *J Reprod Fert* 1987; 79:353-362.
- Asher GW, Adam JL, Otway W, Bowmar P, van Reenan G, Mackintosh CG, Dratch P. 1988b. Hybridisation of Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*). by artificial insemination. *J Zool London* 1988; 215:197-203.
- Asher G, Fisher M, Fennessy P, Mackintosh C, Jabbour H, Morrow C. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). *Anim Reprod Sci* 1993; 33:241-65.
- Asher GW, Berg DK, Beaumont S, Morrow CJ, O'Neill KT, Fisher MW. Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (*D. d. mesopotamica* x *D. d. dama*). *Animal Reproduction Science* 1996; 45:201-215.
- Asher GW, Berg DK, Evans G. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Animal Reproduction Science* 2000; 62:195-211.
- Auer U, Wenger S, Beigelbock C, Zenker W, Mosing M. Total intravenous anesthesia with midazolam, ketamine and xylazine or detomidine following induction with tiletamine, zolazepam and xylazine in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) undergoing surgery. *J wildlife diseases* 2010; 46,4:1196-1203.
- Baldessarini RJ. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 1992; pp383-435. MacGraw-Hill, Singapore.
- Bartecki R, Jaczewski Z. Seasonal variation in the plasma androgens concentration of red deer. *Acta Theriologica* 1983; 28:333-336.
- Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press/Ames, USA 1989; pp.285.
- Bentley A. 1978. *An Introduction to the Deer of Australia with Special Reference to Victoria*. John Gartner, Melbourne, Australia.
- Beracochea F, Gil J, Sestelo A, Garde JJ, Santiago-Moreno J, Fumagalli F, Ungerfeld R. Sperm characterization and identification of spermsub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Anim Reprod Sci* 2014; 149(3-4):224-230.
- Bierschwal CJ, Mather EC, Martin CE, Murphy DA, Korschgen LJ. Some characteristics of deer semen collected by electroejaculation. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 157:627-632.
- Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinærmedicin* 1973; 25:383-391.
- Blottner S, Fasinski M, Pitra C. Charakterisierung der in vitro kapazitation motiler bullen-spermien durch die hyamin-induzierte akrosomenreaktion. *Arch Exp Vet Med* 1989; 43:285-295.
- Blottner S, Hingst O, Meyer H. Seasonal spermatogenesis and testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). *J Reprod Fertil* 1996; 108:299-305.
- Boersma AA, Braun J, Stolla R. Influence of random factors and two different staining procedures on computer assisted sperm head morphometry in bulls. *Reprod Domest Anim* 1999; 34:77-82.

- Boersma AA, Rasshofer R, Stolla R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. *Reprod Domest Anim* 2001; 36:222–229.
- Bouma AL, Wilson PR, Alexander AM. Evaluation of Dormosedan® in farmed red deer. *Proceedings of a Deer Course for Veterinarians*, No. 5, Deer Branch of the New Zealand Veterinary Association 1988; pp136-144.
- Boyers SP, Davis R, Katz D. Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 1989; 12:172-200.
- Brondke D, Kowolik N. Xylazine antagonists in animals: A review of the clinical aspects. *Vet Med Rev* 1988; 59:108-119.
- Brito LFC, Barth AD, et al. (2003): Comparison of methods to evaluate the plasma lemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60:1539–1551.
- Brüggermann J, Adam A, Karg GH. The role of pituitary in seasonality of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*). *Acta Endocrinologica Copenhagen* 1965; 48:569-579.
- Bubenik GA, Bubenik AB, Schams D, Leatherland JF. Circadian and circannual rhythms of LH, FSH, testosterone, prolactin, cortisol, T3, and T4 in plasma of mature male white tailed deer. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1983; 76:37-45.
- Buss PE, Meltzer DGA. Changes in respiratory function following the intramuscular administration of etorphine to boer goats (*Caprus hircus*). *J SA Vet Assoc* 2001; 72:137-142.
- Campbell RC, Dott HM, Glover TD. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.* 1956; 48:1-8.
- Cancel AM, Lobdell D, Mendola P, Perreault SD. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Hum Reprod* 2000; 15:1322-1328.
- Cardozo JA, Fernandez-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology* 2006; 66(4):841-50.
- Casey PJ, Gravance CG, Davis RO, Chabot DD, Liu IKM. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology* 1997; 47:575-82.
- Caulkett NA, Cribb PH, Haigh JC. Comparative cardiopulmonary effects of carfentanil-xylazine and medetomidine-ketamine used for immobilization of mule deer and mule deer/white-tailed deer hybrids. *Canad J Vet Res* 2000; 64:64-68.
- Caulkett N, Arnemo J. Chemical immobilization of free-ranging terrestrial mammals. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*, fourth ed. Blackwell Publishing, Ames 2007; pp.807-831.
- Chaplin RE, White RWG. The influence of age and season on the activity of the testis and epididymides of the fallow deer (*Dama dama*). *J Reprod Fert* 1972; 30:361-369.
- Chapman DI, Chapman NG. *Fallow Deer: their History, Distribution and Biology*. Terence Dalton Ltd, Lavenham, 1975.
- Chapman NG, Chapman DI. Seasonal changes in the male accessory glands of reproduction in adult fallow deer (*Dama dama*). *J Zool Lond* 1979; 189:259-274.
- Chatiza FP, Pieterse GM, Bartels P, Nedambale TL. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Anim Reprod Sci* 2011; 126:234-244.
- Chatiza FP, Bartels P, Nedambale TL, Wagenaar GM. Computer assisted sperm analysis of motility patterns of postthawed epididymal spermatozoa of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*), and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*) incubated under conditions supporting domestic cattle in vitro fertilization. *Theriogenology* 2012; 78:402-414.
- Cheng F, Fazeli A, Voorhout W, Marks A, Bevers M, Colenbrander B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl* 1996;17:674-82.
- Cheng F, Wu J, Peng-Wen Chan J, Wang J, Fung H, Colenbrander B, Tung K. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* volume 2004; 61(9): 1605-1616
- Cincik M, Ergur AR, Tutuncu L, Muhcu M, Kilic M, Balaban B, Urman B. Combination of Hypoosmotic Swelling=Eosin Y Test for Sperm Membrane Integrity Evaluation: Correlations with Other Sperm Parameters to Predict ICSI Cycles. *Andrology* 2007; 53:25-28.

- Clarke KW, Trim CM, Hall LW. Veterinary anesthesia. Eleventh edition 2014; pp571-582. Elsevier Ltd.
- Clutton-Brock TH, Green D, Hiraiwa-Hasegawa M, Albon SD. Passing the buck: resource defence, lek breeding and mate choice in fallow deer. *Behav Ecol Sociobiol* 1988; 23:281-296.
- Comizzoli P, Mermillod P, Cognie Y, Chai N, Legendre S, Maugé R. Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 2001; 55:649-659.
- Comizzoli P, Songsasen N, Wildt DE. Protecting and extending fertility for females of wild and endangered mammals. *Canc Treatm Res* 2010; 156:87-100.
- Cooper TG. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Hum Reprod* 2005; 20:9-11.
- Corselli J, Talbot P. An in vitro technique to study penetration of hamster oocyte-cumulus complexes by using physiological numbers of sperm. *Gamete Research* 1986; 13:293-308.
- Corselli J, Talbot P. In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Developmental Biology* 1987; 122:227-242.
- Davis RO, Bain DE, Siemers RJ, Thal DM, Andrew JB, Gravance CG. Accuracy and precision of the CellForm-Human Automated sperm morphometry instrument. *Fertil Steril* 1992; 58:763-9.
- Davis RO, Gravance CG. Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil Steril* 1993; 59:412-417.
- Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J Androl* 1993;14:385-394.
- De Castro G, Munderleer P. Anesthésie sans barbiturates: la neuroleptanalgesie. *Anesthésie, Analgesie, Réanimation* 1959; 16:1022.
- Delvaux H, Courtois R, Breton L, Patenaude R. Relative efficiency of succinylcholine, xylazine and carfentanil/xylazine mixtures to immobilize free-ranging Moose. *J Wildl Dis* 1999; 35:38-48.
- Dewald HA, Lobbstaël S, Buttler DE. Pyrazolodiazepines (2,4-Aryl-1,3-dialkyl-6,8-dihydropyrazolo[3,4-e]diazepin-7(1H)-ones) as antianxiety and anticonvulsant agents. *J Med Chem* 1977; 20(12):1562.
- Diverio S, Goddard PJ, Gordon IJ. Use of long-acting neuroleptics to reduce the stress response to management practices in red deer. *Appl Ani Behav Sci* 1996; 49:83-88.
- Dohoo SE, O'Connor MK, McDonnell WN, Dohoo IR. A clinical comparison of oxymorphone/acepromazine and fentanyl/droperidol sedation in dogs. *J Amer Anim Hosp Assoc* 1986; 22:313-317.
- Done SH, Lees P, Dansie O, Watkins LW. Sedation and restraint of fallow deer with diazepam. *Brit Vet J* 1975; 131:545-548.
- Domínguez-Rebolledo AE, Martínez-Pastor F, Bisbal AF, Ros-Santaella JL, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Garde JJ, Fernández-Santos MR. Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing Concentrations of Hydrogen Peroxide, and Importance of Individual Male Variability. *Reproduction in Domestic Animals* 2010; 46(3): 393-403.
- Dott HM, Utsi MNP. Artificial insemination of reindeer (*Rangifer tarandus*). *J Zool London* 1973; 170:505-508.
- Ducci M, Gaziano A, et al. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur J Obs & Gyn Reprod Biol* 2002; 102:53-56.
- Ebedes H, Burroughs REJ. Long-acting neuroleptics in wildlife. In: Ebedes H (ed). *The Use of Tranquillizers in Wildlife* 1992; pp31-37. Department of Agricultural Development, Pretoria.
- English AW. Chemical restraint of deer. In: *Deer Refresher Course* 1984; pp325-350. Proceedings 72, The University of Sydney Post-Graduate Committee in Veterinary Science, Sydney.
- Ericsson SA, Garner DL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1993; 39:1009-1024.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ. Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *Cryo Letters* 2003; 24(4):261-268.
- Evans G, Maxwell WMC. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth, Sydney 1987; pp107-117, 122-141.
- Fennessy PF, Mackintosh CG, Shackell GH. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Anim Prod* 1990; 51:613-621.

Fennessy PR, Mackintosh CG, Shackell GH, Whaanga AJ. Artificial insemination and synchronised natural breeding in red deer. Proc NZ Soc Anim Prod 1991a; 51:327-331.

Fennessy PF, Tate ML, Johnstone PD. Hybridisation between red deer (*Cervus elaphus*) and other deer species. Proc Assoc Adv Anim Breed Genet 1991b; 9:469-472.

Fernández S, Sestelo A, Rivolta M, Córdoba M. Capacitation and Acrosome Reaction Induction on Thawed *Dama dama* Deer Spermatozoa: Glycine Effect as Cryopreservation Diluent Supplement. Zool Sci 2013; 1110-1116.

Fernández-Santos MR, Esteso MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of concentration and temperature of addition. Andrology 2006a; 27(6):734-45.

Fernández-Santos MR, Esteso MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. Theriogenology 2006b; 66(8):1931-1942.

Fernández-Santos MR, Esteso MC, Soler AJ, Montoro V, Garde JJ. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Reprod Domest Anim 2006c; 41(2):114-118.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macias V, Esteso MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Theriogenology 2007a; 67:738-753.

Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macias V, Esteso MC, Soler AJ, Paz P, Anel L, Garde JJ. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. Andrology 2007b; 28:294-305.

Fickel J, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. Euro J Wildl Res 2007; 53:81-89.

Fischer K. Rut, breeding season, conception, birth, and plasma testosterone levels in young fallow deer (*Dama dama*). Ada endocr., Copenh 1982; 99: suppl 246, 14.

Fischer K. Untersuchungen zur Fortpflanzungs fähigkeit von jungem weiblichem und männlichem Damwild (*Dama dama* L.). Z. Jagdwiss 1983; 29:137-142.

Fischer K. Provozierte Spätgeburten 1983. Addendum zu: Untersuchungen zur Fortpflanzungs fähigkeit von jungem weiblichem und männlichem Damwild (*Dama dama* L.). Z. Jagdwiss 1984; 30:124-126.

Fletcher J. Hypersensitivity of an isolated population of red deer (*Cervus elaphus*) to xylazine. Vet Rec 1974; 94:85-86.

Fukui Y, Kohn H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender (AndroMed) in sheep. J Reprod Dev 2008; 54(4):286-289.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L. Use of a triplestain technique to detect viability and acrosome reaction in deer spermatozoa. Syst Bio Repr Med 1997; 39:1-9.

Garde J, Ortiz N, García A, Gallego L, Landete CT, Lopez A. Postmortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. Arch Androl 1998; 41:195-202.

Garde JJ, Martínez-Pastor F, Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Esteso MC, García AJ, Anel L, Roldán ER. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. Reprod Dom Anim 2006; 41:93-102.

Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. Biol Reprod 1997; 57:1401-1406

Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. Mol Reprod Dev 1999; 53:222-229.

Giżejowski Z. 1991 Unconventional method of semen collection from hybrid bulls of European bison and domestic cattle. Proceedings of XXth Congress of the International Union of Game Biologists 1991; 552-556.

Giżejowski Z, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Post-mortem examination of genital organs and characteristics of epididymal spermatozoa from wild red deer stags (*Cervus elaphus carpaticus* var. *montanus*). Proceedings of 2nd World Conference of Mountain Ungulates St. Vincent (Italy) 1998; 121-128.

- Gizejewski Z, Snochowski M, Mayntz M. Fractions of the semen of red deer (*Cervus elaphus*) - their occurrence and characteristics in different periods of season. *Pol J Vet Sci* 2003; 6(3):219-223.
- Gizejewski Z. Effect of season on characteristics of red deer (*Cervus elaphus*) L. semen collected using modified artificial vagina. *Reprod Biol* 2004; 4(1):51-66.
- Goeritz F, Quest M, Wagener A, Fassbender M, Broich A, Hildebrandt TB, Hofmann RR, Blottner S. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology* 2003; 59:1487-1502.
- Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, García AJ, Roldan ER, Garde J. Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Sci* 2006; 314:1445-1447.
- Gosch B, Fischer K. Seasonal changes of testes volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. *J Repro Fert* 1989; 85:7-17.
- Gosch B, Bartolomaeus T, Fisher K. Light and scanning electron microscopy of fallow deer (*Dama dama*) spermatozoa. *J Repro and Fert* 1989; 87:187-192.
- Gravance CG, Davis RO. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J Androl* 1995; 16:88-93.
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ. Computer automated sperm head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology* 1995; 44:989-1002.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 1998; 49:1219–1230.
- Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology* 2000; 53:1691-1703.
- Grubb P. 2005. Order Artiodactyla. *Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2 vols., 2142 pp. ISBN 978-0-8018-8221-0.
- Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals*, 3rd edition 1962. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Haigh JC. Fallow deer immobilization with fentanyl and a neuroleptic. *Vet Rec* 1977; 100:386-387.
- Haigh JC, Cates WF, Glover GJ, Rawlings NC. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J Reprod Fertil* 1984; 70:413-418.
- Haigh JC, Barth AD, Cates WF, Glover GJ. Electroejaculation and semen evaluation of wapiti. In: *Biology of Deer Production*. Drew, K.R., Fennessy, P.F. Eds., The Royal Society of New Zealand Bulletin 1985; 22:197–203.
- Haigh JC, Barth AD, Bowman PA. 1986. An evaluation of extenders for wapiti (*Cervus elaphus*), semen. *J Zool Anim Med* 1986; 17:129-136.
- Haigh JC, Bowen G. Artificial insemination of red deer *Cervus elaphus*. with frozen–thawed wapiti semen. *J Reprod Fertil* 1991; 93:119-123.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Andrology* 1990; 11:73-88.
- Harrington R. Imobilon-Rompun in deer. *Vet Rec* 1974;16:362-363.
- Herrick JR, Bartels P, Krisher RL. Post-thaw evaluation of in-vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovids. *Biol Reprod* 2004; 71:948-958.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 2006; 66:996-1003.
- Hinz 1930. Anatomische und histologische Untersuchungen des Hodens, der Samenleitung und des Beckenstücks der Harnröhre mit den accessorischen Geschlechtsdrüsen vom Damhirsch in der Brunftzeit. Inaug. Diss. Tierärztl. Hochschule, Berlin.
- Hirai M, Boersma A, Hoefflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, et al. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. *Andrology* 2001; 22:104-110.

Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 2003; 59:813-820.

Hofmeyr JM. The use of haloperidol as a long-acting neuroleptic in game capture operations. *J SA Vet Assoc* 1981; 52:273-282.

Holt W, Watson P, Curry M, Holt C. Reproducibility of computer-aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril* 1994; 62:1277-1282.

Holt WV, Abaigar T, Jabbour HN. Oestrus synchronization, semen preservation and artificial insemination in the Mohor Gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8:1215–1222.

Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. Applications and interpretation of assisted sperm analysis and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:709-718.

IUCN (2014): IUCN red list of threatened species.

Jabbour HN, Asher GW. Artificial breeding of farmed fallow deer (*Dama dama*). In *Wildlife Production: Conservation and Sustainable Development* 1991; pp485-491. Eds Renecker LA, Hudson RJ. University of Alaska, Fairbanks, AK.
Jaczewski Z, Morstin J, Kossakowski J, Krzywiński A. 1976 Freezing the semen of red deer stags. *Proceedings of VIIIth International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Kraków, 1976*; pp994-997.

Jacobson HA, Bearden HJ, Whitehouse DB. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J Wildl Manag* 1989; 53:224-227.

Jalanka HH, Roeken BO. The use of medetomidine, medetomidine–ketamine combinations, and atipamezole in non-domestic mammals: a review. *J Zoo Wildl Med* 1990; 21:259-282.

Janovsky M, Tataruch F, Ambuehl M, Giacometti M. A Zoletil-Rompun mixture as an alternative to the use of opioids for immobilization of feral red deer. *J Wildl Dis.* 2000; 36:663-669.

Janssen PAJ. The evolution of the butyrophenones, haloperidol and trifluoperidol from meperidine-like 4-phenylpiperidines. *Intern Rev Neurobio* 1965; 8:221-263.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70:219-228.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Kennedy WP, Heath E, Perez-Pelaez M, Sobrero AJ, Zaneveld LJD. Acrosomeless Sperm. A Cause of Primary Male Infertility. *Andrology* 1985; 17(1):31-36.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. The Hypoosmotic Swelling Test: An Update. *Systems Biology in Repro Med* 1992; 29(2): 105-116.

Jochle W, Hamm D. Sedation and analgesia with Dormosedan (detomidine hydrochloride) in horses: dose response studies on efficacy and its duration. *Acta Vet Scand* 1986; S82:69-84.

Jones DM, Manton VJA. Immobilin in deer. *Vet Rec* 1973; 93, 26-27.

Jones DM. Physical and chemical methods of capturing deer. *Vet Rec* 1984; 114:109-112.

Joshi N, Kodwany G, et al. The importance of computerassisted semen analysis and sperm function testing in an IVF program. *J Fertil Menopausal Stud* 1996; 41:46-52.

Katila T, Kuisma P, Andersson M. Evaluation of frozen stallion semen. *Proceedings of the First Meeting of the European Equine Gamete Group. Havemeyer Foundation Monograph Series* 2000; 1:19-21.

Katila T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet Scand* 2001; 42:199-217.

Katz DF, Drobnis EZ, Overstreet JW. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments. *Gamete Res* 1989; 22:443-469.

Kenney RM, Hurtgen J, Pierson R, Witherspoon D, Simons J. *Theriogenology and the equine, part II: the stallion.* Society for *Theriogenology* 1983; 9.

Kilpatrick HJ, Spohr SM. Telazol®-xylazine versus ketamine-xylazine: a field evaluation for immobilizing white-tailed deer. *Wildl Soc Bull* 1999; 27:566-570.

Kock en Burroughs, *Chemical and physical restraint of wild animals. A training and field manual for African species.* IWVS (Africa) 2012.; p. 166-188.

- Krause W. Computer assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995;10:60-66.
- Kreeger TJ, Plotka ED, Seal US. Immobilization of white-tailed deer by etorphine and xylazine and its antagonism by nalmeferine and yohimbine. *J Wildl Dis* 1987; 23:619-624.
- Kreeger TJ, Arnemo JM. *Handbook of Wildlife Chemical Immobilization* 2002. Sunquest, Laramie.
- Kruger TF, DuToit TC, Franken DR, Acosta AA, Oehninger SC, Menkveld R. A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading. *Fertil Steril* 1993; 59:202-209.
- Krzywinski A. Collection of red deer semen with the artificial vagina. *Proc 8th Int Congr Anim Reprod AI, Cracow* 1976; 1:1002-1005.
- Krzywiński A, Jaczewski Z. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp Zool Soc London* 1978; 43:271-287.
- La Falci V, Tortorella H, Rodrigues J, Brandelli A. Seasonal variation of goat seminal plasma proteins. *Theriogenology* 2002; 57(3):1035-1048.
- Landowski J, Gill J. Some observations on sperm of Indian elephant (*Elephas maximus L.*) (in German). *Der Zoologische Garten* 1964; 29:205-212.
- Langvatn R, Hanley A. Feeding-patch choice by red deer in relation to foraging efficiency. *Oecologia* 1993; 95:164-170.
- Lees P, Hillidge CJ. Imobilon: some comments on its action. *Vet Rec* 1976; 99:55-56.
- Lin HC. Dissociative anesthetics. In: Thurmon JC, Tranquilli WJ, Benson GJ (eds). *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia* 1996; 241-296. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lincoln GA. Puberty in a seasonally breeding male, the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J Repro Fertil* 1971; 25:41-54.
- Lincoln GA, Kay RNB. 1979 Effect of season on the secretion of LH testosterone in intact and castrated red deer (*Cervus elaphus*). *J Repro Fert* 1979; 55:75-80.
- Lincoln GA. Seasonal breeding in deer. In: *Biology of Deer Production*. Fennessy, P.F., Drew, K.R. Eds., Royal Society of New Zealand, Wellington, Bull 1985; No. 22 pp165-179.
- Liu DY, Liu ML, Clarke GN, Baker HW. Hyperactivation of capacitated human sperm correlates with the zona pellucida-induced acrosome reaction of zona pellucida-bound sperm. *Hum Reprod* 2007; 22:2632-2638.
- Low RJ. Imobilon in deer. *Veterinary Record* 1973; 93:867.
- Loskutoff NM, Simmons HA, Goulding M, Thompson GDE, Jongh T, Simmons LG. Species and individual variations in cryoprotectant toxicities and freezing resistances of epididymal sperm from African antelope. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:527-535.
- Loudon ASI, Curlewis JD. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J Repro Fert* 1988; 83:729-734.
- Malcotti V, Pelufo V, Bergamo N, Aisen E. Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing-thawing. *Anim Prod Sci* 2012; 52:741-745.
- Malo A, Garde J, Soler A, García A, Gomendio M, Roldan E. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol Reprod* 2005; 72:822-829.
- Maroto-Morales A, Ramon M, Garcia-Alvarez O, Soler AJ, Esteso MC, Martinez-Mastor f, Perez-Guzman MD, Garde JJ. Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the sperm class analyzer. *Theriogenology* 2010; 73:437-448.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, Herraes P. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*. 2005a; 63:24-40.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Garcia-Macias V, de Paz P, Alvarez M. Season effect on genitalia and epididymal sperm from Iberian red deer, roe deer and Cantabrian chamois. *Theriogenology*. 2005b; 63:1857-1875.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Herraes P, Anel L, de Paz P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod* 2005c; 72(2):316-327.

- Martínez-Pastor F, Díaz-Corrujo A, Anel E, Herraez P., Anel L, de Paz P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 2005d; 64(4):958-974.
- Martínez-Pastor F, García-Macias V, Álvarez M, Chamorro C, Herraez P, de Paz P, Anel A. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology* 2006a; 65:471-485.
- Martínez-Pastor F, Martínez F, García-Macias V, Esteso M, Anel E, Fernández-Santos M, Soler AJ, de Paz P, Garde JJ, Anel L. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. *Theriogenology* 2006b; 66(5):1165-1172.
- Martínez-Pastor F, Anel L, Guerra C, Álvarez M, Soler AJ, Garde JJ. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology* 2006c;66(8): 1847–56.
- Martínez-Pastor F, Martínez F, Álvarez M, Maroto-Morales A, García-Alvarez O, Soler AJ, Garde JJ, de Paz P, Anel L. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 2009; 71:628-638.
- Martínez AF, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Fernández-Santos MR, Esteso MC, de Paz P, Garde JJ, Anel L. Sperm parameters on Iberian red deer: Electroejaculation and post-mortem collection. *Theriogenology* 2008; 70:216-226.
- Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, del Olmo E, Fernández-Santos MR, Garde J, Martínez-Pastor F. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. *Theriogenology* 2012; 78(5):1005-1019.
- Matsuura Y, Sato K, Suzuki M, Ohtaishi N. The effects of age, body weight and reproductive status on conception dates and gestation periods in captive sika deer. *Mammal Study* 2004; 29:15-20
- Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52:1353-1362.
- Maxwell WMC, Parrilla I, Caballero I, García E, Roca J, Martínez EA. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm density gradient centrifugation. *Reprod Domest Anim* 2007; 42(5):489-494.
- Maze M, Tranquilli W. Alpha-2 adrenoceptor agonists: Defining the role in clinical anaesthesia. *Anesthesiology* 1991; 74:581-605.
- McElligott AG, Gammell MP, Harty HC, Paini DR, Murphy DT, Walsh JT, Hayden TJ. Sexual size dimorphism in fallow deer (*Dama dama*): do larger, heavier males gain greater mating success? *Behav Ecol Sociobiol* 2001; 49:266-272.
- McKelvey WAC, Simpson CA. Reversal of the effects of xylazine and xylazine/ketamine in red deer. *Vet Rec* 1985; 117:362-363.
- Mackintosh CG, Van Reenen G. Comparison of yohimbine, 4-aminopyridine and doxapram antagonism of sedation in deer (*Cervus elaphus*). *NZ Vet J* 1984a; 32:181-184.
- Mackintosh CG, Van Reenen G. Yohimbine injection in deer. *NZ Vet J* 1984b; 32:217-218.
- McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, Hinrichs K, Bedford-Guaus SJ. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful in vitro fertilization of equine oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81:199-206.
- Mech LD, Del Giudice GD, Karns PD, Seal US. Yohimbine hydrochloride as an antagonist to xylazine hydrochloride-ketamine hydrochloride immobilization of white-tailed deer. *J Wildl Dis* 1985; 21:40-410.
- Merilan CP, Read BW, Boever WJ, Knox D, Meehan T. Comparative characteristics of spermatozoa and semen from six species of artiodactylids. *J Zoo Med* 1982; 13:69-74.
- Meuleman T, Port JD, Stanley TH, Willard KF. Immobilization of Elk and Moose with carfentanil. *J Wildl Manag* 1984; 48:258-262.
- Milagros C, Esteso MC, Soler AJ, Marí AR, Fernández-Santos, Armando A, Quintero-Moreno, Garde JJ. Functional Significance of the Sperm Head Morphometric Size and Shape for Determining Freezability in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Sperm Samples. *Andrology* 2006; 27(5).
- Miller BF, Osborn DA, Lance WR, Howze MB, Warren RJ, Miller KV. Butorphanol-azaperone-medetomidine for immobilization of captive white-tailed deer. *J Wildl Dis* 2009; 45(2):457-467.

Millsaugh JJ, Brundige GC, Jenks JA, Tyner CL, Hustead DR. Immobilization of Rocky Mountain elk with Telazol and xylazine hydrochloride, and antagonism by yohimbine hydrochloride. *J Wildl Dis* 1995; 31:259-262.

Mirachi RE, Scanlon PF, Kirkpatrick RL. Annual changes in spermatozoa production and associated organs of white-tailed deer. *J Wildl Manage* 1977; 41:92-99.

Mladenovic I, Micic S, et al. Hypoosmotic swelling test for quality control of sperm prepared for assisted reproduction. *Arch Androl* 1995; 34:163-169.

Monfort S, Brown J, Bush M, Wood T, Wemmer C, Vargas A, et al. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J Reprod Fertil* 1993; 98:471-480.

Moresco A, Larsen RS, Sleeman JM, Gaynor JS. Use of naloxone to reverse carfentanil citrate-induced hypoxemia and cardiopulmonary depression in Rocky Mountain wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*). *J Zoo Wildl Med* 2001; 32:81-89.

Morrow CJ, Asher GW, Smith JF, Jabbour HN, Mulley RC, McLeay LM. Seasonal effects on the efficacy of intravaginal CIDR devices for oestrous synchronization of farmed fallow deer (*Dama dama*). *Proc NZ Soc Anim Prod* 1992; 52:165-169.

Morrow CJ, Penfold LM, Wolfe BA. Artificial insemination in deer and non-domestic bovids. *Theriogenology* 2009; 71:149-165.

Mortimer D, Serres C, Mortimer ST, Jouannet P. Influence of image sampling frequency on the perceived movement characteristics of progressively motile human spermatozoa. *Gamete Res* 1988; 20(3):313-327.

Muino R, Fernandez M, Pena AI. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim* 2007; 42(3):305-311.

Mulley R, Moore N, English A. Successful uterine insemination of fallow deer with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 1988; 29:1149-1153.

Munerato MS, Duarte JMB, Pereira GT, Marques JA. Effects of physical and chemical immobilization on hematologic and biochemical variables in captive brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Vet clin path* 2010; 39(4):454-463.

Murphy MR, Hug CC. The enflurane sparing effect of morphine, butorphanol and nalbuphine. *Anesthesiology* 1982; 57:489-492.

Murray S, Monfort SL, Ware L, McShea WJ, Bush M. Anesthesia in female white-tailed deer using Telazol and xylazine. *J Wildl Dis* 2000; 36:670-675.

Nagy S, Kovacs A, Zubor T, Zomborszky Z, Toth J, Horn P. Evaluation of membrane integrity of frozen/thawed deer spermatozoa: short communication *Acta Vet Hung* 2001; 49(2):223-227.

Nunes JF, Corteel JM, Combarous Y, Baril G. Role of seminal plasma in the in vitro survival of goat sperm. *Reprod Nutr Dev* 1982; 22(4):611-620.

Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. Sperm morphology assessment: Historical review in relation to fertility. *Hum Reprod Update* 1995; 1:543-557.

Ostermeier GC, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J Androl* 2001; 22:595-603.

Palmer E, Magistrini M. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet Scand* 1992; 88:137-152.

Pearce PC, Kock RA. Physiological effects of etorphine, acepromazine and xylazine on the black fallow deer (*Dama dama*). *Res Vet Sci* 1989; 46:380-386.

Peles JD, Rhodes OE, Smith H. Spermatozoan numbers and testicular characteristics of male white-tailed deer fawns during the breeding season. *Acta Theriologica* 2000; 45:123-130.

Peles JD, Rhodes OE, Smith H. Spermatozoan numbers and characteristics of associated organs in male white-tailed deer during the breeding season. *Acta Theriologica* 2003; 48:123-130.

Pintus E, Ros-Santaella JL. Assisted reproductive technologies in deer (Artiodactyla, Cervidae): a review. *Sci agric bohem*, 2014; 45(2): 136-146.

Platz C, Magyar S, Crider N. Cryopreservation of electroejaculated and epididymal spermatozoa in white tail deer (*Odocoileus virginianus*). *American Association of ZOO Veterinarians* 1982; 11:127-129.

- Pollard JC, Mackintosh CG, Littlejohn RP. Neuroleptic treatment of red deer calves at weaning. *NZ Vet J* 1998; 46:111-113.
- Pursel V, Johnson L. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1974; 1:63-68.
- Ramón M, Martínez-Pastor F, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Soler AJ, Jiménez-Rabadán P, Fernández-Santos MR, Bernabéu R, Garde J. Taking advantage of the use of supervised learning methods for characterization of sperm population structure related with freezability in the Iberian red deer. *Theriogenology* 2012; 77(8):1661-1672.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2001; 65:462-470.
- Read M, Caulkett N, McCallister M. Evaluation of zuclopenthixol acetate to decrease handling stress in wapiti. *J Wildl Dis* 2000; 36:450-459.
- Read MR, Caulkett NA, Symington A, Shury TK. Treatment of hypoxemia during xylazine-tiletamine zolazepam immobilization of wapiti. *Can Vet J* 2001; 42:861-864.
- Read MR, McCorkell RB. Use of azaperone and zuclopenthixol acetate to facilitate translocation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Zoo Wildl Med* 2002; 33:163-165.
- Renecker LA, Olsen CD. Antagonism of xylazine hydrochloride with yohimbine hydrochloride and 4-aminopyridine in captive wapiti. *J Wildl Dis* 1986; 22:91-96.
- Ritar AJ, Salamon S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J Biol Sci* 1983; 36:49-59.
- Robb B, Bethge G. *The Ultimate Guide to Elk Hunting*. The Lyons Press; 2001. ISBN 1-58574-180-9.
- Rolf HJ, Fischer K. (1986) Jahresperiodische Schwankungen der Testosteron und 5- α -DHT-Konzentration im Blut von adulten männlichen Damhirschen (*Dama dama*). In Dtsch. Ges. Säugetierkunde, 60. Hauptversammlung, 1986; pp61-62, Abstr. Ed. F. Dieterlen. Parey, Hamburg.
- Rolf HJ, Fischer K. Annual periodicity of blood testosterone and 5- α -DHT levels in the adult male fallow deer (*Dama dama*). *Ada endocr Copenh* 1987; 114(283):178.
- Ruckebusch Y, Allal C. Depression of reticulo-ruminal motor function through stimulation of α 2-adrenoceptors. *J Vet Pharm Therap* 1987; 10:1-10.
- Rudenko SV, Gapochenko SD, Bondarenko VA. Effect of glycerol on the capacitance and conductivity of bilayer lipid membranes. *Biophysics* 1984; 29:245-249.
- Saacke RG, White IM. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proceedings of the IV Technical Conference of Artificial Insemination and Reproduction* 1972; pp22-27, National (US) Association of Animal Breeders, Chicago.
- Saacke RG, Marshall CE, Vinson WE, O'Connor ML, Chandler IE, Mullins KJ, Amann RP, Wallace RA, Vince WN, Kellgren HC. Semen quality and heterospermic insemination in cattle. *Proceedings of the IXth International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination* 1980; pp75-78, Madrid.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996; 24:167-173.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995; 37:185-249.
- Sanders J, Miller DD, Patil PN. Alpha-adrenergic and histaminergic effects of tolazoline-like imidazoles. *J Pharm Exp Therap* 1975; 195:362-371.
- Sanger PL. *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 2nd edition 2004. Current conception. Inc., Moscow.
- Saraviaa F, Núñez-Martínez I, Morán JM, Soler C, Muriel A, Rodríguez-Martínez H, Peña FJ. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* 2007; 68(2):196-203.
- Schiewe M, Bush M, de Vos V, Brown J, Wildt D. Semen characteristics, spermfreezing, and endocrine profiles in free-living wildebeest (*Connochaetes taurinus*) and greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *J Zoo Wildl Med* 1991; 22(1):58-72.
- Schwartz DD, Clark TP. Affinity of detomidine, medetomidine and xylazine for alpha-2 adrenergic receptor subtypes. *J Vet Pharm Therap* 1998; 21:107-11.

- Seager S, Wildt D, Platz C. Artificial Breeding of non-primates. Symp zool Soc Lond 1978; 43:207-218.
- Seigal-Willot J, Citino S, Wade S, Elder L, Hayek LAC, Lance WR. Butorphanol, azaperone, and medetomidine anesthesia in free ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) using radio transmitters. J Wild Dis 2009; 45:468-480.
- Semiadi G, Muir PD, Barry TN. General biology of sambar deer (*Cervus unicolor*) in captivity. NZ J Agric Res 1994; 37:79-85.
- Sempere AJ, Mauget R, Bubenik GA. Influence of photoperiod on the seasonal pattern of secretion of luteinizing hormone and testosterone and on the antler cycle in roe deer. J Reprod Fert 1992; 95:693-700.
- Sente C, Meisingset EL, Evans AL, Wedul SJ, Zimmermann B, Arnemo JM. Reversible Immobilization of Free-ranging Red Deer (*Cervus elaphus*) with Xylazine-Tiletamine-Zolazepam and Atipamezole. J wildl dis 2014; 50(2):359-363.
- Smith KM, Powell DM, James SB, Calle PP, Moore RP, Zurawka HS, Goscolo S, Raphael BL. Anesthesia of male axis deer (*Axis axis*): evaluation of thiafentanil, medetomidine, and ketamine versus medetomidine and ketamine. J Zoo Wildl Med 2006; 37(4): 513-517.
- Soler AJ, Garcia AJ, Fernandez-Santos MR, Esteso MC, Garde JJ. Effects of thawing procedure on post-thawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. J Androl 2003a; 24:746-756.
- Soler AJ, Astore V, Sestelo A, Rivolta M, Jacome LN, Garde JJ. Effect of thawing procedure on cryosurvival of deer spermatozoa: work in progress. Theriogenology 2003b; 60(3):511-520.
- Soler AJ, Esteso MC, Fernández-Santos MR, Garde JJ. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymis for several days. Theriogenology 2005; 64:1503-1517.
- Soler C, Sancho M, García A, Fuentes MC, Núñez J, Cucho H. Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the ISAS® CASA system. J Reprod Dom Anim 2014; 49(1):71-78.
- Stanley TH, McJames S, Kimball J, Port JD, Pace NL. Immobilization of elk with A3080. J Wildl Manag 1988; 52:577-581.
- Storey BT, Lee MA, Muller C, Ward R, Wirtshafter DG. Binding of mouse spermatozoa to the zona pellucida of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. Biol Reprod 1994; 51:119-128.
- Strzezek J, Krzywinski A, Swidowicz K. Seasonal changes in the chemical composition of red deer (*Cervus elaphus*) semen. Anim Reprod Sci 1985; 9:195-204.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. Hum Reprod Update 2006; 12:23-37.
- Sundararaman MN, Kalatharan J, Thilak Pon Jawahar K. Analyses of morphological and morphometrical deviations of bull spermatozoa by computer assisted semen analysis technique. Asian j anim vet adv 2007; 2(4):196-204.
- Suttie JM, Goodall ED, Pennie K, Kay RNB. Winter food restriction and summer compensation in red deer stags (*Cervus elaphus*). Brit J Nutr 1983; 50:131-141.
- Suttie JM, Fennessy PF, Corson ID, Laas FJ, Elgar HJ, Lapwood KR. LH and testosterone responses to GnRH in red deer (*Cervus elaphus*) stags kept in a manipulated photoperiod. J Reprod Fert 1989; 85:213-219.
- Swan GE. Drugs used for the immobilization, capture and translocation of wild animals. In: McKenzie AA (ed). The Capture and Care Manual 1993; pp2-64. Wildlife Decision Support Services, Lynwood Ridge and the South African Veterinary Foundation, Pretoria.
- Tamuli M, Watson PF. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. Anim Reprod Sci 1994; 35:247-254.
- Tartaglioni CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology 2004; 62:1245-1252.
- Toutain PL, Zingoni MR, Ruckebusch Y. Assessment of alpha-2 adrenergic antagonists on the central nervous system using reticular contraction in sheep as a model. J Pharm Exp Therap 1982; 223:215-218.
- Umapathy G, Sontakke SD, Reddy A, Shivaji S. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). Theriogenology 2007; 67:1371-1378.
- Ungerfeld R, Gonzalez-Pensado S, Bielli A, Villagran M, Olazabal D, Perez W. Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. Acta Vet Scand 2008; 50:16.

- Upreti GC, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Development of a chemically defined ram semen diluent RSD-1. *Anim Reprod Sci* 1995; 37:143-157.
- Van der Ven HH, Jeyandran RS et al. Correlation between human sperm swelling in hypo-osmotic medium (hypo-osmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J Androl* 1986; 7:190-196.
- Van Mourik S, Stelmasiak T, Murray L. Immobilisation of Sambar, Rusa, Samson, Red, Fallow and Chital deer with Fentaz®/Rompun® with Narcan®/Tolazoline. *Vet Med Rev* 1988; 59:167-170.
- Veldhuizen FA. Studies on cryopreservation of semen of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*).
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onelin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002; 57:149-179.
- Voss JL, Pickett WB, Squires EL. Stallion sperm morphology and motility and their relationship to fertility. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 178:287-289.
- Walsh VP, Wilson PR. Sedation and chemical restraint of deer. *NZ Vet J* 2002; 50(6):228-236.
- Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clarke, A. Eds., *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London 1981:189-218.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:871-891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-492.
- Whitehead GK. *The Whitehead Encyclopaedia of Deer*. Swan Hill Press, Shrewsbury, UK 1993.
- WHO 2010
- Wildt DE. Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim Reprod Sci* 1992; 28:247-257.
- Wildt DE, Pukazhenthi B, Brown J, Montfort S, Howard J, Roth T. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:811-824.
- Wilson PR, Biemans J, Stafford KJ, Veltman CJ, Spoorenberg J. Xylazine and a xylazine/fentanyl citrate/azaperone combination in farmed deer. I: Dose rate comparison. *NZ Vet J* 1996a; 44:81-87.
- Wilson PR, Biemans J, Stafford KJ, Veltman CJ, Spoorenberg J. Xylazine and xylazine/fentanyl citrate/azaperone combination in farmed deer. II: Velvet antler removal and reversal combinations. *NZ Vet J* 1996b; 44:88-94.
- Wittermer C, Warter S, Ohl J, Sudan B, Mache A, Dellenbach P. Prognostic value of objective semen parameters in an in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:321-327.
- Wodzicki KA. *Introduced Mammals of New Zealand*. Department of Scientific and Industrial Research 1950; Bulletin 98. DSIR, Wellington, NZ.
- Woodbury MR, Caulkett NA, Baumann D, Wilson PR. Comparison of analgesic techniques for antler removal in wapiti. *Can Vet J* 2001; 42:929-935.
- Xu M, Wei H, Kontinen VK, Kalso E, Pertovaara A. The dissociation of sedative from spinal antinociceptive effects following administration of a novel alpha-2-adrenoceptor agonist, MPV-2426, in the locus coeruleus in the rat. *Acta Anaesthesiologica Scand* 2000; 44:648-655.
- Yadav GU, Aher VD, Bhorkre AP, Sarkate LB. Clinical and physiological effects of diazepam and detomidine anaesthesia in bovines. *Indi Vet J* 2001; 78:306-308.
- Yamamura T, Harada K, Okamura A, Kemmotsu O. Is the site of action of ketamine anesthesia the N-Methyl-D-Aspartate receptor? *Anesthesiology* 1990; 72:704-710.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. 22nd Edition, Knobil E, Neill JD (Eds.), Raven. Press, 1994; pp189-317.
- Yániz JL, Vicente-Fiel S, Capistrós S, Palacín I, Santaloria P. Automatic evaluation of ram sperm morphometry. *Theriogenology* 2012; 77(7):1343-1350.

Yániz JL, Capistrós S, Vicente-Fiel S, Soler C, Núñez de Murga M, Santaloria P. Use of relief contrast® objective to improve sperm morphometric analysis by ISAS® casa system in the ram. J Reprod Dom Anim 2013; 48(6):1019-1024.

Zomborszky Z, Nagy S, Nánácssy L, Szabari M, Bodó S. Experiences in deer sperm cryopreservation under practical conditions - A pilot study. Anim Reprod Sci 2005; 90(1-2): 185-190.

www.plattelandstv.be (©NTV) en hertenhouderijByUGent

Afbeelding edelhert - <http://ian.umces.edu/imagelibrary/displayimage-3820.html>