

Vergleich verschiedener Färbemethoden von aufgetautem Tiefgefrier-Rüdensperma

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Indra Sara Klumb

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Wehrend

Vergleich verschiedener Färbemethoden von aufgetautem Tiefgefrier-Rüdensperma

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Indra Sara Klumb

Tierärztin aus Kurtscheid

Gießen 2026

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnold

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Axel Wehrend
Prof. Dr. Daniela Fietz

Tag der Disputation: 18.05.2026

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literatur	2
2.1	Anwendung lichtmikroskopischer Färbemethoden zur morphologischen Untersuchung caniner Samenzellen.....	2
2.1.1	Eosin	2
2.1.2	Eosin-Nigrosin.....	4
2.1.3	Diff-Quick®.....	8
2.1.4	Hemacolor®	10
2.1.5	Spermac®.....	12
2.1.6	Formolzitrat-Bengalrosa	14
2.1.7	Weitere Färbemethoden bei caninen Samenzellen.....	16
3	Material und Methoden	20
3.1	Probenauswahl.....	21
3.2	Vorbereitung und Untersuchung der Proben.....	22
3.2.1	Auftauvorgang.....	22
3.2.2	Stresstest bei 18 °C.....	22
3.2.3	Stresstest im Wasserbad bei 37 °C.....	23
3.2.4	Stresstest im Kühlschrank bei 6 °C	23
3.3	Ausstriche.....	23
3.4	Färbemethoden	24
3.4.1	Eosin	24
3.4.2	Eosin-Nigrosin.....	25
3.4.3	Diff-Quick®.....	26
3.4.4	Hemacolor®	28
3.4.5	Spermac®.....	29
3.4.6	Formolzitrat-Bengalrosa	31

3.5	Beurteilungskriterien	32
3.6	Lagerung.....	36
3.7	Wiederholungsuntersuchung	36
3.8	Zeitlicher und finanzieller Aufwand	37
3.9	Spermatologische CASA-Untersuchung.....	38
3.10	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Wirtschaftlicher Aufwand.....	43
4.1.1	Zeitlicher Aufwand	43
4.1.2	Finanzieller Aufwand	45
4.2	Färbemethoden	47
4.2.1	Eosin	51
4.2.2	Eosin-Nigrosin.....	52
4.2.3	Diff-Quick®.....	54
4.2.4	Hemacolor®	55
4.2.5	Spermac®.....	58
4.2.6	Formolzitrat-Bengalrosa	60
4.3	Vergleich der Färbemethoden.....	63
4.4	Spermatologische CASA-Untersuchung.....	65
4.5	Einfluss der Kryokonservierung	68
4.6	Einfluss des Stresstests.....	70
4.7	Einfluss der Lagerung.....	79
5	Diskussion.....	88
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	88

5.2	Diskussion der Methodik.....	89
5.3	Diskussion der Ergebnisse	98
5.3.1	Wirtschaftlicher Aufwand	98
5.3.1.1	Zeitlicher Aufwand	98
5.3.1.2	Kostenaufwand.....	100
5.3.1.3	Gesamtkosten.....	100
5.3.2	Färbemethoden.....	101
5.3.2.1	Eosin.....	102
5.3.2.2	Eosin-Nigrosin	103
5.3.2.3	Diff-Quick®	104
5.3.2.4	Hemacolor®.....	105
5.3.2.5	Spermac®.....	106
5.3.2.6	Formolzitrat-Bengalrosa	107
5.3.3	Vergleich der Färbemethoden	109
5.3.4	Spermatologische CASA-Untersuchung	111
5.3.5	Einfluss der Kryokonservierung.....	112
5.3.6	Einfluss des Stresstests	113
5.3.7	Einfluss der Lagerung	115
5.4	Schlussbetrachtung und Fazit für die Anwendung in der veterinärmedizinischen Praxis.....	117
6	Zusammenfassung	120
7	Summary.....	124
8	Literaturverzeichnis.....	128
9	Anhang.....	141
10	Eidesstattliche Erklärung.....	147
11	Danksagung	148

Abkürzungsverzeichnis

ad	aufgefüllt auf		Haftung &
Aqua bidest.	Aqua bidestillata		Compagnie
Aqua dest.	Aqua destillata		Kommanditgesell-
Art. Nr.	Artikelnummer		schaft
ASMA	Automatisiertes	H	Hemacolor®
	Samenzell-	Hrsg.	Herausgeber
	Morphologie-	K	Kontrast
	Analysesystem	KGaA	Kommandit-
bzw.	beziehungsweise		gesellschaft auf
CASA	computergestützte		Aktien
	Spermienanalyse	KI	Künstliche
	(Computer-assisted		Intelligenz
	Sperm Analysis)	l	Liter
De	Detailerkennbarkeit	Md	Median
DQ	Diff-Quick®	Min.	Minuten
E	Eosin	Mio.	Millionen
EN	Eosin-Nigrosin	ml	Milliliter
Eosin B	Eosin bläulich	mm	Millimeter
Eosin G	Eosin gelblich	mOsm	Milliosmol
et al.	et alii	µl	Mikroliter
Fa.	Firma	µm	Mikrometer
FB	Formolzitrat-	n	Größe der
	Bengalrosa		Stichprobe
Fi	Farbintensität	p	Signifikanzwert
FITC-PNA	Fluorescein	PDF	Portable Document
	Isothiocyanat-		Format
	Erdnuss Agglutinin	PI	Propidiumiodid
g	Gramm	R	Spannweite
g/l	Gramm pro Liter	Sek.	Sekunden
GmbH	Gesellschaft mit	S	Spermac®
	beschränkter	SCA	Sperm Class
	Haftung		Analyzer
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit	SD	Standard-
	beschränkter		abweichung

Abkürzungsverzeichnis

SE & Co. KG	Societas Europaea als Komplementär einer Kommandit- gesellschaft
t	Zeitpunkt
TG-	Tiefgefrier-
vgl.	vergleiche
vs	versus
WHO	World Health Organization
°C	Grad Celsius

Sonderzeichen

\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
\triangleq	entspricht
€	Euro
=	gleich
<	kleiner als
\leq	kleiner als oder gleich
±	Plusminus
%	Prozent
&	kaufmännisches Und-Zeichen
®	Warenzeichen

1 Einleitung

Die Andrologie ist ein Teilbereich der Veterinärmedizin. Im Rahmen der spermatologischen Untersuchung ist die Anwendung lichtmikroskopischer Färbemethoden eine etablierte Methode, um die morphologischen Eigenschaften von Samenzellen in der Routinediagnostik zu untersuchen und zu beurteilen. Diese Techniken ermöglichen die Beurteilung von Struktur, Form und Vitalität der Spermien und liefern somit Einblicke in ihre Funktionalität und ihre potenzielle Befruchtungsfähigkeit. Es existieren zahlreiche etablierte Färbemethoden, die im Vergleich zueinander bis dato kaum evaluiert wurden, sich jedoch in der Anfärbung bestimmter Strukturen der Samenzellen unterscheiden.

Außerdem ist zu beachten, inwiefern der Zeitpunkt der Untersuchung einen Einfluss auf das Ergebnis hat, vor allem, wenn Rückstellproben für forensische Zwecke benötigt werden.

Das Ziel der Untersuchung war es anhand von sechs Färbemethoden folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Eignen sich die gewählten Färbemethoden dazu, aufgetautes, kryokonserviertes Sperma von Rüden zu untersuchen?
- Unterscheiden sich die Ergebnisse der verschiedenen Methoden?
- Welche Veränderungen lassen sich zwischen den Färbemethoden bezüglich ihrer Beurteilbarkeit unter Berücksichtigung der Lagerungsdauer feststellen?
- Wie unterscheiden sich die Färbemethoden hinsichtlich des Zeitaufwands und der Kosten?

2 Literatur

2.1 Anwendung lichtmikroskopischer Färbemethoden zur morphologischen Untersuchung caniner Samenzellen

Die lichtmikroskopische Untersuchung gefärbter Samenzellpräparate zur Morphologie-Beurteilung stellt einen wichtigen Teil der spermatologischen Untersuchung dar. Es ist bekannt, dass ein hoher Anteil von Abweichungen der Morphologie caniner Samenzellen die Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigt (Oetllé, 1990). Je nach Quelle werden beim Rüden zwischen 20 und 30 % (Busch und Waberski, 2007) bzw. 10–25 % pathologische Spermienformen (Günzel-Apel, 2016) als normal eingestuft. Laut Kolster (2018) zählt die Spermienmorphologie beim Rüden neben der Gesamt-Spermienzahl und Viabilität zu den drei wichtigsten Kriterien zur Beurteilung der Samenqualität. Im Rahmen einer Vielzahl von Studien an caninen Samenzellen ist die lichtmikroskopische morphologische Beurteilung Bestandteil der spermatologischen Untersuchung (Boucher et al., 1958; Baker und Clarke, 1987; Mocé und Graham, 2008; Arlt et al., 2023; Christensen und Meyers, 2023).

Bujan et al. (1988) betonen für die Humanmedizin, dass die Spermienmorphologie ein wesentlicher Parameter bei der Ejakulatanalyse sei. Es wird zudem festgestellt, dass die Morphologie als Spermparameter die beste Unterscheidungsmöglichkeit zwischen „unfruchtbar“ und „fruchtbar“ bietet.

2.1.1 Eosin

Eosin ist ein zu den Fluorochromen gehörendes Xanthenderivat mit schwach saurer Reaktion (Sabnis, 2010) und gehört zu den gebräuchlichsten Farbstoffen der Histologie. Es wird meist in einer 0,1%igen wässrigen Lösung verwendet. Es färbt die Zytoplasmastrukturen in verschiedenen Tonabstufungen rot an (Riedelsheimer und Büchl-Zimmermann, 2015). Die Eosin-Färbung ist eine Methode zur Analyse der Spermienvitalität einer Samenportion. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Durchlässigkeit der Plasmamembran bei toten Zellen (Goetz und Goetz, 1938). Der Farbstoff Eosin wird von membrangeschädigten Spermien aufgenommen und färbt

diese rosarot an, während intakte Spermien nicht gefärbt werden (Günzel-Apel, 1994). Bei mit Eosin gefärbten Präparaten können zudem Beurteilungen der Pathomorphologie erfolgen (Wehrend und Bostedt, 2013).

In der Veterinärmedizin wurden erste Färbungen mit Eosin in Verbindung mit Opalblau als Hintergrundfärbung an Schafbocksperma dokumentiert (Lasley et al., 1942). Die ersten Versuche mit einer reinen Eosin-B-Färbung wurden von Boguth und Müller (1951) unter Verwendung von Bullensperma beschrieben. Mayer et al. (1951) wandten diese Methodik ebenfalls bei Schafbocksperma an. Später wurden durch Dott und Foster verschiedene Kombinationen mit Nigrosin untersucht. Sie ersetzten das durch Lasley et al. (1942) verwendete Opalblau durch Nigrosin (Dott und Foster, 1972). Des Weiteren wurden verschiedene Färbemethoden zur Vitalitätsbeurteilung bei Hund und Mensch durch Wales (1959) erforscht. Er stellte fest, dass die Eosin-Färbung in Kombination mit Nigrosin zu einer besseren Differenzierung als mit Kongorot führt.

Eliasson und Treichl (1971) untersuchten verschiedene Konzentrationen der Farblösungen sowie Einwirkzeiten. Dabei entwickelten sie eine Färbemethode mit einer 0,5%igen Eosin G-Lösung zur Beurteilung der Spermiovitalität. Bei Versuchen mit variierenden Eosin-Konzentrationen von 1, 2,5 und 5 % stellten Dougherty et al. (1977) fest, dass Ausstriche mit der 5%igen Lösung die beste Qualität lieferten. Des Weiteren korrelierten die Ergebnisse sehr gut mit denen der Motilitätsschätzung. Eliasson (1981) empfahl eine 1-Schritt-Eosin-Färbung mit einer 0,5–1%igen Konzentration des Farbstoffs Eosin G an humanen Samenzellen. Zusätzlich sprach die World Health Organization (1999) eine Empfehlung zur Färbung menschlicher Spermien mit 0,5%iger Eosin G-Lösung in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung aus. Björndahl et al. (2004) veröffentlichten eine Übersicht der bis dato evaluierten Färbetechniken zur Beurteilung der Spermiovitalität unter Verwendung von Eosin bzw. Eosin-Nigrosin. Die aufgeführten Eosin-Techniken beziehen sich auf humane Samenzellen. Eine modifizierte Übersicht dieser Färbetechniken findet sich in Tabelle 1.

In Lehrbüchern wird für Rüdenspermien im Allgemeinen empfohlen einen Ausstrich mit Eosin G anzufertigen. Es eignet sich eine 2%ige Farblösung aus 2 g Eosin G und 3 g Natriumzitat ad 100 ml Aqua dest. Auf einen

gesäuberten, entfetteten und vorgewärmten Objektträger werden mit einer Pipette 20 µl der Eosinlösung und 10 µl der Samenzellen aufgebracht. Durch vorsichtiges Kippen des Objektträgers werden die Flüssigkeiten vermischt und ein kleiner Tropfen davon auf einem zweiten vorgewärmten Objektträger mithilfe eines Deckglases dünn ausgestrichen und luftgetrocknet. Im Anschluss werden 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop ausgezählt und ungefärbte Samenzellen als lebend, gefärbte als tot bewertet (Moritz, 2013; Günzel-Apel, 2016)

Der Normwert eosingefärbter Spermien liegt beim Rüden laut Günzel-Apel (1994) bei maximal 5 bis 10 %. Bartlett (1962) stellte einen durchschnittlichen Anteil toter Samenzellen in Höhe von 15 % fest. Laut Wehrend und Bostedt (2013) sind bis zu 15 % avitale Spermien physiologisch, während laut World Health Organization (2010) der untere Normwert für vitale Spermien beim Menschen bei 58 % liegt.

2.1.2 Eosin-Nigrosin

Die Eosin-Nigrosin-Färbung dient sowohl zur Beurteilung der Spermivitalität als auch der Analyse pathomorphologischer Veränderungen an Samenzellen. Durch die Kombination von Eosin mit Nigrosin entsteht ein dunkelgrauer Hintergrund, der vitale (ungefärbte) und avitale (rosa gefärbte) Spermienköpfe voneinander abgrenzt (Günzel-Apel, 2016).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zum erstmaligen Einsatz der Eosin-Nigrosin-Färbung. Während Anderson (1945) die erstmalige Nutzung dieser Methode an Samenzellen von Rüden beschrieb, dokumentierte Blom (1950) die Entwicklung und Anwendung der Färbung an bovinen Spermatozoen. Hierbei wurde eine Kombination von 5 % Eosin-B und 10 % Nigrosin verwendet. Die Samenzellen wurden zuerst mit Eosin-Opalblau und anschließend mit Nigrosin gefärbt. Der Färbeprozess dauerte nicht länger als eine Minute. Williams und Pollak (1950) prüften die Übertragbarkeit von Bloms Technik auf humane Samenzellen, woraufhin verschiedene Varianten entstanden (Dougherty et al., 1975; Eliasson, 1977, 1981). Die bis 2004 an humanen Spermatozoen evaluierten Färbemethoden mit Eosin und Eosin-Nigrosin haben Björndahl et al. (2004) tabellarisch aufgelistet (Tabelle 1).

Lediglich die zuerst aufgeführte Eosin-Nigrosin-Färbung durch Blom (1950) wurde explizit an bovinen Spermien angewendet.

Tabelle 1: Übersicht der bis 2004 evaluierten Färbemethoden mit Eosin und Eosin-Nigrosin nach Björndahl et al. (2004), die erste Technik bezieht sich auf Bullenspermien, die weiteren auf humane Samenzellen

Publikation	Art der Färbetechnik und verwendete Reagenzien
Blom (1950)	2-Schritt Eosin-Nigrosin (Bulle) <ul style="list-style-type: none"> - 50 g/l Eosin B (Eosin Opalblau) in Aqua dest. - 100 g/l Nigrosin in Aqua dest.
Williams und Pollak (1950)	2-Schritt Eosin-Nigrosin <ul style="list-style-type: none"> - Bloms Technik, angewendet an menschlichen Spermien
Eliasson und Treichl (1971)	1-Schritt Eosin <ul style="list-style-type: none"> - 5 g/l Eosin G in 0,15 Mol Phosphatpuffer
Dougherty et al. (1975)	2-Schritt Eosin-Nigrosin <ul style="list-style-type: none"> - 50 g/l Eosin G in Wasser gelöst - 100 g/l Nigrosin in Wasser gelöst
Eliasson (1977)	2-Schritt Eosin-Nigrosin <ul style="list-style-type: none"> - 10 g/l Eosin G - 100 g/l Nigrosin
Eliasson (1981)	1-Schritt Eosin <ul style="list-style-type: none"> - 5–10 g/l Eosin G in 0,15 Mol (isotonischem) Phosphatpuffer
	2-Schritt Eosin-Nigrosin <ul style="list-style-type: none"> - 10 g/l Eosin G in Aqua dest. - 100 g/l Nigrosin in Aqua dest.
Mortimer (1985)	1-Schritt Eosin-Nigrosin <ul style="list-style-type: none"> - 6,7 g/l Eosin G und 100 g/l Nigrosin in Leitungswasser

World Health Organization (1999)	1-Schritt Eosin - 5 g/l Eosin G in 9 g/l Natriumchlorid-Lösung
	2-Schritt Eosin-Nigrosin - 10 g/l Eosin G in Aqua dest. - 100 g/l Nigrosin in Aqua dest.
Kvist und Björndahl (2002)	1-Schritt Eosin-Nigrosin - 6,7 g/l Eosin G und 100 g/l Nigrosin in 9 g/l Natriumchlorid-Lösung

Hancock (1951) modifizierte Bloms Technik und untersuchte Auswirkungen unterschiedlicher Temperaturen der Färbelösung (Eosin G und Nigrosin) auf Bullenspermien. Ein größerer Temperaturunterschied zwischen den bei 30 °C gelagerten Samenzellen und den bei 0–30 °C vorbereiteten Farblösungsfractionen war mit einem höheren Anteil toter Spermien assoziiert. Campbell et al. (1956) passten die Methode für Schafbockspermien an und beobachteten, dass eine längere Färbedauer der Eosin-G-Nigrosin-Lösung mit einem steigenden Anteil gefärbter Samenzellen korrelierte. Sie empfahlen eine Einwirkzeit von fünf Minuten für die praktische Anwendung.

Dott und Foster (1972) verglichen die Ausstriche mit zwei Nigrosin-Konzentrationen an Spermaproben von Ebern und Bullen. Es wurde eine Eosin-Nigrosin-Färbung mit 0,67 g Eosin G und 5 g Nigrosin ad 100 ml Aqua dest. einer Färbung mit 0,67 g Eosin G und 10 g Nigrosin ad 100 ml Aqua dest. als Nigrosin-Eosin-Färbung gegenübergestellt. Beide Lösungen wurden zum Kochen gebracht und konnten nach dem Abkühlen zur Anfärbung von Samenzellen genutzt werden. Zur Herstellung des Ausstrichs wurde ein Tropfen Sperma zu acht Tropfen Färbelösung (erwärmt auf 30 °C) gegeben, für fünf Minuten bei 30 °C inkubiert und dann auf Objektträgern ausgestrichen. Beim Vergleich der beiden Farbstoffkonzentrationen von Nigrosin wurden bei der Eosin-Nigrosin-Lösung mehr Spermien als mit der Nigrosin-Eosin-Lösung gefärbt.

Swanson und Bearden (1951) zeigten, dass die Eosin-Nigrosin-Färbung die Spermienmorphologie betont und dahingehend eine gute Beurteilung der Samenzellen ermöglicht. Im Gegensatz zu Dott und Foster (1972) war der

Anteil toter Spermien beim Bullen unabhängig von der Nigrosin-Konzentration in der Farblösung. Des Weiteren machte es keinen Unterschied, ob die Färbeschritte getrennt voneinander oder mit bereits gemischten Färbelösungen durchgeführt wurden. Björndahl et al. (2004) beobachteten dagegen einen Unterschied zwischen einem einstufigen und einem zweistufigen Färbeprotokoll humaner Samenzellen. Beim zweistufigen Verfahren war der Anteil toter Spermien höher.

Wales (1959) empfahl an caninen und humanen Samenzellen den routinemäßigen Einsatz der Eosin-Nigrosin-Färbung. Zudem stellte er bei seinen Untersuchungen fest, dass beim Rüden die Eosin-Nigrosin-Färbung gegenüber der Kongorot-Nigrosin-Färbung vorzuziehen sei. Auch Bartlett (1962) führte umfangreiche Studien zur Morphologie von Rüdenspermien durch und nutzte zur Vitalitätsbeurteilung die Färbung mit Eosin und Nigrosin. Kolster (2018) zählt die Eosin-Nigrosin-Färbung zudem zu den etablierten Methoden, um pathomorphologische Auffälligkeiten caniner Samenzellen zu untersuchen.

Die Methode wurde erfolgreich bei zahlreichen weiteren Tierarten wie Eber, Bulle, Rentier, Schafbock und Hengst (Dott und Foster, 1975) sowie bei Rammlern (Beatty, 1957) angewandt. Bamba (1988) nutzte die Färbung zur Beurteilung der Akrosom-Integrität von Eberspermien unter Verwendung eines Lichtmikroskops, während Tamuli und Watson (1994) die deutliche Darstellung des Akrosoms mittels Eosin-Nigrosin-Färbung eher kritisch bewerteten. Lebende Spermien stellen sich in dieser Färbung ungefärbt dar. Die Autoren präsentierten eine Färbemethode in Kombination mit Giemsa, die sich sowohl zur Vitalitätsbeurteilung als auch zur Beurteilung des Akrosomstatus mittels Lichtmikroskop eignete. Mit dieser Kombinationsfärbung färbt sich die postakrosomale Region beim lebenden Spermium pink und beim toten Spermium in Dunkellila an, sodass sich das Akrosom optisch kontrastreich darstellt. Die Vitalität ließ sich bei beiden Färbemethoden gut beurteilen. Insgesamt konnte mit der Eosin-Nigrosin-Giemsa-Färbung zwischen vier unterschiedlichen Gruppen unterschieden werden: lebend mit intaktem Akrosom, lebend mit geschädigtem Akrosom, tot mit intaktem Akrosom und tot mit geschädigtem Akrosom (Tamuli und Watson, 1994).

Vergleiche der Einwirkzeiten der Farblösung beim Schafbock (Campbell et al., 1956), Eber (Bamba, 1988), Rüden und Mann (Wales, 1959) ergaben artspezifische Unterschiede. Beim Rüden und Mann waren nach 15 Minuten Färbezeit mehr Spermien angefärbt als bei einer Färbezeit von fünf Minuten. Mit steigender Inkubationszeit nahm auch der Anteil gefärbter Samenzellen beim Schafbock zu. Buttle et al. (1965) stellten das Phänomen der Nachfärbung an Eosin-Nigrosin-gefärbten Ausstrichen an Bullen fest, bei denen innerhalb weniger Tage alle Spermien gefärbt waren. Im Gegensatz dazu beobachtete Geisler (1990) keine deutlich ausgeprägte Steigerung gefärbter Spermien bei verlängerter Einwirkzeit von bis zu zehn Minuten (Rüde, Bulle, Hengst, Schaf- und Ziegenbock). Auch beim Menschen konnten Björndahl et al. (2003) mit steigender Inkubationszeit (30–300 Sek.) keine Zunahme gefärbter Spermien feststellen.

Swanson und Bearden (1951) untersuchten auch den Einfluss von pH-Wert und Mischungsverhältnis auf die Färberesultate. Bei Bullenspermien hatten Änderungen des pH-Werts keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Eosin-Nigrosin-Färbung. Der beste Kontrast wurde bei einem pH-Wert von 8,7 festgestellt. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Mischungsverhältnissen von Eosin und Nigrosin waren zudem nicht signifikant. Eine Lösung aus 1 % Eosin und 5 % Nigrosin in 100 ml 3%igem Natriumzitat erwies sich als besonders geeignet. Sie war über ein Jahr lang ohne Kühlung lagerfähig, wobei eine Kühlung Bakterienwachstum entgegenwirken konnte.

Tsakmakidis et al. (2010) untersuchten mit der Eosin-Nigrosin-Färbung den Zusammenhang zwischen der Morphologie der Samenzellen und dem Befruchtungserfolg beim Schwein. Sie konnten einen signifikanten Einfluss der Spermienmorphologie auf die Abferkelrate nachweisen.

2.1.3 Diff-Quick®

Die Diff-Quick®-Färbung ist eine kommerzielle Schnellfärbemethode, welche aus einer Fixierlösung (Triarylmethan in Methanol) und einer basophilen sowie einer eosinophilen Färbelösung besteht (World Health Organization, 2010; Fa. Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH, 2012). Mittels Diff-Quick® gefärbte Samenzellen weisen ein helllila gefärbtes Akrosom auf, während die

postakrosomale Region, das Mittelstück und der Schwanz dunkellila gefärbt sind. Die Färbung wird auch Giemsa-Wright-Färbung genannt (Root Kustritz et al., 1998).

Zur Herstellung werden luftgetrocknete Ausstriche je 15 Sekunden in die Fixierlösung eingetaucht. Darauf werden die Ausstriche für zehn Sekunden in die Schnellfärbelösung 1 (eosinophiles Xanthen) und fünf Sekunden in die Schnellfärbelösung 2 (basophiles Thiazin) eingetaucht. Zwischen den Färbeschritten wird überschüssige Flüssigkeit durch kurzes Abtropfen des Objektträgers entfernt. Im Anschluss werden die Präparate unter fließendem Wasser abgewaschen und können dann entweder direkt beurteilt oder eingebettet zur späteren Auswertung gelagert werden (Kruger et al., 1987).

In vergleichenden Untersuchungen mit der Papanicolaou-Färbung an humanen Samenzellen stellten Kruger et al. (1987) fest, dass die Diff-Quick®-Färbung aufgrund der schnellen Herstellung unter sieben Minuten und der einfachen Durchführung mit standardisierten Reagenzien der Papanicolaou-Färbung vorzuziehen sei. Insgesamt war die Qualität der Färbeergebnisse vergleichbar, es sollten jedoch keine zu dicken Ausstriche angefertigt werden, damit sich der Hintergrund der mit Diff-Quick® gefärbten Ausstriche nicht anfärbt. Auch in einer Vergleichsstudie von zwei CASA-Systemen an humanen Samenzellen, welche entweder mit Diff-Quick® oder Papanicolaou gefärbt wurden, kamen die Autoren zum Ergebnis, dass die Diff-Quick®-Färbung für computergestützte Spermienmorphologie-Untersuchungen zu bevorzugen sei (Coetzee et al., 2001).

Ein häufiger Einsatz dieser Schnellfärbemethode findet in automatisierten Samenzell-Analyse-Systemen statt, die dazu dienen, die Beurteilung der Pathomorphologie von Spermienproben sensitiv und objektiv zu gestalten. Gago et al. (1998) führten vergleichende Untersuchungen von Affenspermien (*Macaca fascicularis*) mit verschiedenen Färbemethoden durch. So wurde die Eignung von Hämatoxylin, Hemacolor® und Diff-Quick® als Färbemethode zur Verwendung mit der ASMA-Technologie am Sperm Class Analyzer (SCA) von Microptic untersucht. Den höchsten Anteil korrekt erfasster Spermienköpfe erzielte die Hämatoxylin-Färbung, Diff-Quick® einen mittleren Wert und Hemacolor® den niedrigsten Anteil. Bei der Diff-Quick®-Färbung färbte sich zudem das Seminalplasma stark an und es lagerten sich Farbpartikel an die

Spermienköpfe, was die Genauigkeit der Auswertung reduzierte (Gago et al., 1998).

Soler et al. (2005) führten eine weitere Studie mit den drei zuvor genannten Färbemethoden mittels computergestützter Spermienanalyse am Rotwildhirsch durch. Sie betonten, dass bei der Diff-Quick®-Färbung mehr Samenzellen automatisch erkannt wurden als bei der Färbung mit Hämatoxylin oder Hemacolor®. Zudem stellten die Autoren fest, dass sie mit dieser Färbemethode am besten Samenzellen zwischen einzelnen Rotwildhirschen differenzieren konnten.

In der Humanmedizin wird die Diff-Quick®-Färbung zur routinemäßigen Beurteilung der Spermienmorphologie beschrieben (Agarwal, 2016; Agarwal et al., 2022) und durch die World Health Organization (2010) empfohlen. Mota und Ramalho-Santos (2006) untersuchten einen Zusammenhang zwischen Kopfveränderungen an mit Diff-Quick® gefärbten Samenzellen von Katern und vorhandenen DNA-Defekten. Sie stellten eine hohe Korrelation fest und empfahlen daher für die Durchführung von Morphologie-Untersuchungen an Kater-Spermien in der Praxis die Diff-Quick®-Färbemethode.

Schneider (2014) untersuchte die Diff-Quick®-Färbung an flüssigkonserviertem Ebersperma und stellte eine mäßige Detailerkennbarkeit bei gutem Kontrast und klarem Hintergrund fest, wobei die Farbintensität nach dreimonatiger Lagerung reduziert war.

Erste Untersuchungen mit der Diff-Quick®-Färbung an caninen Samenzellen führten Root Kustritz et al. (1998) durch. Sie verglichen morphologische Auffälligkeiten bei den Färbemethoden Diff-Quick®, Hancock (Eosin G und Nigrosin) und Eosin B-Nigrosin. Die Diff-Quick®-Färbemethode erzielte dabei den höchsten Anteil morphologisch normaler Samenzellen. Sie zählt aktuell zu den Standardfärbungen zur Beurteilung der Pathomorphologie von Rüdenspermien (Kolster, 2018).

2.1.4 Hemacolor®

Die Hemacolor® Schnellfärbung ist eine häufig in der Hämatologie eingesetzte Methode und entspricht der Pappenheim-Färbung, welche eine Kombination der Färbemethoden nach May-Grünwald und Giemsa darstellt (Begemann und Rastetter, 1979; Baum, 2019). Sie führt zu einer purpurroten Färbung von

Zellkernen, die auf der molekularen Wechselwirkung zwischen dem Farbstoff Eosin G und einem Azur B-DNA Komplex basiert. Die Schnellfärbemethode besteht aus drei Lösungen. Reagenz 1 ist Methanol, um die ausgestrichenen Spermien auf dem Objektträger zu fixieren. In Reagenz 2 ist Eosin G enthalten, um die basischen Bestandteile der Samenzelle mit der sauren Farblösung rot zu färben. Die sauren Bestandteile der Zellen werden mit Reagenz 3 blau gefärbt, welches Azur B und Methylenblau enthält (Fa. Merck KGaA, 2017).

Hemacolor® wurde als Schnellfärbemethode mit einem automatisierten Samenzell-Analyse-System, dem Sperm Class Analyzer, an Spermien von Affen genutzt. Im Vergleich zu Diff-Quick® und Hämatoxylin führte die Färbung mit Hemacolor® zu einem geringen Kontrast der Samenzellen zum Hintergrund. Zudem war die Rate an korrekt erkannten Spermienköpfen bei Hemacolor® am geringsten (Gago et al., 1998). Schneider (2014) konnte hingegen keinen signifikanten Unterschied der Farbintensität von Diff-Quick® und Hemacolor® bei der Anwendung an Eberspermien feststellen.

Untersuchungen von drei Färbemethoden (Hemacolor®, Diff-Quick®, Harris Hämatoxylin) an Rotwildspermien durch Soler et al. (2005) ergaben signifikante Unterschiede abhängig von der Färbung. Mit Hemacolor® gefärbte Samenzellen wiesen im Vergleich die größten Kopfmaße auf und boten bei der visuellen Beurteilung den besten Kontrast des Spermienkopfes und des Mittelstücks. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus der automatisierten Analyse bot die Diff-Quick® insgesamt die höchste Anzahl korrekt erkannter Spermien und wird daher zur Färbung von Rotwildspermien empfohlen.

In einer Untersuchung zur standardisierten Beurteilung der Spermienkopf-Morphometrie an Eberspermien durch García-Herreros et al. (2006) erwiesen sich die Färbungen Harris Hämatoxylin und Hemacolor® als am geeignetsten. Dreier (2010) empfahl einen mit Hemacolor® gefärbten Ausstrich bei Verdacht auf eine Entzündung im Rüdensperma zum Nachweis von Entzündungszellen und Bakterien.

2.1.5 Spermac®

Die Spermac®-Färbung ist eine kommerziell erhältliche Färbemethode, die eine selektive Anfärbung der Bestandteile einer Samenzelle, einschließlich des Akrosoms, ermöglicht. Somit kann die akrosomale Integrität beurteilt werden. Die Färbung stammt aus der Humanmedizin und besteht aus drei Färbelösungen sowie einer Fixierlösung (Hoffmann, 2003) und hat sich auch zur Beurteilung des Akrosoms beim Rüden bewährt (Riesenbeck et al., 2001). Auch Kolster (2018) zählt die Spermac®-Färbung zusammen mit Eosin-Nigrosin und Diff-Quick® zu den Routinemethoden zur Evaluierung der Pathomorphologie an caninen Samenzellen.

Zur Herstellung wird ein Spermien-Ausstrich angefertigt, luftgetrocknet und anhand einer Fixierlösung auf die Färbung vorbereitet. Im Anschluss erfolgen das Waschen des Ausstriches und die drei Färbeschritte mittels Eintauchens des Objektträgers für jeweils 1-2 Minuten in die Farblösung (Lösung A – rot, Lösung B – hellgrün, Lösung C – dunkelgrün). Zwischen den Färbevorgängen werden die Objektträger jeweils erneut gewaschen (Fa. Minitüb GmbH, 2014). Das Akrosom stellt sich in der Spermac®-Färbung grün dar, der Spermienkern rot, das Äquatoralsegment blassgrün und Mittelstück und Schwanz erscheinen grün bei farblosem Hintergrund. Es werden jeweils 200 Samenzellen mit Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung beurteilt (Hoffmann, 2003).

Oettlé (1986) wendete die Spermac®-Färbung erstmalig bei humanen und caninen Spermien an. Bei Untersuchungen zur Tiefgefriereignung erwies sich diese als zuverlässige Färbemethode, um die Samenqualität zu überprüfen und somit die Befruchtungsfähigkeit einer zuvor eingefrorenen Samenprobe zu beurteilen. Dabei wurde die schnelle Beurteilbarkeit des akrosomalen Status hervorgehoben.

Oettlé und Soley (1986) beschrieben Spermac® zudem als schnelle und verlässliche Färbung für verdünntes Sperma, da sich der Hintergrund im Ausstrich nicht anfärbt. Aus den Färberesultaten ergaben sich laut den Autoren vier mögliche Zustände:

Typ 1: Intaktes Akrosom mit gleichmäßig dunkelgrüner Färbung und glattem Rand

Typ 2: Verlust akrosomaler Substanz ohne schwere Membranschäden bei hellgrüner akrosomaler Färbung und glattem Rand

Typ 3: Schwere Membranschäden bei blasser akrosomaler Färbung und einem geschwollenen, unregelmäßigen Rand sowie Separation der akrosomalen Membranen

Typ 4: Akrosomverlust mit einer roten Färbung des Kopfbereichs (Oettlé und Soley, 1986)

Die Spermienmorphologie wurde durch Rauhaus (1990) an den Tierarten Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Pferd untersucht. Es wurden die Färbemethoden nach Hancock, Farelly und Spermac® verglichen und kein signifikanter Unterschied in den Färbeergebnissen im Hinblick auf die Beurteilbarkeit der Morphologie festgestellt. Lediglich beim Hengst konnten Akrosomdefekte mittels Spermac® besser festgestellt werden als bei den anderen beiden Färbungen.

Die Anwendung der Spermac®-Färbemethode an Eberspermien während der Kryokonservierung wurde durch Paulenz et al. (1995) angewendet. Sie verglichen unter Feldbedingungen mit einem Lichtmikroskop die Färbeergebnisse von Spermac® mit der Spermienmotilität. Spermac® erwies sich als sehr gut geeignet, um die Akrosomintegrität an Eberspermien zu bestimmen, wobei die Qualität und Detailerkennbarkeit bei nicht gekühlten oder tiefgefrorenen Samenzellen besser war. Auch Schneider (2014) bestätigte die Zuverlässigkeit und Qualität der Spermac®-Färbung an porzinen Samenzellen und betonte gute Farbtintensität, Schärfe und Kontrast der Präparate.

Chan et al. (1996) stellten an humanen Spermien fest, dass Spermac® zur Beurteilung der akrosomalen Integrität geeignet ist. In ihrer Arbeit wurde eine Korrelation des Status zur Befruchtungskapazität gefunden.

Schäfer und Holzmann (2000) fanden bei der Anwendung der Spermac®-Färbung bei Katzen heraus, dass im Vergleich zu Hancock-Färbung signifikant weniger Plasmatropfen angefärbt wurden. Sie betonten jedoch, dass die

Spermac®-Färbung zwar nicht zur Untersuchung von Plasmotropfen, dafür aber zur Beurteilung der akrosomalen Integrität geeignet sei.

Miß (2012) verwendete Spermac® erfolgreich an caninen Samenzellen zur Beurteilung des Akrosoms. In ihren Versuchen fiel eine Überlagerung mit grün gefärbten Partikeln, vermutlich von Eidotter aus dem Verdünner resultierend, negativ auf.

Goericke-Pesch und Failing (2013) untersuchten den Nutzen der Spermac®-Färbung und des HOS-Tests (Hypoosmotischer Schwelltest) für die Samenanalyse beim Rüden. Sie beschrieben, dass diese Färbemethode in neueren Studien zunehmend anstelle von Eosin- oder Eosin-Nigrosin-Färbungen genutzt wird, da sie eine umfassendere Beurteilung der Morphologie, einschließlich des Akrosoms, ermöglicht. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass sowohl Spermac® als auch der HOS-Test zur Verbesserung der Samenanalyse beim Rüden beitragen.

Ein Vergleich dreier Färbemethoden von aufgetautem TG-Sperma vom Rüden (FITC-PNA, Coomassieblau G-250 und Spermac®) im Hinblick auf die Beurteilbarkeit der Akrosomintegrität wurde durch Ponglowhapan et al. (2016) durchgeführt. Alle untersuchten Färbungen wurden als geeignet zur Beurteilbarkeit des akrosomalen Status eingeschätzt, wobei FITC-PNA eine genauere Befundung ermöglichte.

2.1.6 Formolzitrat-Bengalrosa

Die Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa besteht aus Bengalrosa zur akrosomalen Färbung sowie aus Natriumzitrat und Formaldehyd zur Fixierung der Spermien (Moritz, 2013).

Erste Erwähnung findet Bengalrosa als Färbung von Samenzellen zur Beurteilung von morphologischen Veränderungen in den Untersuchungen von Hackett und Macpherson (1965). Sie beschrieben den Farbstoff als am häufigsten für morphologische Färbungen genutzt und empfahlen ihn zur Färbung aller Säugetier-Spermien. Die Färbelösung wird aus 3 g Bengalrosa, 1 ml 40%igem Formalin und 99 ml Aqua destillata hergestellt und färbt alle Zellen.

Als Bestandteil der „triple-stain method“ wurde Bengalrosa von Talbot und Chacon (1981) an humanen Samenzellen angewendet. Das in der

Kombination verwendete Trypanblau erlaubte eine Unterscheidung der vitalen und avitalen Spermien, Bismarckbraun führte zu einer hellbraunen Färbung der postakrosomalen Region und Bengalrosa färbte nur das Akrosom intakter Spermien rosa.

Die Färbelösung besteht aus 2,9 g Tri-Natriumzitat-Dihydrat, 4 ml 35%iger Formaldehydlösung, 0,156 g Rose Bengal und 100 ml Aqua destillata. Zur Herstellung eines gefärbten Präparats werden 300 µl Fixierlösung mit 10 µl Sperma in einem Gefäß sorgfältig vermischt. Im Anschluss werden 10 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung kann nach 10–30 Minuten mit Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung erfolgen (Riesenbeck et al., 2001; Hoffmann, 2003; Moritz, 2013).

Oberlender et al. (2012) führten eine Vergleichsstudie zur Beurteilung der Pathomorphologie von Samenzellen des Ebers durch. Die Fixierung mit Formolzitrat, betrachtet bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop, wurde mit der Färbung mit Bengalrosa, beurteilt bei 400-facher Vergrößerung unterm Lichtmikroskop, verglichen. Bei der Bengalrosa-Färbung stellten sie ein erhöhtes Aufkommen von Schwanzdefekten fest, welches laut den Autoren auf die Ausstrichtechnik zurückzuführen sei. Bengalrosa wurde zusammenfassend als effektive Färbemethode zur Beurteilung der Spermienmorphologie beim Eber beschrieben.

In ihren Untersuchungen zu Färbungen von Ebersperma beschrieb Schneider (2014) Formolzitrat-Bengalrosa als Methode mit guter Farbintensität und Detailerkennbarkeit. Jedoch betonte sie, dass die Wartezeit auf ein bis drei Stunden verlängert werden musste, bis sich die Spermienköpfe im Feuchtpräparat abgeflacht hatten und somit eine Auswertbarkeit möglich war. Bengalrosa färbt intakte akrosomale Strukturen gleichmäßig rosa mit einer klaren Begrenzung an, während defekte Kopfkappen an einem geschwollenen apikalen Rand erkennbar sind (Hoffmann, 2003). Im Gegensatz zur Spermac®-Färbung erfolgt keine selektive Anfärbung des Akrosoms. In wissenschaftlichen Arbeiten wurde die Färbung mit Bengalrosa mehrfach zur Beurteilung des akrosomalen Status von Spermien genutzt, so zum Beispiel an Ziege, Elefant, Mensch, Bulle, Hirsch und Hund (Garde et al., 1997;

Gravance et al., 1998; Glazier et al., 2000; Kitiyanant et al., 2000; Cardoso et al., 2007; Nandi et al., 2012).

Die Literatur zu den angewendeten Färbemethoden stützt sich teilweise auf ältere Primärstudien, da sich diese Verfahren seit ihrer Etablierung nur geringfügig verändert haben. Gleichzeitig ist die Datenlage speziell zu Rüdenspermien begrenzt. Mögliche Auswirkungen werden daher im Diskussionsteil eingeordnet.

2.1.7 Weitere Färbemethoden bei caninen Samenzellen

Für Rüdenejakulate sind zahlreiche weitere Färbemethoden beschrieben. Im Bereich der Vitalitätsfärbungen sind die Verfahren Erythrosin-Nigrosin (Wales, 1959), Bromphenolblau (Geisler, 1990) und Bromphenol-Nigrosin (Geisler, 1990; Daub, 2015) zu nennen. Daub et al. (2016) verglichen in einer Studie drei Färbungen, wobei die Bromphenol-Nigrosin-Färbung zur Vitalitätsbeurteilung am besten abschnitt und reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

Die Färbungen mit Bromphenolblau und Bromphenolblau-Nigrosin als Vitalfärbungen wurden durch Geisler (1990) unter anderem an Rüdenspermien geprüft. Sie stellte bei der reinen Bromphenolblau-Färbung einen rapiden Abfall des Anteils ungefärbter Spermien bei einer Einwirkzeit von zwei Minuten und mehr fest. Bei der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung war dieser Effekt deutlich schwächer. Für die Vitalitätsbeurteilung empfahl sie den Einsatz von Bromphenolblau-Nigrosin oder Nigrosin-Eosin. Auch Daub (2015) setzte die Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung in Vergleichsuntersuchungen zwischen drei Vitalfärbungen (neben Eosin und Eosin-Nigrosin) zur Beurteilung der Spermienintegrität bei Rüdenspermien ein. Sie kam zu dem Ergebnis, dass die Färbemethode ähnliche Ergebnisse wie Eosin und Eosin-Nigrosin lieferte. Lediglich in der Gruppe der Tiefgefrierspermien des Rüden kam es zu einem höheren Anteil gefärbter Spermien (7–9 %).

Hackett und Macpherson (1965) beschrieben die Färbung mit Methylviolett als geeignete Methode bei Säugetieren, die zu einer violetten Färbung von Spermatozoen führt und eine morphologische Begutachtung erlaubt.

Seager und Platz (1977) erwähnten in ihrer Anleitung zur Gewinnung und Beurteilung caniner Samenzellen neben Eosin und Nigrosin auch

Papanicolaou und Toluidinblau als Farbstoffe, die sich zur morphologischen Beurteilung von Rüdensperma eignen.

Zur Beurteilung der Viabilität und des Akrosomstatus von Rüdenspermatozoen lässt sich laut Risopatrón et al. (2002) auch eine duale Färbung aus Giemsa und Trypanblau nutzen.

Laux et al. (2025) wendeten in den Untersuchungen zur Chromatinkondensation caniner Samenzellen unter anderem die Anilin- und die Toluidinblau-Färbung an. In der Anilinfärbung werden gut kondensierte Spermien hellblau gefärbt, während dunkelblaue Spermien (anilinblau-positiv) eine schlechte Chromatinkondensation anzeigen (Hofmann und Hilscher, 1991). Die Toluidinblaufärbung führt bei gut kondensierten Samenzellen zu einer hellblauen Färbung, wohingegen unreife Spermien violett gefärbt werden (Monachesi et al., 2019). Die anilinblaunegativen Spermien zeigten sich in der Vergleichsstudie durch Laux (2017) als nur sehr schwach gefärbt, was die Auszählung von ausreichend Samenzellen erschwerte. Im Vergleich dazu gestaltete sich die Auswertung in der Toluidinblaufärbung als einfacher, da ungefärbte Spermatozoen deutlicher gefärbt wurden. Auf Basis der Ergebnisse empfahl sie die Toluidinblaufärbung beim Rüden als lichtmikroskopische Färbemethode.

Wysokińska et al. (2021) untersuchten die Morphometrie caniner Samenzellen aus dem Nebenhoden unter anderem mit den Färbungen Eosin-Gentian und SpermBlue®. SpermBlue® führt zu einer abgestuften Blaufärbung aller Spermienkomponenten (Fa. Microptic S.L., 2024), wohingegen die Eosin-Gentian-Färbung zu einer Violett-Färbung des Spermiums führt (Banaszewska et al., 2015). Beide Färbemethoden erwiesen sich in der Studie als geeignet zur Beurteilung der Spermienstruktur, wobei es je nach Methode zu Unterschieden der Spermienkopf- und Schwanzdimension kam (Wysokińska et al., 2021).

Neben SpermBlue® nutzten Surmacz et al. (2022) Sperm Stain® zur morphologischen Beurteilung. Sperm Stain® basiert auf der Romanowsky-Färbung und kombiniert die Ergebnisse von May-Grünwald oder Giemsa bei schneller Durchführung innerhalb unter einer Minute (Fa. Microptic S.L., 2011). Beide Färbemethoden konnten laut Surmacz et al. (2022) erfolgreich zur Evaluierung genutzt werden, jedoch führte Sperm Stain® zu einer

detaillierteren Ansicht. SpermBlue® ermöglichte die Detektierung normaler Spermien, jedoch waren, abgesehen von Abweichungen der Form und Größe, keine Abnormitäten beurteilbar.

Eine zusätzliche Färbung zur Erfassung von Proteinen ist Coomassieblau (Brunelle und Green, 2014). Brum et al. (2006) führten eine Evaluierung der Coomassieblaufärbung an equinen und caninen Samenzellen durch. Ihre Ergebnisse zeigten, dass der akrosomale Status caniner Samenzellen mit der Coomassieblaufärbung beurteilt werden konnte. Als Vorteil wurde erwähnt, dass diese mittels Lichtmikroskop ausgewertet werden kann. Die Eignung der Coomassieblaufärbung zur Beurteilung des akrosomalen Status an caninen Samenzellen wurde in einer Vergleichsstudie durch Ponglowhapan et al. (2016) bestätigt.

Als weiteres Untersuchungsverfahren ermöglicht die Durchflusszytometrie die gleichzeitige Bestimmung von Spermienkonzentration und Vitalität, wodurch eine höhere Zahl an Zellen bei hoher Reproduzierbarkeit in kurzer Zeit untersucht werden kann (Rijsselaere et al., 2005). Durch die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen, die membrangängig bzw. membranundurchgängig sind, werden Samenzellen gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Anhand der Fluoreszenzemission der gefärbten Spermien können der Anteil lebender Spermien und die Spermienkonzentration errechnet werden. Nizański et al. (2012) beschrieben als negative Eigenschaften die hohen Anschaffungskosten für die Laborausstattung und Fluoreszenzstoffe. Sie sahen darin die Begründung dafür, dass die Durchflusszytometrie im Gegensatz zu andrologischen Laboren in der veterinärmedizinischen Praxis nicht etabliert ist.

Eine große Zahl an fluoreszenten Farbstoffen ist beschrieben. Für die Untersuchung der Spermienintegrität werden von Rijsselaere et al. (2005) folgende validierte Fluoreszenzfärbungen beim Hund genannt:

- SYBR14 in Kombination mit Propidiumiodid (PI) (Rijsselaere et al., 2002; Yu et al., 2002)
- Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA) in Kombination mit Propidiumiodid (Rota et al., 1995; Peña et al., 1998)

- Carboxy-Seminaphthorhodfluor (Carboxy-SNARF) in Kombination mit PI (Peña et al., 1999)
- Calcein-AM in Kombination mit Ethidiumhomodimer (Calcein-AM/EthD-1) (Sirivaidyapong et al., 2000)
- Hoechst 33258 (Hewitt und England, 1998)

Als zuverlässig hat sich eine Doppelfärbung mit SYBR14 und Propidiumiodid erwiesen (Weitze, 2001; Rijsselaere et al., 2005). SYBR14 führt in lebenden Zellen zu einer starken Fluoreszenz, während tote Samenzellen eine deutlich geringere Farbintensität aufweisen (Rijsselaere et al., 2005). Propidiumiodid ist nicht membranpermeabel. Es färbt den Spermienkern nur, wenn Schäden in der Plasmamembran vorhanden sind und überlagert die Fluoreszenz von SYBR14 (Peña et al., 2006). Bei einer Doppelfärbung mit SYBR14/PI entsteht bei intakten Spermien eine starke grüne Fluoreszenz durch SYBR14, während avitale Samenzellen rot gefärbt werden (Rijsselaere et al., 2005). Sterbende Samenzellen können gleichzeitig eine grüne und rote Fluoreszenz aufweisen. In allen drei Varianten entsteht nur eine so gut wie nicht vorhandene Hintergrundfärbung (Garner und Johnson, 1995).

Laux et al. (2025) nutzten zur Darstellung der Chromatinkondensation caniner Samenzellen als Fluoreszenzfärbungen auch Akridinorange und, erstmalig beim Rüden, Chromomycin A3. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass Chromomycin A3 am ehesten zur Beurteilung der Chromatinkondensation von Rüdenspermien mittels fluoreszenzmikroskopischer Verfahren geeignet ist.

Es werden zudem zahlreiche Variationen von Dreifach-Fluoreszenzfärbungen beschrieben, welche eine Beurteilung verschiedener Spermienparameter beim Rüden, wie zum Beispiel dem Akrosomstatus und der Membranintegrität, erlauben (Kawakami et al., 1993; Peña et al., 1999; Angrimani et al., 2022).

3 Material und Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von Oktober 2020 bis April 2021 aufgetautes Tiefgefrier-Sperma (TG-Sperma) von fertilen Rüden aus Privathaushalten untersucht. Die Rüden wurden in der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde in Gießen zur Samenuntersuchung mit Herstellung von TG-Sperma vorgestellt. In die Untersuchungen gingen Samenzellen von zehn Rüden unterschiedlichen Alters und verschiedener Rassen ein. Das Probenkollektiv setzte sich aus den folgenden Rassen zusammen: Border Collie (n=2), Rhodesian Ridgeback (n=2), Mastiff (n=1), American Bulldog (n=1), Briard (n=1), Deutscher Schäferhund (n=1), Eurasier (n=1) sowie American Akita (n=1). Die Samenproben wurden teilweise Stresstests (Temperaturexposition) unterzogen, im Anschluss mit sechs verschiedenen Färbemethoden gefärbt und zu vier Zeitpunkten auf pathomorphologische Merkmale untersucht (Abbildung 1).

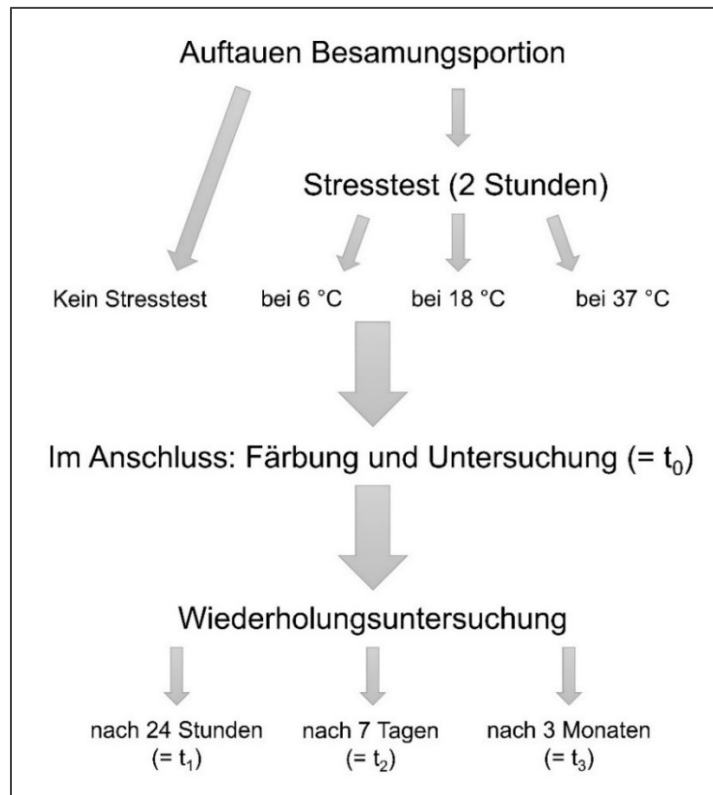


Abbildung 1: Arbeitsplan zur lichtmikroskopischen Untersuchung von Färbemethoden an aufgetautem TG-Rüdensperma

3.1 Probenauswahl

Für die Studie wurden tiefgefrorene Samenproben von der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde in Gießen verwendet. Die Auswahl erfolgte zufällig unter Berücksichtigung zweier Einschlusskriterien:

- einheitlicher Verdünner für alle Proben
- Repräsentation verschiedener Hunderassen

Es handelte sich um Samenproben von Zuchtrüden, deren Besitzer das Material zur Forschung freigegeben hatten, da keine weitere Einlagerung gewünscht wurde. Alle Rüden waren zum Zeitpunkt der Gewinnung klinisch gesund und zeigten eine physiologische Libido. Das Ejakulat wurde durch manuelle Stimulation nach Standardmethoden gewonnen (Dreier, 2010). Vor der Kryokonservierung erfolgte zu t_{-1} eine Eingangsuntersuchung, die eine pathomorphologische Beurteilung einer Samenprobe beinhaltet. Diese Untersuchungsdaten wurden erfasst, um den Einfluss des Tiefgefriervorgangs auf die Pathomorphologie auszuwerten.

Zur Lagerung wurden die Spermien im Kliniklabor mittels Uppsala Equex-2 System verdünnt (Rezeptur, s. Tabelle 30). Nach einer Absenkung der Temperatur im Kühlschrank für eine Stunde, sowie einer weiteren Absenkung für 15 Minuten über Stickstoffdampf, wurden die Besamungspailletten tiefgefroren im Stickstoffcontainer bei -196 °C gelagert. Im Rahmen der spermatologischen Untersuchung wurde nach 24 Stunden eine Paillette zur Kalkulation der benötigten Besamungsdosis aufgetaut, morphologisch untersucht und der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien protokolliert. Für die aktuelle Untersuchung und die Färbungen wurden pro Rüde zwei Pailletten zu je 0,5 ml aufgetaut. Das detaillierte Einfrierprotokoll ist in Tabelle 31 dargestellt. Die Ergebnisse der Eingangsuntersuchung der zehn TG-Samenproben sind tabellarisch im Anhang zusammengefasst (Tabelle 32, Tabelle 33).

Es wurden ausschließlich bereits kryokonservierte Proben verwendet, ohne dass zusätzliche Eingriffe am lebenden Tier stattfanden. Vor diesem Hintergrund fällt die Nutzung archivierten biologischen Materials nicht unter § 8 des Tierschutzgesetzes, sodass eine tierschutzrechtliche Genehmigung nicht erforderlich war. Eine Beeinträchtigung des Tierwohls war durch den Versuchsaufbau ausgeschlossen.

3.2 Vorbereitung und Untersuchung der Proben

3.2.1 Auftauvorgang

Die Pailletten wurden entsprechend des WHO-Laborhandbuchs zur Untersuchung und Aufarbeitung menschlichen Ejakulates aufgetaut (World Health Organization, 2010). Hierzu wurden zwei Pailletten aus dem Stickstoffcontainer entnommen und für circa fünf Minuten in einen mit 37 °C warmem Leitungswasser gefüllten Standzylinder überführt. Im Anschluss wurden sie für circa fünf Minuten auf Papierhandtücher gelegt, damit sie Zimmertemperatur erreichen. Das schnelle Auftauen minimiert das Risiko von Rekristallisationsschäden, die bei langsamer Temperaturerhöhung durch das Zusammenwachsen kleinerer Eiskristalle entstehen können. Gleichzeitig wird potenziell entstehendes Kondenswasser an den Pailletten durch das Papier aufgefangen. Daraufhin wurden die Enden der Pailletten mit einer sauberen Schere geöffnet und die beiden Proben zur Homogenisierung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Für die anschließenden Stresstests wurde die Probe mittels Pipette in vier Fraktionen zu je 0,25 ml in drei weitere Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt.

Die erste Fraktion wurde nach dem Auftauvorgang ohne Zeitverlust weiterverarbeitet. Je nach Färbemethode wurden die Samenzellen direkt auf Objektträgern ausgestrichen bzw. mit dem Farbstoff vermischt auf die Objektträger gegeben und ausgestrichen. Im Anschluss erfolgte die morphologische Untersuchung aller Präparate. Die drei weiteren Portionen wurden vor den Ausstrichen einem Stresstest für jeweils zwei Stunden bei verschiedenen Temperaturen unterzogen. Die Stresstests sollten eine erhöhte Zahl pathologisch veränderter Samenzellen provozieren, um die Färbemethoden an Proben mit erhöhten Anteilen veränderter Samenzellen zu überprüfen.

3.2.2 Stresstest bei 18 °C

Ein dritter Teil wurde bei 18 °C Raumtemperatur für zwei Stunden gelagert. Die Temperatur wurde mittels Thermometer kontrolliert. Die Ausstriche, Färbungen und Untersuchungen erfolgten direkt im Anschluss an den Stresstest.

3.2.3 Stresstest im Wasserbad bei 37 °C

Die zweite Portion Samenzellen wurde auf einer Wärmeplatte (Fa. Minitüb, Modell HT 200) im Eppendorf-Reaktionsgefäß für zwei Stunden bei 37 °C gelagert. Diese Temperatur wurde durch das Gerät konstant gehalten und auf dem Display angezeigt. Daraufhin erfolgten ohne weiteren Zeitverzug die Ausstriche, Färbung und pathomorphologische Beurteilung.

3.2.4 Stresstest im Kühlschrank bei 6 °C

Die vierte Fraktion wurde für zwei Stunden im Eppendorf-Reaktionsgefäß im Kühlschrank bei 6 °C gelagert. Ein Thermometer mit Alarmfunktion (Fa. TFA, Lab Thermometer IP65 LT-102) gewährleistete eine konstante Temperaturüberwachung. Sofort nach der Lagerung wurden die Ausstriche angefertigt, gefärbt und untersucht.

3.3 Ausstriche

Je nach Färbemethode wurden verschiedene Ausstrichtechniken zur Herstellung der Präparate verwendet. Bei den Färbungen Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor® und Spermac® wurden Trockenpräparate mittels eines Ausstriches hergestellt. Bei den Färbungen mit Formolzitrat-Bengalrosa handelte es sich um Feuchtpräparate, bei denen das Spermien-Farbgemisch mit Deckgläschen vor schneller Austrocknung geschützt wurde. Die Anfärbung mit Eosin und Eosin-Nigrosin erfolgte bereits vor dem Ausstrich durch Vermischen der Farbstoffe mit den Samenzellen direkt auf dem Objektträger. Bei der Variante mit Formolzitrat-Bengalrosa erfolgte das Anmischen von Samen und Farbstoff im Vorfeld in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß und es wurde ein Farbgemisch auf den Objektträger gegeben. Die Färbungen mit Diff-Quick®, Hemacolor® und Spermac® erforderten getrocknete Nativausstriche vor den Färbeschritten. Hierzu wurden zwei entfettete, vorgewärmte Objektträger mit Mattrand (76 x 26 mm, Fa. IDL Nidderau) genutzt. Mit einer Pipette wurde ein Tropfen Sperma (10 µl) auf einen Objektträger gegeben. Die Flüssigkeit wurde mit dem zweiten Objektträger aufgenommen und auf dem zuvor genannten im 45°-Winkel ausgestrichen. Nach einer Minute Trockenzeit erfolgte die Färbung der Ausstriche.

Bei den Färbemethoden Eosin, Diff-Quick® und Hemacolor® wurden jeweils 40 Präparate angefertigt. Die mit Ölimmersion ausgewerteten Präparate (Eosin-Nigrosin, Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa) wurden in doppelter Ausführung, also mit 80 Objektträgern je Methode, hergestellt.

Der mattierte Rand wurde bei allen Färbemethoden zur Beschriftung des Objektträgers mit einer Codierung genutzt. Die genauen Arbeitsschritte zur Herstellung der Ausstriche je nach Färbemethode werden im Folgenden beschrieben.

3.4 Färbemethoden

3.4.1 Eosin

Zur Färbung mit Eosin wurde eine industriell gefertigte Lösung der Firma Minitüb GmbH genutzt (Art. Nr. 15405/0025, Tiefenbach, Deutschland) und die Färbung entsprechend der Gebrauchsanleitung durchgeführt (Fa. Minitüb GmbH, 2016). Hierzu wurden zwei Tropfen der Eosin-Lösung an den Rand einer kurzen Seite eines vorgewärmten Objektträgers gegeben. Ein Tropfen der Samenprobe wurde neben die Eosin-Lösung pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken wurden die Flüssigkeiten auf dem Objektträger vermischt. Im Anschluss wurde ein zweiter Objektträger in einem 45°-Winkel zur Fläche des Objektträgers ausgerichtet, mit dessen Kante das Sperma-Gemisch aufgenommen und unter gleichmäßigem Druck im selben Winkel ausgestrichen. Daraufhin folgte eine Trocknung des Ausstriches für 20 Sekunden (Weitze, 2001; Busch und Waberski, 2007). Die Beurteilung der Spermien wurde bei 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop durchgeführt (Abbildung 2).



Abbildung 2: Eosin-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung. Die Köpfe der Samenzellen sind rot angefärbt, was zeigt, dass sie tot und die Zellmembranen permeabel für den Farbstoff sind.

3.4.2 Eosin-Nigrosin

Für die Eosin-Nigrosin-Färbung wurde auch ein vorgefertigtes Produkt der Firma Minitüb GmbH verwendet. (Eosin-Lösung Art. Nr. 15405/0025, Nigrosin-Lösung Art. Nr. 15405/0029, Tiefenbach, Deutschland). Im Gegensatz zur Eosin-Färbung wurden entsprechend der Gebrauchsanleitung ein Tropfen der Eosin-Lösung und zwei Tropfen der Nigrosin-Lösung nebeneinander an die kurze Seite eines Objektträgers pipettiert. Dazu wurde ein Tropfen Sperma gegeben und weiterhin gemäß der Gebrauchsanleitung genau wie bei der Eosin-Färbung verfahren und der Ausstrich im Anschluss luftgetrocknet. Die Beurteilung der Samenzellen erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mittels Ölimmersion am Lichtmikroskop (Abbildung 3). Es wurden zwei Objektträger gefärbt, um für die Wiederholungsuntersuchungen jeweils nicht mit Öl in Kontakt gekommene Bereiche auf den Objektträgern zur Verfügung zu haben.

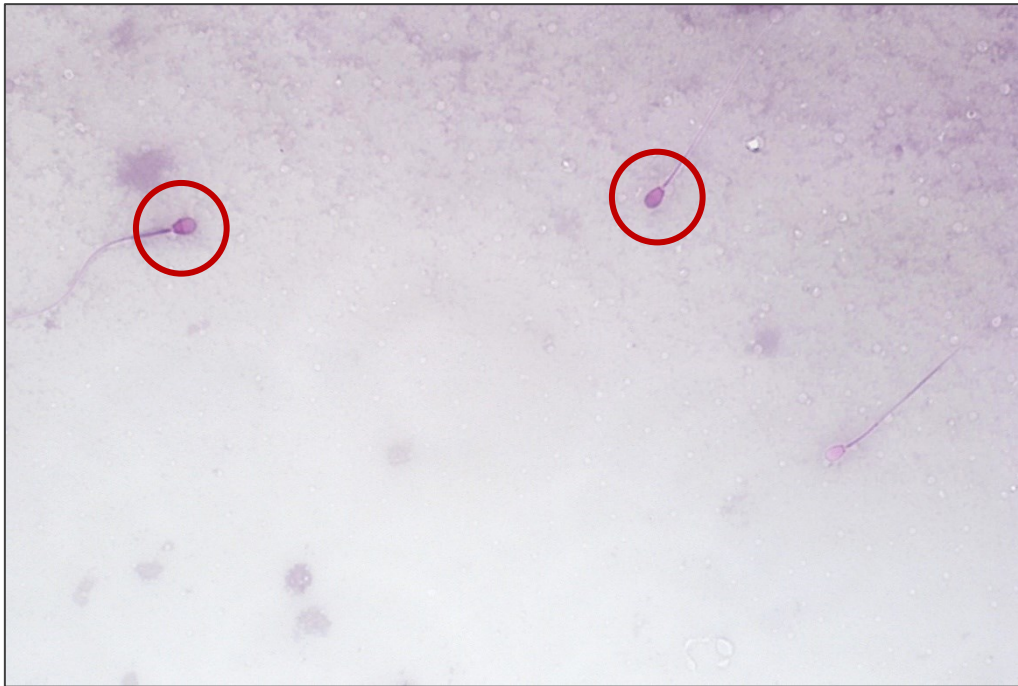


Abbildung 3: Eosin-Nigrosin-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Ölimmersion, tote Samenzellen mit Markierung

3.4.3 Diff-Quick®

Die Diff-Quick®-Färbung der bereits vorbereiteten und getrockneten Ausstriche erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Schnellfärbeset LT-SYS® der Firma Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH (Art. Nr. LT 001 + 1210, Berlin, Deutschland). Die erste Lösung (Fixierlösung) beinhaltet Methanol und Methyleneblau und fixiert die Spermien auf dem Objektträger. Die Farblösung I enthält Phosphatpuffer, Eosin und Detergenzien und fungiert als saures Farbreagens. Es färbt basische Zellbestandteile rot. In der Farblösung II befinden sich Azur und Phosphatpuffer. Als basisches Farbreagens färbt es saure Zellanteile blau an. Die einzelnen Färbeschritte wurden gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt und sind in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2: Durchführung der Diff-Quick®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von aufgetautem TG-Rüdensperma

Bezeichnung	Inhalt	Wirkung	Tauchdauer
Fixierlösung	Methanol, Methylenblau	Fixierung	5 x 1 Sek.
Farblösung I	Phosphatpuffer, Eosin, Detergenzien	Farbreagenz Rot	5 x 1 Sek.
Farblösung II	Phosphatpuffer, Azur	Farbreagenz Blau	5 x 1 Sek.
Spüllösung	Aqua dest.	Reinigung	nach Bedarf

Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde überschüssige Farblösung durch vertikales Aufstellen des Objektträgers auf saugfähiges Papier entfernt. Überschüssige Farbpartikel und die Rückseite der Objektträger wurden nach Abschluss der Färbung vorsichtig mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die Präparate bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Beurteilung der Spermien wurde bei 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop durchgeführt (Abbildung 4).



Abbildung 4: Diff-Quick®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung

3.4.4 Hemacolor®

Für die Hemacolor®-Färbung wurde das kommerziell erhältliche Schnellfärbeset der Firma Merck KGaA (Art. Nr. 1.11674.0001, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Es besteht aus drei gebrauchsfertigen Lösungen, die in Glasküvetten aufbewahrt werden. Zudem wurde mit einer Puffertablette (pH 7,2) in 1 l Aqua dest. eine Pufferlösung hergestellt. Die Färbeschritte wurden entsprechend der Gebrauchsanleitung durchgeführt und sind in Tabelle 3 beschrieben (Fa. Merck KGaA, 2017).

Tabelle 3: Durchführung der Hemacolor®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von aufgetautem TG-Sperma

Bezeichnung	Inhalt	Wirkung	Tauchdauer
Reagenz 1	Methanol	Fixierung	5 x 1 Sek.
Reagenz 2	Eosin G	Farbreagenz Rot	3 x 1 Sek.
Reagenz 3	Azur B, Methylenblau	Farbreagenz Blau	6 x 1 Sek.

Reagenz 4	Natriumphosphat, Kaliumphosphat	Puffer (pH 7,2)	2 x 10 Sek.
Spüllösung	Aqua dest.	Reinigung	nach Bedarf

Die vorgefertigten Nativausstriche wurden jeweils in die Fixierung und Färbelösungen eingetaucht und in der Flüssigkeit bewegt. Zwischen den Färbeschritten wurden die Objektträger auf saugfähige Papiertücher gestellt, um eine Verschleppung von Farblösung zu vermeiden. Im Anschluss wurde die Rückseite vorsichtig mit destilliertem Wasser gereinigt und die Präparate luftgetrocknet. Die Beurteilung der Spermien wurde bei 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop durchgeführt (Abbildung 5).

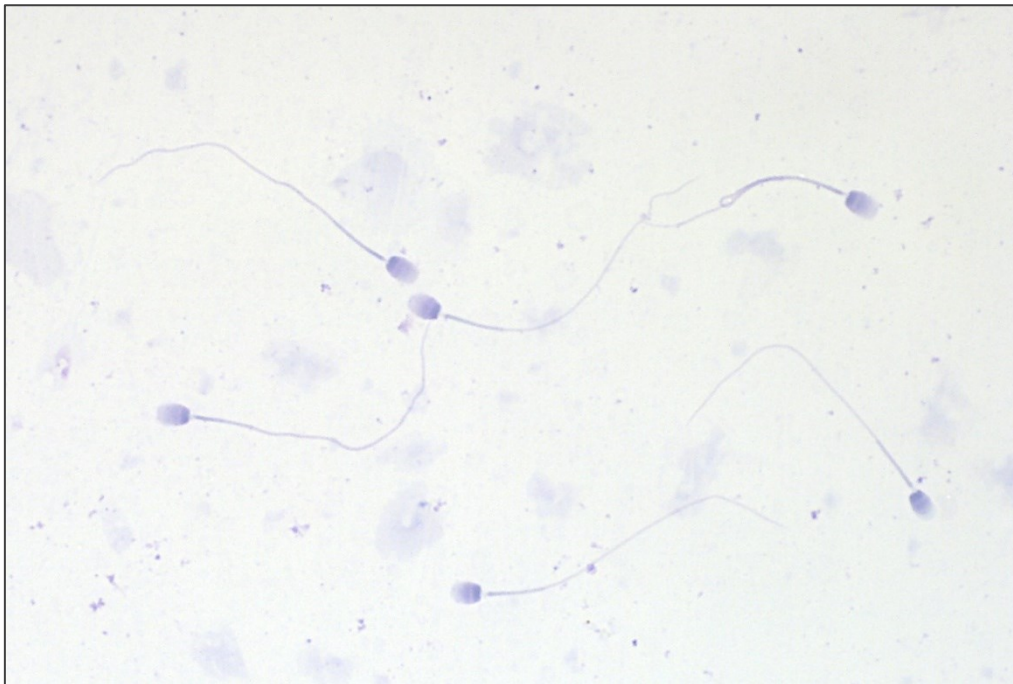


Abbildung 5: Hemacolor®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung

3.4.5 Spermac®

Die Herstellung der Spermac®-Färbung erfolgte mit der industriell gefertigten Spermac®-Färbelösung (Art. Nr. 15405/0000, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland). Hiermit lässt sich der akrosomale Status durch die Färbung der Kopfkappe gut beurteilen. Das Farbeset besteht aus vier Flüssigkeiten, darunter drei Färbelösungen und ein Fixans. Lösung A dient der Rotfärbung

des Zellkerns, Lösung B der Hellgrünfärbung der Äquatorialregion und Lösung C der Dunkelgrünfärbung von Akrosom und Geißel (Hoffmann, 2003). Die zuvor hergestellten Nativausstriche wurden zunächst durch fünfminütiges Eintauchen in die Fixierlösung, Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit auf Filterpapier und eine anschließende Trocknung für 15 Minuten auf der Wärmeplatte zur Färbung vorbereitet. Vor und zwischen den Färbeschritten wurde der Objektträger 5-mal in einen vorbereiteten Wassertrog mit destilliertem Wasser getaucht und überschüssige Flüssigkeit auf einem saugfähigen Papiertuch aufgefangen. Die einzelnen Färbeschritte wurden entsprechend der Anleitung durchgeführt und sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: Durchführung der Spermac®-Färbung zur Untersuchung der Pathomorphologie von aufgetautem TG-Rüdensperma

Bezeichnung	Inhalt	Wirkung	Tauchdauer
Fixierlösung	4%iges Formalin, Wasser	Fixierung	5–6 Min. eintauchen
Lösung A	Rose Bengal, Neutralrot	Farbreagenz Rot	2 Min.
Lösung B	Pyronin Y, Orange G	Farbreagenz Hellgrün	1 Min.
Lösung C	Janus Green, Fast Green FCF	Farbreagenz Dunkelgrün	1 Min.
Spüllösung	Aqua dest.	Reinigung	5–6-maliges Eintauchen vor und zwischen den Färbeschritten

Zuletzt wurden die gefärbten Ausstriche für circa fünf Minuten auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die Beurteilung der Samenzellen erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl am Lichtmikroskop (Abbildung 6). Es wurden zwei Objektträger gefärbt, um für die Wiederholungsuntersuchungen

jeweils nicht mit Öl in Kontakt gekommene Bereiche auf den Objektträgern zur Verfügung zu haben.



Abbildung 6: Spermac®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl

3.4.6 Formolzitrat-Bengalrosa

Mithilfe der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung können neben der morphologischen Begutachtung besonders Veränderungen des Akrosoms im Bereich des apikalen Rands beurteilt werden (Moritz, 2013). Es wurden drei Tropfen Sperma mit 300 µl Formolzitrat-Bengalrosa-Lösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vermischt.

Diese Lösung wurde zuvor durch eine Mischung von 2,9 g Tri-Natriumzitrat-Dihydrat (Art. Nr. 106448, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml Aqua dest., 4 ml 35%iger Formaldehydlösung (Art. Nr. 252549, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,156 g Bengalrosa (Art. Nr. 198250, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

10 µl der Spermisuspension wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen (24 x 24 mm) versehen. Die Spermien wurden vor der Beurteilung mindestens 30 Minuten gelagert, um sich flach abzusenken, um die Kopfform korrekt bewerten zu können (Riesenbeck et al., 2001).

Die Untersuchung der Samenzellen erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mittels Ölimmersion am Lichtmikroskop (Abbildung 7). Es wurden zwei Objektträger gefärbt, um für die Wiederholungsuntersuchungen jeweils nicht mit Öl in Kontakt gekommene Bereiche auf den Objektträgern zur Verfügung zu haben.

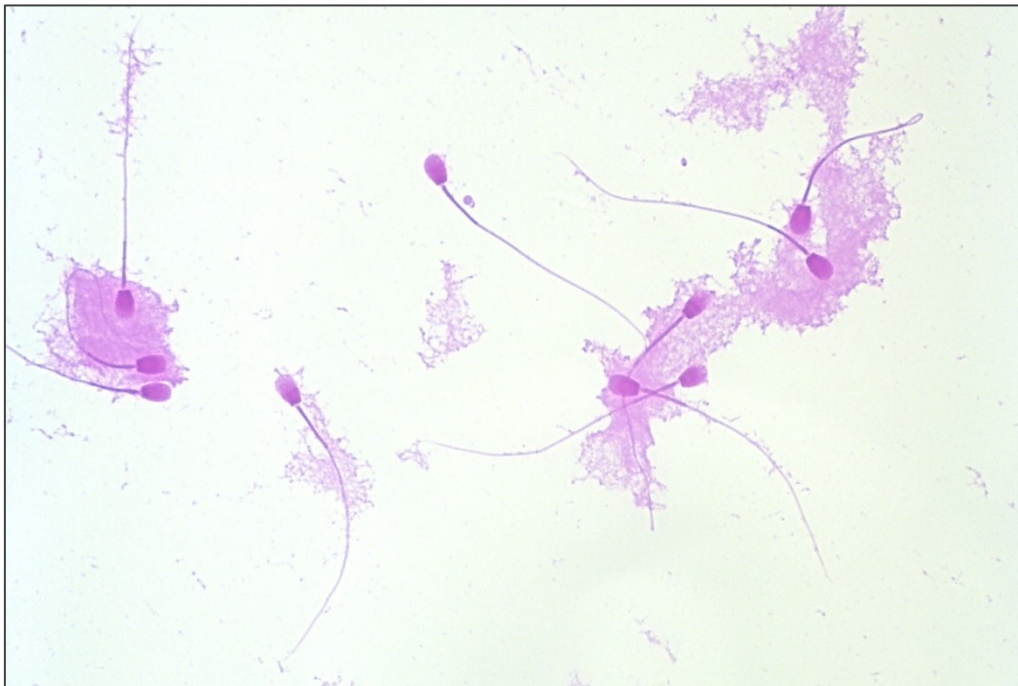


Abbildung 7: Formolzitrat-Bengalrosa, aufgetautes TG-Rüdensperma mit angefärbter Schlierenstruktur, vermutlich Drüsensekret, 1000-fache Vergrößerung mit Ölimmersion

3.5 Beurteilungskriterien

In jeder gefärbten Probe wurden 200 Samenzellen im Hinblick auf ihre Vitalität und morphologische Abweichungen untersucht und ihr prozentualer Anteil errechnet. Die Objektträger wurden dabei mäanderförmig durchmustert und ein elektronisches Zählgerät verwendet (Assistent® Counter AC-15, Fa. Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland). Für die Untersuchungen wurde das Mikroskop Hund H500 (Fa. Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland) genutzt, bei der Beurteilung in 1000-facher Vergrößerung unter der Verwendung einer Ölimmersion (Immersionol® Art. Nr. 518 N, Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland).

Die Beurteilung der Pathomorphologie erfolgte nach den Vorgaben der Untersuchung von menschlichen Spermien aus dem „WHO laboratory manual

for the Examination and processing of human semen” (2010), angepasst an die Erkenntnisse zur Pathomorphologie von Rüdenspermien (Hoffmann, 2003; Dreier, 2010; Günzel-Apel, 2016; Kolster, 2018; Chłopik und Wysokińska, 2020). Eine schematische Darstellung gebräuchlicher pathomorphologischer Veränderungen aufgetauter TG-Rüdenspermien findet sich im Anhang (Abbildung 24). Die Untersuchung orientierte sich am physiologischen Aufbau eines Spermiums, das aus einem Kopf, Mittelstück und Schwanzteil besteht (Weitze, 2001; Schnorr und Kressin, 2006; Günzel-Apel, 2016) und in Abbildung 8 dargestellt ist.

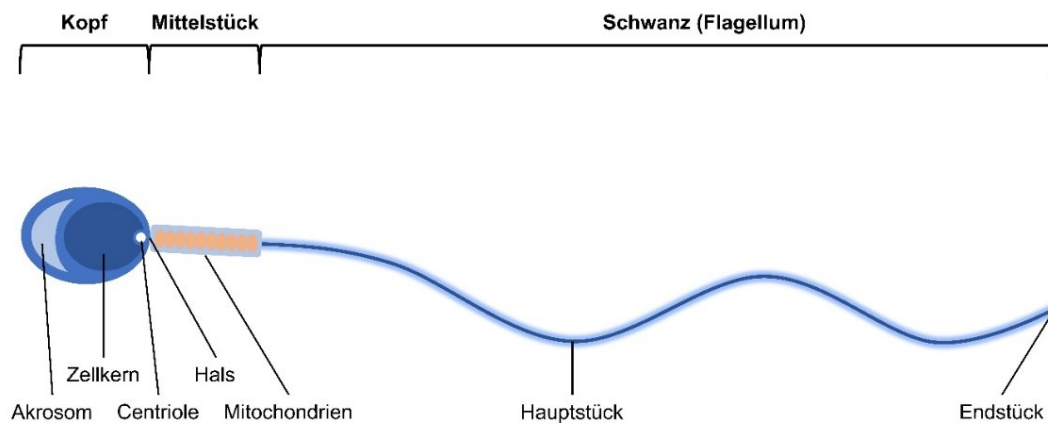


Abbildung 8: Schematischer Aufbau einer physiologischen Samenzelle – eigene Darstellung basierend auf wissenschaftlicher Literatur

Die Länge eines Hundespermiums beträgt circa 60–70 μm (Bartlett, 1962; Schnorr und Kressin, 2006). Ein physiologischer Spermienkopf sollte einen glatten Rand und eine regelmäßige ovale Form besitzen. In diesem Bereich können pathomorphologische Formen wie Makrozephalie oder Mikrozephalie auftreten, bei denen der Kopf vergrößert bzw. verkleinert ist. Auch deformierte, zu runde oder unregelmäßige Kopfformen sind möglich, ebenso wie das Auftreten von Doppelköpfigkeit. Zudem können Vakuolen im Kopf vorkommen, die teils einen großen Teil des Kopfvolumens einnehmen und die Funktionalität beeinträchtigen. Das Mittelstück der Samenzelle sollte eine schmale, regelmäßige Form ohne Knicke besitzen und nicht viel länger als der

Spermienkopf sein. Zu Veränderungen des Mittelstücks zählen Verdickungen, Asymmetrien oder Deformationen. In einigen Fällen kann das Mittelstück sogar gänzlich fehlen.

Anomalien des Schwanzes stellen eine weitere Kategorie morphologischer Veränderungen dar. Dieser kann verkürzt, mehrfach vorhanden oder nicht ausgebildet sein. Auch haarnadelförmige, gebrochene oder stark gebogene Schwänze sowie gewundene Formen oder Doppelschwänzigkeit können auftreten. Schließlich können auch Defekte des Akrosoms auftreten. Es kann fehlen, unvollständig entwickelt sein oder einen zu großen oder zu kleinen Anteil des Kopfes einnehmen. Ein weiteres Kriterium, das Aufschluss über die Qualität und Reife der Spermien geben kann, sind Zytoplasmotropfen.

Beim Spermium werden je nach Ursache primäre, sekundäre und tertiäre Abweichungen unterschieden. Zu den primären Veränderungen zählen Kopf- oder Akrosomdeformationen, para-/retroaxiale Schwanzansätze, Missbildungen des Mittelstücks sowie Doppel- und Mehrfachmissbildungen. Sekundäre Abweichungen umfassen z. B. Kopfkappenablösungen, Halsbrüche, Schwanzformabweichungen, wie Schleifen und Aufrollungen, sowie Plasmotropfen. Zu den Folgen tertiärer Veränderungen zählen auch Kopfkappenablösungen, Schwanzschleifen und Halsbrüche (Busch und Waberski, 2007).

Wenn ein Spermium mehrere Veränderungen aufwies, wurde nur die schwerwiegendste dokumentiert. Daher wurde die Reihenfolge (von schwerwiegend zu weniger schwerwiegend): Halsbrüche – Kopfkappenschäden – Kopfdeformationen – Schwanzveränderungen eingehalten. Innerhalb der Schwanzveränderungen galt die Reihenfolge: Schwanzansatz – Schwanzform – Plasmotropfen (Busch und Waberski, 2007). Die in der Kategorie „Sonstiges/Artefakte“ aufgeführte „eingeschränkte“ Erkennbarkeit der Schwanzenden bezieht sich auf eine moderate Reduktion der Beurteilbarkeit, verbunden mit einem höheren Zeitaufwand zur Beurteilung. Währenddessen umfassen „schlecht“ erkennbare Schwanzenden eine starke bis nicht beurteilbare Beeinträchtigung.

Zusammenfassend wurde die pathomorphologische Beurteilung, wie in Tabelle 5 dargestellt, durchgeführt und die Untersuchungsergebnisse zunächst auf einer Liste dokumentiert und im Anschluss in einer Excel®-

Tabelle digitalisiert. Zur Bewertung der Färbequalität und Beurteilungsfähigkeit wurden ergänzend subjektiv die Parameter Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast erhoben (vgl. Anhang, Tabelle 34)

Tabelle 5: Kriterien zur Untersuchung der Pathomorphologie an aufgetautem TG-Rüdensperma

Kappenveränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • Akrosom nicht vorhanden • Akrosom in Ablösung • Akrosom zu groß/zu klein • Vakuolen
Kopfveränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • Zwergkopf • Riesenkopf • lanzenförmig • birnenförmig • rund • unregelmäßig deformiert • Doppelkopf • abgelöster Kopf
Mittelstück-/ Halsveränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • Halsbruch • Mittelstück deformiert/asymmetrisch • Mittelstück verdickt/schmal
Haupt- und Endstückveränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • Schleifenform • aufgerollt • gebrochen/geknickt • rudimentärer Schwanz
Plasmatropfen	<ul style="list-style-type: none"> • am Mittelstück • am Hauptstück • am Endstück
Farbintensität	<ul style="list-style-type: none"> • blass, blass - mäßig, mäßig, mäßig - gut, gut, gut - intensiv, intensiv
Detailerkennbarkeit	<ul style="list-style-type: none"> • schlecht, schlecht - mäßig, mäßig, mäßig - gut, gut, gut - deutlich, deutlich

Kontrast	<ul style="list-style-type: none"> • schlecht, schlecht - mäßig, mäßig, mäßig - gut, gut, gut - deutlich, deutlich
Sonstiges/Artefakte	<ul style="list-style-type: none"> • viel Pigment • Lufteinschlüsse • Schwanzenden eingeschränkt erkennbar • Schwanzenden schlecht erkennbar • trübes Bild • Kristalle • wellige Schwanzenden

3.6 Lagerung

Zur Beurteilung der Lagerungsstabilität wurden die angefertigten Präparate im Anschluss an den ersten Untersuchungsgang mit einem Eindeckmittel konserviert.

Entsprechend des Handbuchs der WHO (2010) zur Konservierung von Ausstrichen wurden 1–2 Tropfen Entellan® Neu (Art. Nr. 1.07961.0500, Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf die Objektträger pipettiert und vorsichtig ein Deckgläschen (24 x 50 mm #1, Fa. Eprexia, Kalamazoo, Michigan, USA) aufgelegt, sodass keine Lufteinschlüsse entstehen. Im Anschluss wurden die Präparate für circa 30 Minuten waagrecht getrocknet. Bei den mit Formolzitrat-Bengalrosa hergestellten Feuchtpräparaten musste aufgrund des bereits aufgebrachtens Deckgläschens auf eine zusätzliche Konservierung verzichtet werden.

Zwischen den Untersuchungen wurden die Präparate in einem Rotilabo®-Objektträgerkasten (Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in einem dunklen Schrank in der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, trocken und bei Raumtemperatur gelagert.

3.7 Wiederholungsuntersuchung

Die Wiederholungsuntersuchungen zur Beurteilung der Lagerungsstabilität wurden nach zuvor festgelegten Abständen durchgeführt. Im Anschluss an die initiale Untersuchung (= t_0) fanden sie 24 Stunden später (= t_1), nach sieben

Tagen (= t_2) sowie nach drei Monaten (= t_3) statt. Nach diesen Zeitabständen wurden die pathomorphologischen Parameter erneut erhoben und auf Veränderungen im Vergleich zur Erstuntersuchung geachtet. Ziel war es eine Aussage über die Möglichkeit zur Archivierung der unterschiedlich gefärbten Ausstriche abhängig von der Färbemethode zu erhalten.

Die gesamte Analyse umfasste aufgrund der vier Untersuchungszeitpunkte pro Färbemethode 160 Auswertungsvorgänge. Über alle Färbungen hinweg wurden an 360 hergestellten Präparaten 960 Beurteilungen erhoben. Zunächst erfolgte die Dokumentation der Ergebnisse manuell auf einer Liste und wurde im Anschluss in eine Excel®-Tabelle transferiert.

3.8 Zeitlicher und finanzieller Aufwand

Es wurden die Kosten je angefertigtes Präparat berechnet und der zeitliche Aufwand erfasst. Zur Kalkulation der finanziellen Ausgaben wurden die Kosten der Verbrauchsmaterialien berücksichtigt (Preise zum Stichtag 28.10.2024, online recherchiert).

Auf Grundlage des Stundenlohns einer/s Tiermedizinischen Fachangestellten wurden die Kosten des zeitlichen Aufwands mit einbezogen. Grundausstattung, die zu einem Labor gehört, wie Mikroskop, Pipetten und Glasküvetten, wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Die angenommenen Verbrauchsmengen pro Färbvorgang wurden entsprechend der Herstellerangaben übernommen. Zur Bewertung des zeitlichen Aufwands wurden die Herstellungs- und Auswertungszeiten der Präparate bei den ersten zehn Samenproben einmalig zu t_0 dokumentiert. Es wurde angenommen, dass die Samenprobe bereits aufgetaut in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde, die benötigten Färbelösungen in geeigneten Gefäßen bereitstehen und die Pipetten voreingestellt sind. Die Zeit zur Herstellung der Präparate, einschließlich eventueller Warte- und Trocknungszeiten, sowie die Zeit für die mäanderförmige Auswertung von 200 Spermien wurden erfasst. Unter Berücksichtigung der wirtschaftlichen Aspekte einer Tierarztpraxis sollten die Ergebnisse als zusätzliche Faktoren in die Auswahl einer geeigneten Färbemethode einfließen.

3.9 Spermatologische CASA-Untersuchung

Zum Abgleich der subjektiv erhobenen Ergebnisse wurden die Ausstriche einer Samenzellprobe parallel mittels AndroVision® (Art. Nr. 12500/0000, Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland), einer CASA-Software mit PC und Monitor, untersucht. Dieses System ist an ein Phasenkontrastmikroskop (Modell BX41, Fa. Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland) angeschlossen und eignet sich laut Herstellerangaben u. a. zur automatischen Analyse der Spermienmorphologie. Ermöglicht wird die Beurteilung durch das zusätzliche Softwaremodul „Morphologie & Morphometrie“ (Art. Nr. 12500/1300, Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland).

Die Zuordnung pathologischer Abweichungen erfolgt anhand der Bestimmung der Länge und Breite des Spermienkopfes, Kopfform sowie der Mittelstück-Asymmetrie anhand des Ansatzwinkels des Schwanzes am Kopf einer Samenzelle. Es können im Softwaremodul folgende Kategorien erfasst werden: intakt, Kopfdeformation, Akrosomdefekt, Halsbruch, Mittelstückdefekt, geknickter Schwanz, aufgerollter Schwanz, proximale Plasmatropfen, distale Plasmatropfen und Fremdpartikel. Schwanzdefekte und Pathologien, die unabhängig von der Kopfform, -größe oder des Ansatzwinkels des Schwanzes an der Samenzelle sind, können durch das System nicht automatisch erfasst werden und erfordern eine manuelle Zuteilung zu den zuvor genannten Kategorien. Daher können automatisiert nur die Kategorien „intakte Samenzelle“, „Kopfdeformation“ sowie „Mittelstückdefekt“ zugeordnet werden. Zusätzlich ist es möglich die durch die Software erfassten Spermienbilder und deren Klassifizierungen im Anschluss an die Analyse einzeln zu korrigieren.

Nach Herstellerangaben ist das System für Bullen-, Eber- und Hengstsperma in verschiedenen Färbemethoden kalibriert. Für Rüdenspermien besteht keine offizielle Validierung (Fa. Minitüb GmbH, 2017). Nach schriftlichem Austausch mit der Herstellerfirma Minitüb GmbH eignen sich für die morphologische Beurteilung von Samenzellen mit AndroVision® die Färbungen mit Spermac®, Formolzitrat, Eosin-Nigrosin, Farelly oder Diff-Quick®. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine explorative Evaluierung durchgeführt, um zu prüfen, ob AndroVision® sich auch für die Analyse von TG-Rüdenspermien

eignet und wie sich die Ergebnisse von der subjektiven, manuellen Untersuchung unterscheiden.

Es wurde zufällig Probe 4 (Rasse Border Collie) ausgewählt und die morphologischen Parameter an den bereits zuvor verwendeten sechs Färbemethoden (Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa) erhoben. Zur Sicherung der Vergleichbarkeit mit den manuellen Auswertungen, wurde die verwendete Probe mit dem gleichen Verdüner (Uppsala Equex-2 System) eingefroren und dasselbe Auftauprotokoll (vgl. 3.2.1) durchlaufen. Die Untersuchung erfolgte einmalig zu t_0 ohne Stresstest.

Gemäß der Empfehlung der Firma Minitüb GmbH wurden als Klassifizierungseinstellung vor den Testungen die in der Software hinterlegten Schwellenwerte, wie in Tabelle 6 beschrieben, ausgewählt. Zusätzlich wurden in den Systemeinstellungen Sensibilitäts-Parameter so gewählt, dass der höchstmögliche Kontrast der Samenzellen im Mikroskop sichtbar war. Die Ergebnisse der Analysen wurden ohne eine manuelle Nachklassifizierung oder Korrektur innerhalb jeder Färbemethode in einer Tabelle aufgelistet und als PDF-Datei exportiert.

Tabelle 6: Schwellenwerte der Klassifizierungseinstellungen entsprechend WHO-Klassifizierung im AndroVision®-Softwaremodul „Morphologie & Morphometrie“

Merkmal	Minimum Anomalie	Minimum normal	Maximum normal	Maximum Anomalie
Länge (in μm)	5	6	8	10
Breite (in μm)	2	3	5	7
Rundheit (Verhältnis Länge zu Breite)	1	1,5	2,5	3

3.10 Statistische Auswertung

Die Verwaltung und grafische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Excel® (Microsoft Corporation, 2024). Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgruppe

Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leitung: PD Dr. Kathrin Büttner) durchgeführt.

Die statistisch signifikanten Auswirkungen der Einflussfaktoren Tiefgefriervorgang, Färbemethode, Lagerungsdauer und Stresstest auf die Häufigkeit pathomorphologischer Spermienveränderungen wurden ermittelt. Dies erfolgte unter Anwendung statistischer Analyseverfahren aus dem SAS®-Statistikprogrammpaket (SAS® Institute Inc., 2024).

Es wurden die folgenden vier Fragestellungen statistisch untersucht:

1. Gibt es Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Eingangsuntersuchung vor dem Einfrieren (t_{-1}) und den Ergebnissen nach der Färbung ohne Stresstest zu t_0 ?
2. Weichen die Ergebnisse der verschiedenen Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest voneinander ab?
3. Gibt es Unterschiede in der Lagerungsstabilität der Proben zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Färbemethode ohne Stresstest?
4. Unterscheiden sich die Ergebnisse je nach Stresstest innerhalb einer Färbemethode zu t_0 ?

Zur statistischen Darstellung der Daten wurden verschiedene Kennzahlen ermittelt und in Tabellenform exportiert. Hierzu zählten das arithmetische Mittel (\bar{x}), die Standardabweichung (SD), die Spannweite (R) und der Median (Md). Wenn bei den Beurteilungskriterien keine Normalverteilung gegeben war, wurde ein nichtparametrischer Test zur p-Wert-Bestimmung verwendet. In den betreffenden Fällen wurden zur Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse die Daten Median, Minimum und Maximum herangezogen.

Die Häufigkeitsverteilungen wurden mittels der Prozedur FREQ erstellt. Für die Darstellung absoluter Werte, Prävalenzen und Differenzen kam die Prozedur MEANS zum Einsatz. Zur Visualisierung absoluter Zahlen und Prävalenzen wurden Boxplots angefertigt. Bei der deskriptiven Darstellung erfolgte die Angabe des arithmetischen Mittels und der Standardabweichung üblicherweise mit zwei Nachkommastellen.

Bei Frage 1 wurde eine verbundene Stichprobe untersucht. Das spermatologische Labor der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und

Neugeborenenkunde erhob in der Eingangsuntersuchung vor Tiefgefrierung mittels Eosin-Färbung verschiedene Samenzellen-Parameter: Zwergkopf, unregelmäßig deformiert, Halsbruch, Schleifenform, aufgerollt, gebrochen/geknickter Schwanz, Plasmotropfen am Mittelstück, Plasmotropfen am Endstück und abgelöster Kopf.

Um den Einfluss der Kryokonservierung auf die pathomorphologische Auswertung der Samenzellen zu ermitteln, wurden die durchschnittlichen Ergebnisse der Eingangsuntersuchungen (t_1 , Eosin-Färbung) mit den Mittelwerten aller Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest verglichen. Bei der Eingangsuntersuchung wurden regelmäßig die Parameter „Schleifenform“, „geknickter Schwanz“, „abgelöster Kopf“ und „Plasmotropfen“ erfasst und zusätzliche Auffälligkeiten bei Bedarf manuell ergänzt. Die statistische Auswertung konzentrierte sich aufgrund der Vielzahl an Messwerten auf die Parameter „Schleifenform“, „gebrochen/geknickter Schwanz“ und „abgelöster Kopf“, da diese höhere Prävalenzen aufwiesen. Zur Analyse der Ergebnisse wurden die Differenzen zwischen den beiden Messzeitpunkten auf Normalverteilung geprüft. Hierfür kamen der Shapiro-Wilk-, der Kolmogorow-Smirnow-, der Cramér-von-Mises- und der Anderson-Darling-Test zum Einsatz. Bei normalverteilten Differenzen erfolgte die Auswertung mittels gepaartem t-Test. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewendet.

Für Fragestellung 2 wurden bei ausreichender Prävalenz und Verteilung der Daten Tests auf Vorliegen einer Normalverteilung durchgeführt. Da keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Auswertung der betreffenden Parameter mittels Friedman-Test. Um signifikante Unterschiede zu identifizieren, wurden anschließend paarweise Vergleiche mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Nach der Adjustierung der sich daraus ergebenden p-Werte wurde geprüft, ob signifikante Paarvergleiche bestehen blieben.

Die Auswertung von Frage 3 konzentrierte sich aufgrund der hohen Anzahl an Parametern und Kombinationsmöglichkeiten auf vier Merkmale mit hohen Prävalenzen: „Halsbruch“, „Schleifenform“, „aufgerollt“ und „rudimentärer Schwanz“. Für die Analyse wurde der Friedman-Test genutzt, mit Messwiederholung bezogen auf die Zeit. Die Wahl dieses nichtparametrischen Verfahrens erfolgte, da bei 19 von 24 Konstellationen „Pathomorphologie-

Parameter zu Färbemethode" keine Normalverteilung vorlag - eine Voraussetzung für die einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung. Durch zahlreiche Null-Werte in einigen pathomorphologischen Parametern war eine Datentransformation schwierig umzusetzen. Daher wurden die untransformierten Prävalenzen mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert. Bei signifikanten Ergebnissen wurden multiple Paarvergleiche durchgeführt mit Bonferroni-Korrektur zur p-Wert-Adjustierung. Die ordinal skalierten Merkmale Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast wurden ebenfalls mittels Friedman-Test mit Messwiederholung analysiert. Auch hier wurden bei signifikanten Resultaten multiple Paarvergleiche mit Bonferroni-korrigierten p-Werten durchgeführt.

Frage 4 wurde auf drei Parameter begrenzt: „Schleifenform“, „rudimentärer Schwanz“ und „abgelöster Kopf“. Diese Einschränkung erfolgte aufgrund der Vielzahl an Merkmalen und Kombinationsmöglichkeiten. Da bei 15 von 18 Konstellationen „Pathomorphologie-Parameter zu Färbemethode" keine Normalverteilung der Residuen vorlag, wurde der Friedman-Test als nichtparametrisches Verfahren mit Messwiederholung bezogen auf den Stresstest eingesetzt. Dies ersetzte die einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung, deren Voraussetzungen nicht erfüllt waren. Bei signifikanten Ergebnissen des Friedman-Tests wurden multiple Paarvergleiche mit Bonferroni-Korrektur zur Adjustierung der p-Werte durchgeführt.

Analog zu Frage 3 wurden die Merkmale Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast ebenfalls mittels Friedman-Test mit Messwiederholung bezogen auf die Zeit analysiert. Auch hier wurden bei signifikanten Resultaten multiple Paarvergleiche mit Bonferroni-korrigierten p-Werten durchgeführt.

Die grafische und tabellarische Darstellung der statistischen Daten erfolgte mit Microsoft® Excel® (Microsoft Corporation, 2024). Für alle Berechnungen galt $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant und $p \leq 0,01$ als hochsignifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Wirtschaftlicher Aufwand

4.1.1 Zeitlicher Aufwand

Zur vergleichenden Analyse des Zeitaufwands der Färbemethoden wurde die mittlere Herstellungs- und Auswertungszeit pro Präparat an den ersten zehn Samenzellproben ermittelt. Im Anschluss wurden die Herstellungs- und Auswertungszeiten addiert, um die Gesamtzeiten zu ermitteln.

Der arithmetische Mittelwert der Anfertigung aller für die Färbungen mit Diff-Quick®, Hemacolor® und Spermac® geforderten Nativausstriche lag bei 0,19 Minuten (Min.) mit einer Standardabweichung von $\pm 0,02$ Min. Die Trocknung hat im Mittel $0,56 \pm 0,05$ Min. beansprucht.

Zur Anfertigung der Eosin-Präparate wurden durchschnittlich $0,33 \pm 0,03$ Min. mit einer anschließenden Trocknungszeit von $2,84 \pm 0,13$ Min. benötigt. Bei der Eosin-Nigrosin-Färbung setzte sich die mittlere Herstellungszeit aus $0,43 \pm 0,05$ Min. sowie $3,35 \pm 0,26$ Min. für die Trocknung zusammen. Bei den beiden zuvor genannten Färbungen ist eine Vitalitätsbeurteilung möglich. Diese erforderte im Fall von Eosin eine zusätzliche Untersuchungszeit von durchschnittlich $5,29 \pm 0,22$ Min. bzw. $5,45 \pm 0,28$ Min. bei der Eosin-Nigrosin-Färbung.

Der Färbeprozess in der Diff-Quick®-Färbung lag in der mittleren Herstellungszeit bei $0,84 \pm 0,06$ Min. mit einer Trocknungszeit von $3,99 \pm 0,18$ Min. Bedingt durch den ähnlichen Färbevorgang lagen die Zeiten in der Hemacolor®-Färbung in ähnlichen Bereichen mit einer durchschnittlichen Färbedauer von $1,04 \pm 0,08$ Min. und einer Trocknungszeit von $4,03 \pm 0,12$ Min.

Insgesamt ergab sich für die Spermac®-Färbung im Mittel eine Herstellungszeit von $4,46 \pm 0,05$ Min. sowie eine Trocknungszeit von $20 \pm 0,00$ Min.

Als Nasspräparat wurde bei der Anfärbung mit Formolzitrat-Bengalrosa das Spermien-Farbgemisch auf einen Objektträger pipettiert und ein Deckgläschen aufgelegt. Dieser Vorgang dauerte durchschnittlich $0,53 \pm 0,03$ Min. Statt einer Trocknung erfolgte eine Lagerung von 30 Minuten zur

Abflachung der Spermienköpfe in der Suspension. Aus eigener Erfahrung im Rahmen dieser Arbeit war diese Zeitspanne bei Rüdenspermien nicht ausreichend und sollte mindestens eine Stunde betragen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen des dokumentierten Arbeitsaufwands je Färbemethode sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Arbeitsaufwand für die Färbung kryokonservierter Samenzellproben vom Rüden je Präparat, Gesamtzeiten aufsteigend sortiert mit Standardabweichung (\pm), die Herstellung umfasst Anfertigung des Nativpräparats sowie Trocknungs- und Wartezeiten

Färbemethode	Dauer je gefärbter Objektträger (Minuten)		
	Herstellung	Auswertung	Gesamt
Eosin	3,17 \pm 0,14	4,98 \pm 0,29	8,15 \pm 0,36 (mit Vitalitätsbeurteilung +5,29 \pm 0,22)
Diff-Quick®	5,59 \pm 0,17	4,66 \pm 0,35	10,24 \pm 0,38
Hemacolor®	5,81 \pm 0,12	4,65 \pm 0,31	10,46 \pm 0,32
Eosin-Nigrosin	3,77 \pm 0,27	6,77 \pm 0,43	10,54 \pm 0,5 (mit Vitalitätsbeurteilung +5,45 \pm 0,28)
Spermac®	25,2 \pm 0,06	4,71 \pm 0,35	29,91 \pm 0,33
Formolzitrat-Bengalrosa	30,53 \pm 0,03	5,47 \pm 0,32	36 \pm 0,33

4.1.2 Finanzieller Aufwand

Die Kostenanalyse der sechs Färbemethoden wurde unter Berücksichtigung der direkten Materialkosten durchgeführt und je Objektträger kalkuliert. Die Verbrauchsmengen pro Färbevorgang wurden für die Färbemethoden Diff-Quick®, Hemacolor® und Spermac® entsprechend der Herstellerangaben übernommen.

Die kommerziell erhältlichen Farblösungen für die Eosin- und Eosin-Nigrosin-Färbung, spezifisch Eosin G und Nigrosin, wiesen einen Kostenaufwand von 12,85 € pro 50 ml auf. Das Färbeset Diff-Quick® war für 74,60 € erhältlich und enthielt drei Farbreagenzien zu je 500 ml, die für 100–250 Vorgänge ausreichen. Daraus ergibt sich ein Verbrauch von 2–5 ml je Färbevorgang und Farblösung. Bei der Anfärbung mit Spermac®, bestehend aus vier Färbelösungen zu je 50 ml zum Preis von 156,60 €, wurden 0,25 ml pro Reagenz und Objektträger benötigt. Zur Durchführung der Hemacolor®-Methode, die drei Reagenzien mit je 100 ml Inhalt zum Preis von 106,00 € für 50–200 Anwendungen umfasste, schwankt der Verbrauch je Farblösung und Färbevorgang im Bereich von 0,5 bis 2 ml. Die für die Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa benötigte Lösung aus Tri-Natriumzitrat-Dihydrat, destilliertem Wasser, Formaldehydlösung und Bengalrosa kostete 0,01 € für die benötigte Menge von 300 µl. Tabelle 8 präsentiert eine Kostenaufstellung der sechs untersuchten Färbemethoden.

Tabelle 8: Materialkosten gefärbter Präparate je Objektträger, basierend auf Verkaufspreisen und Verbrauchsmengen, Gesamtkosten in Euro (€) aufsteigend sortiert

Färbe- methode	verwendete Materialien	Verbrauchs- menge	Material- kosten	Gesamt- Materialkosten
Eosin	Eosin-Lösung	20 µl	0,01 €	0,13 €
	Objektträger	2	0,08 €	
	Pipettenspitzen	2	0,04 €	
Formolzitrat- Bengalrosa	Formolzitrat- Bengalrosa- Lösung	300 µl	0,01 €	
	Objektträger	1	0,04 €	

Ergebnisse

	Pipettenspitzen	2	0,04 €	
	Immersionsöl	50 µl	0,10 €	
	Deckglas	1	0,05 €	0,24 €
Eosin-Nigrosin	Eosin-Lösung	10 µl	0,01 €	
	Nigrosin-Lösung	20 µl	0,01 €	
	Objektträger	2	0,08 €	
	Pipettenspitzen	3	0,06 €	
	Immersionsöl	50 µl	0,10 €	0,26 €
Diff-Quick®	Diff-Quick®-Färbelösung	3 x 2–5 ml	0,30–0,75 €	
	Objektträger	2	0,08 €	
	Pipettenspitzen	1	0,02 €	
	Aqua dest.	50 ml	0,06 €	0,46–0,91 €
Hemacolor®	Hemacolor®-Färbelösung	4 x 0,5–2 ml	0,53–2,12 €	
	Objektträger	2	0,08 €	
	Pipettenspitzen	1	0,02 €	
	Aqua dest.	50 ml	0,06 €	0,69–2,28 €
Spermac®	Spermac®-Färbelösung	4 x 0,25 ml	0,78 €	
	Objektträger	2	0,08 €	
	Pipettenspitzen	1	0,02 €	
	Immersionsöl	50 µl	0,10 €	
	Aqua dest.	50 ml	0,06 €	1,04 €

Basierend auf einem mittleren monatlichen Bruttogehalt von 2.200 € bei einer 40-Stunden-Woche und 52 Arbeitswochen pro Jahr (Wemmers und Scholz, 2022) wurde ein durchschnittlicher Stundenlohn von 12,69 € ermittelt. Das entspricht Personalkosten von 21,15 Cent pro Minute. Die Gesamtkosten pro Färbemethode und Objektträger wurden durch Addition der Materialkosten und des Produkts aus dem arithmetischen Mittel der Arbeitszeit sowie dem Stundenlohn berechnet und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Gesamtkosten Herstellung und Auswertung je gefärbter Objektträger unter Berücksichtigung der Materialkosten und des Arbeitsentgelts der auswertenden Fachkraft, aufsteigend sortiert

Färbemethode	Herstellungszeit je Objektträger	Materialkosten je Objektträger	Gesamtkosten Herstellung und Auswertung
Eosin	8,15 Min.	0,13 €	1,85 € (Vitalitäts-Auswertung +1,12 €)
Eosin-Nigrosin	10,54 Min.	0,26 €	2,49 € (Vitalitäts-Auswertung +1,15 €)
Diff-Quick®	10,24 Min.	0,46–0,91 €	2,63–3,08 €
Hemacolor®	10,46 Min.	0,69–2,28 €	2,90–4,49 €
Spermac®	29,91 Min.	1,04 €	7,37 €
Formolzitrat-Bengalrosa	36 Min.	0,24 €	7,85 €

4.2 Färbemethoden

Für die statistische Auswertung der Färbequalität der sechs Färbemethoden wurden die qualitativen Bewertungen der drei Parameter „Farbintensität“, „Detailerkennbarkeit“ und „Kontrast“ in quantitative Werte umgewandelt. Dadurch wurde „blass“ oder „schlecht“ dem Wert 1 und „intensiv“ oder „deutlich“ dem Wert 7 zugeordnet. Da es sich bei den Qualitätsmerkmalen um ordinal skalierte Parameter handelt, ist eine Auswertung der Messungen anhand einer Mittelwertbildung nicht sinnvoll. Es wurden stattdessen die Zentralwerte zur Beschreibung verwendet. Die zu t_{0-3} erhobenen Mediane für diese Merkmale, einschließlich der Ergebnisse der drei Stresstests, sowie die mediane Gesamt-Färbequalität (Md FQ) sind in Tabelle 10 dargestellt.

Es zeigte sich, dass alle Färbemethoden, einschließlich des Nasspräparats, zu den vier Zeitpunkten auswertbar waren. Über alle Auswertungszeitpunkte

Ergebnisse

und Stresstests hinweg war der Median der Gesamt-Färbequalität in der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa am höchsten (Md FQ = 6). Bei reiner Betrachtung des t_0 wies die Spermac®-Färbung mit 7 den höchsten Wert auf.

Tabelle 10: Auswertung von Farbintensität (Fi), Detailerkennbarkeit (De), Kontrast (K) und der medianen Gesamt-Färbequalität (Md FQ) der sechs Färbemethoden mit und ohne Stresstest über die Auswertungszeitpunkte (t_{0-3}) hinweg, absteigend aufgeführte Gesamt-Färbequalität

Färbe- methode	Parameter	Median	Median	Median	Median	Median
		t_{0-3}	t_0	t_1	t_2	t_3
FB	Fi	6	6,5	6	6	6
	De	5	6	6	5	5
	K	6	6	6	5	5
	Md FQ	6	6	6	6	5
S	Fi	5	6	6	5	4
	De	6	7	6	5	5
	K	5	6,5	6	5	4
	Md FQ	5	7	6	5	5
DQ	Fi	5	5	5	5	5
	De	5	5	5	5	5
	K	5	6	5	5	5
	Md FQ	5	5	5	5	5
E	Fi	5	5	5	5	5
	De	5	5	5	5	5
	K	5	5	5	5	5
	Md FQ	5	5	5	5	5
H	Fi	5	5	4,5	5	4
	De	5	5	5	5	4,5
	K	5	5	4	4,5	4
	Md FQ	5	5	5	5	4
EN	Fi	5	5	5	5	4
	De	3	4	3	3	3

Ergebnisse

	K	3	4	3	3	3
	Md FQ	3	5	3	3	3

Abkürzung der Färbemethoden: E = Eosin, EN = Eosin-Nigrosin, DQ = Diff-Quick®, H = Hemacolor®, S = Spermac®, FB = Formolzitrat-Bengalrosa

Zur statistischen Auswertung der Frage, ob sich die Ergebnisse der Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest unterscheiden, wurden hinsichtlich der Färbequalität die drei Parameter Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast berücksichtigt. Der Friedman-Test ergab einen hochsignifikanten Unterschied für alle drei Parameter (p jeweils $< 0,0001$). Zur Durchführung multipler Paarvergleiche erfolgte eine p -Wert-Adjustierung. Nach dieser fand sich für die Farbintensität kein signifikanter Unterschied mehr. Hingegen zeigten die Paarvergleiche für die Detailerkennbarkeit und den Kontrast signifikante Abweichungen zwischen mehreren Färbemethoden und werden in den folgenden Unterkapiteln detailliert aufgeführt.

Neben den Qualitätskriterien wurden die in den sechs Färbemethoden erhobenen pathomorphologischen Merkmale zu t_0 ohne Stresstest auf statistische Unterschiede hin untersucht. Da bei den meisten Beurteilungskriterien eine Normalverteilung nicht gegeben war, wurde ein nichtparametrischer Test zur p -Wert-Bestimmung verwendet. Lediglich die drei Merkmale „Schleifenform“, „aufgerollt“ und „abgelöster Kopf“ waren annähernd normalverteilt und werden daher an gegebener Stelle ergänzend mit Mittelwerten beschrieben. In Tabelle 11 sind die Parameter dargestellt, die über eine ausreichende Prävalenz und Datenverteilung für eine statistische Auswertung verfügten. Statistisch signifikante p -Werte, bei denen nach der Bonferroni-Korrektur keine Paarvergleiche mit einem Ergebnis $\leq 0,05$ übrigblieben, sind in der Tabelle mit einem Sternchen (*) markiert.

Ergebnisse

Tabelle 11: Gesamtanteile und Pathomorphologie-Merkmale (Mediane in %) je Färbemethode zu t_0 ohne Stresstest, statistische Signifikanz (p-Wert) der statistisch ausgewerteten Parameter (p-Werte ohne signifikante Paarvergleiche nach Bonferroni-Korrektur mit * markiert, Fett = $p \leq 0,05$)

Pathomorpho- logisches Merkmal	E	EN	DQ	H	S	FB	p-Wert
Gesamtanteil morphologische Abweichungen	18,75	16,25	13,25	17,75	20,25	22,25	0,002*
Akrosom nicht vorhanden	0	0	0	0	0	0	
Akrosom in Ablösung	0	0	0	0	0,25	0	
Akrosom zu groß/zu klein	0	0	0	0	0	0	
Vakuolen	0	0	0	0	0	0	
Zwergkopf	0	0	0	0	0	0	
Riesenkopf	0,5	0,5	0	0	0,75	0	0,008*
lanzenförmig	0	0	0	0	0	2,25	
birnenförmig	0	0	0	0	0	0	
rund	0	0	0	0	0	0	
unregelmäßig deformiert	0	0	0	0	0	0	
Doppelkopf	0	0	0	0	0	0	
Halsbruch	1	1	0,75	0,25	0	1	0,108
Mittelstück deformiert/ asymmetrisch	0	0	0	0	0	0	
Mittelstück verdickt/schmal	0	0	0	0	0,25	0	0,715
Schleifenform	5,25	6,75	5,5	5	8,75	8,25	0,003

Ergebnisse

aufgerollt	0,75	0	0,5	0,25	1	0,5	0,488
gebrochen/ geknickt	1,5	0,5	1	1,25	1	0,25	0,454
rudimentärer Schwanz	3	3,25	4	3	2,5	1	0,005
Plasmatropfen am Mittelstück	0	0	0	0	0	0	
Plasmatropfen am Hauptstück	0	0	0	0	0	0	
Plasmatropfen am Endstück	0	0	0	0	0	0	
abgelöster Kopf	1	1	0,5	1	1,5	1	0,19

Abkürzung der Färbemethoden: E = Eosin, EN = Eosin-Nigrosin, DQ = Diff-Quick®, H = Hemacolor®, S = Spermac®, FB = Formolzitrat-Bengalrosa

4.2.1 Eosin

Die Anfärbung mit Eosin wies im Median in allen Qualitätskriterien gute Werte auf und war zu jedem Zeitpunkt auswertbar. In 6 der 40 hergestellten Präparate stellten sich die Schwanzenden der Samenzellen schlecht erkennbar dar (Abbildung 9). Zu den Besonderheiten zählten jeweils einmalig Kristallbildung, Lufteinschlüsse und wellige Schwanzenden sowie in vier Fällen gestückelte Schwänze. Diese Auffälligkeiten wurden als Artefaktbildung gewertet.

Im Verlauf der dreimonatigen Lagerung zeigte sich hinsichtlich des Kontrasts ein gleichbleibender Median von 5 (Tabelle 10). Auch die Farbintensität und die Detailerkennbarkeit wiesen zu den vier Auswertungszeitpunkten mediane Werte von 5 auf und waren nur geringfügigen Schwankungen ohne eine eindeutige Tendenz unterworfen. Die statistische Auswertung zu t_0 ohne Stresstest zeigte eine signifikante Abweichung der Detailerkennbarkeit zwischen den Färbemethoden Eosin und Spermac® sowie Eosin und Formolzitrat-Bengalrosa jeweils mit einem p-Wert von 0,029.

In der pathomorphologischen Beurteilung der mit Eosin gefärbten Präparate fand sich zu t_0 mit einem Zentralwert von 1,5 % der höchste Anteil Samenzellen mit gebrochenen oder geknickten Schwänzen, während sich der

mediane Anteil in den anderen Färbemethoden im Bereich von 0,25–1,25 % bewegte (Tabelle 11). Insgesamt lag der Anteil aller pathomorphologischer Veränderungen bei der Eosin-Färbung im Median bei 18,75 %. Bei der statistischen Analyse der Gesamtanteile aller Pathologien der sechs Färbemethoden zu t_0 ergab sich zunächst ein p-Wert von 0,002. Nach der Bonferroni-Korrektur konnte jedoch kein signifikanter Paarvergleich mehr gefunden werden.



Abbildung 9: Eosin-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung mit Markierung der schlecht erkennbaren Schwanzenden

4.2.2 Eosin-Nigrosin

Die 80 mit Eosin-Nigrosin angefärbten Objektträger waren zu allen Zeitpunkten pathomorphologisch auswertbar. Die Farbintensität hatte mit einem medianen Wert von 5 über alle Auswertungszeitpunkte hinweg die höchste Ausprägung der drei Qualitätskriterien. Insgesamt offenbarte die Eosin-Nigrosin-Färbung mit einem Median von 3 in der Gesamt-Färbequalität jedoch im Vergleich zu den anderen fünf Färbemethoden die schlechteste Färbequalität mit abnehmender Tendenz im Verlauf der Wiederholungsuntersuchungen. Dadurch war die Pathomorphologie trotz der 1000-fachen Vergrößerung in einigen Präparaten nur mit höherem

Zeitaufwand beurteilbar. Es wurden im Rahmen aller Untersuchungsvorgänge bei den sonstigen Auffälligkeiten drei Merkmale mit erhöhter Prävalenz identifiziert: viel Pigment ($n = 11$, Abbildung 10), eine eingeschränkte Erkennbarkeit der Schwanzenden ($n = 30$) und eine schlechte Erkennbarkeit der Schwanzenden ($n = 36$).

In der statistischen Auswertung zeigten sich signifikante Unterschiede der Detailerkennbarkeit zu t_0 ohne Stresstest zwischen den Färbemethoden Eosin-Nigrosin und Spermac® bzw. Formolzitrat-Bengalrosa. Auch das Qualitätsmerkmal Kontrast der Eosin-Nigrosin-Färbung wich zu t_0 ohne Stresstest signifikant von mehreren Färbemethoden ab. Das betraf die Färbungen mit Diff-Quick®, Spermac® und Formolzitrat-Bengalrosa mit einem p-Wert von jeweils 0,029.

Bei der Auswertung der mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparate fiel mit 3,65 % ein erhöhter mittlerer Anteil von Samenzellen mit rudimentärem Schwanz auf (arithmetischer Mittelwert 3,11 %). Die statistische Auswertung dieses Merkmals zeigte im multiplen Paarvergleich eine signifikante Abweichung im Vergleich zur Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa mit einem Anteil von 0,85 % ($p = 0,029$, Tabelle 11). Bezogen auf den Gesamtanteil pathomorphologischer Spermien lag der Median mit 16,25 % in dieser Färbemethode verglichen mit den anderen Färbemethoden an zweitniedrigster Stelle.

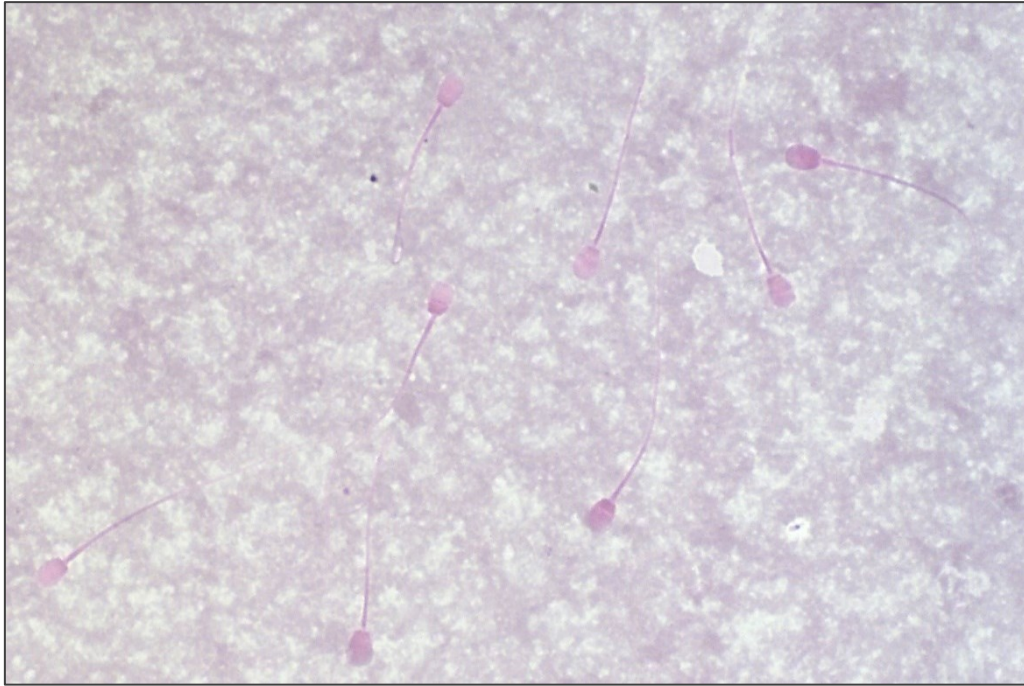


Abbildung 10: Eosin-Nigrosin-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl, viel Pigment mit eingeschränkter Erkennbarkeit der Schwanzenden

4.2.3 Diff-Quick®

Zu jedem Zeitpunkt waren die 40 mit Diff-Quick® angefärbten Präparate auswertbar. Insgesamt wiesen die Parameter Farbtintensität, Detailerkennbarkeit, Kontrast und Gesamt-Färbequalität im Verlauf der Lagerung fast ausschließlich Mediane in Höhe von 5 auf. Lediglich der mediane Kontrast zum ersten Auswertungszeitpunkt t_0 lag mit 6 etwas höher (Tabelle 10). Die statistische Auswertung des Kontrasts zu t_0 ohne Stresstest ergab einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Färbung mit Eosin-Nigrosin mit einem p-Wert von 0,029.

In den pathomorphologischen Untersuchungen zeigten sich zunächst hochsignifikante Abweichungen beim Anteil schleifenförmiger Spermischwänze. Der Median lag in der Diff-Quick®-Färbung mit 5,5 % deutlich niedriger als der bei der Anfärbung mit Spermac® mit 8,75 % (p-Wert nach Bonferroni-Korrektur = 0,029). Das Merkmal „abgelöster Kopf“ (Median = 0,5 %) wurde in dieser Färbung am seltensten identifiziert. Zudem fand sich bei den mit Diff-Quick® gefärbten Objektträgern der höchste Zentralwert der

Ausprägung rudimentärer Schwänze (4 %) im Vergleich zu den anderen fünf Färbemethoden (Tabelle 11). Bei der Beurteilung der Präparate zeigten sich in 15 Fällen wellige Spermenschwänze sowie in 14 Fällen Pigmentansammlungen, die teilweise gleichzeitig ausgeprägt waren (Abbildung 11). Die Diff-Quick®-Färbung wies bezogen auf den gesamten Anteil pathomorphologischer Samenzellen mit einem Median von 13,75 % den niedrigsten aller Färbemethoden auf.

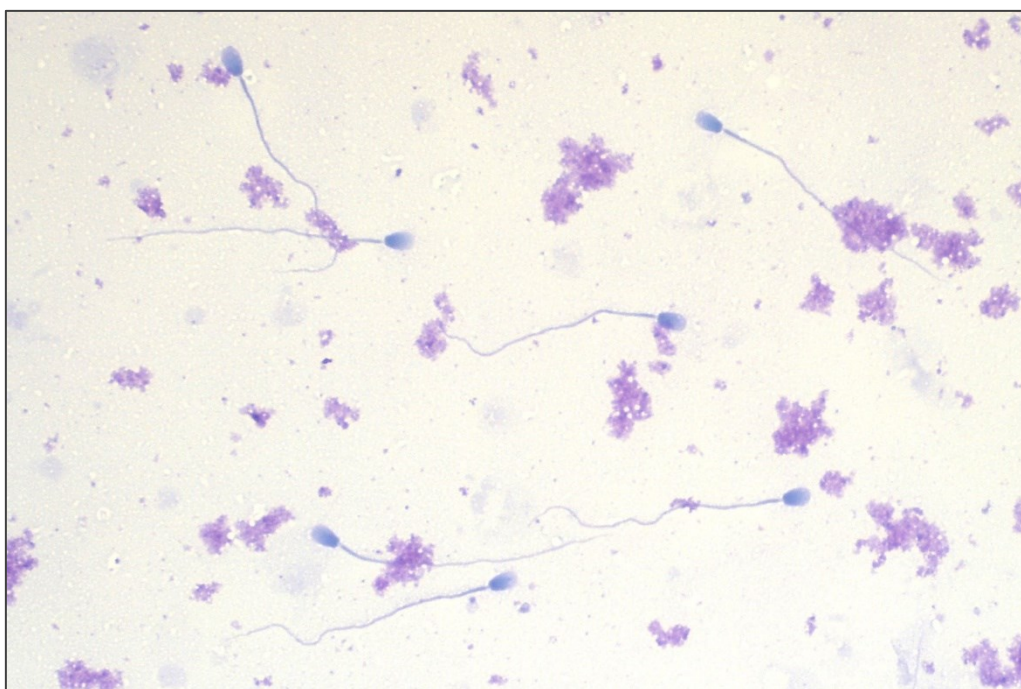


Abbildung 11: Diff-Quick®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung, wellige Schwänze und Pigmentnester

4.2.4 Hemacolor®

Alle 40 mit Hemacolor® gefärbten Objektträger waren zu den vier Testzeitpunkten auswertbar. Die Zentralwerte der Qualitätsparameter lagen über alle Untersuchungszeitpunkte hinweg konstant bei 5. Innerhalb eines Zeitpunkts zeigten sich im Median nur geringe Abweichungen von bis zu $\pm 0,5$. Die Farbintensität und der Kontrast zeigten im Verlauf der Lagerung mit Beurteilungen zwischen 4 und 5 geringgradige Schwankungen, während die Detailerkennbarkeit mit einem Zentralwert von 4,5 zu t_3 leicht absank (Tabelle 10). Einzelne Präparate wiesen in der Auswertung eine stark schwankende Farbintensität auf und stellten sich blass dar (Abbildung 12). Zu den häufigen

Besonderheiten in den Hemacolor®-Färbungen zählten Pigmentansammlungen (n = 9, Abbildung 14), wellige Schwanzenden (n = 10) und schlecht erkennbare Schwanzenden (n = 12, Abbildung 13). Als Artefakt wurde die mehrfach festgestellte Tropfenbildung gewertet. Dieser kann ursächlich ein Färbungsartefakt, Fixierungsrückstände oder eine Protein- bzw. Lipidkondensation zugrunde liegen (Abbildung 14).

Im Vergleich zu den anderen Färbemethoden zeigten die mit Hemacolor® gefärbten Präparate durchschnittlich den niedrigsten Anteil an Schleifenformen mit 4,95 % (Median = 5 %) im Vergleich zu den anderen fünf Färbemethoden (arithmetischer Mittelwert 7,61 %). Insgesamt lag der mediane Anteil pathomorphologischer Veränderungen bei der Hemacolor®-Färbung mit 17,75 % im Mittelfeld aller Färbemethoden.

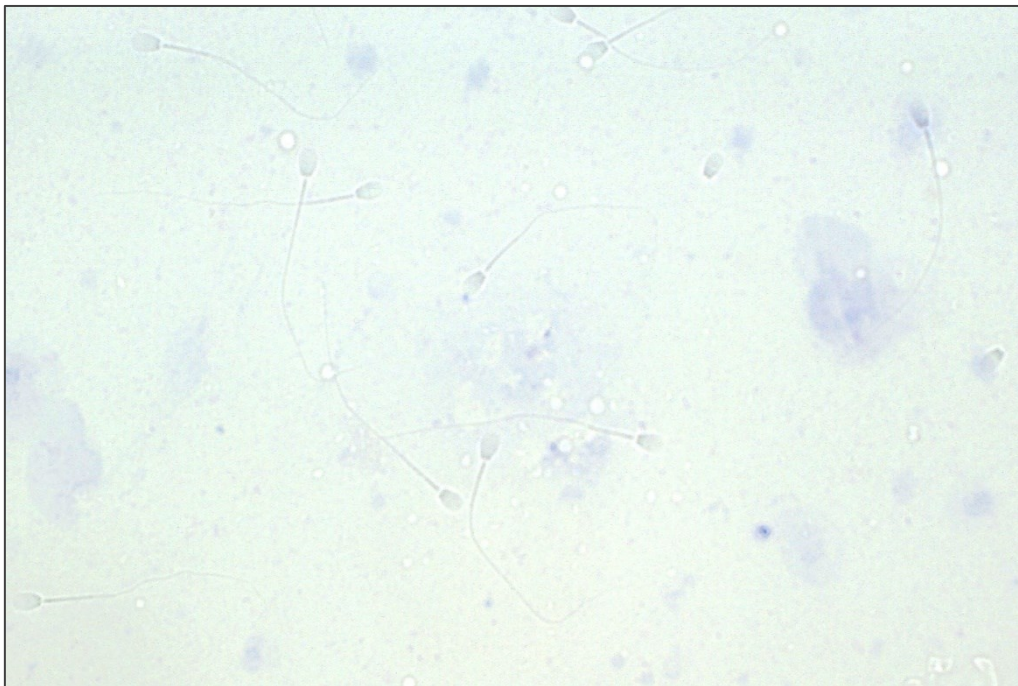


Abbildung 12: Hemacolor®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung, blasse Anfärbung



Abbildung 13: Hemacolor®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung, Farbpartikel und schlecht erkennbare Schwanzenden (Markierung)



Abbildung 14: Hemacolor®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 400-fache Vergrößerung, wellige Schwanzenden mit Tropfenbildung und Farbpartikeln (Markierung)

4.2.5 Spermac®

Die 80 mit Spermac® angefärbten Präparate konnten zu allen vier Auswertungszeitpunkten beurteilt werden. In den Kategorien Detailerkennbarkeit und Kontrast zeigten sich zu t_0 mit Zentralwerten von 7 bzw. 6,5 die höchsten Werte aller Färbemethoden (Tabelle 10). Auch die mediane Färbequalität zu t_0 war in der Spermac®-Färbung mit 7 am höchsten. Zudem ergab sich in der Spermac®-Färbung die beste Detailerkennbarkeit über alle Untersuchungszeitpunkte hinweg mit einem Zentralwert von 6. Sowohl die Gesamt-Färbequalität als auch die einzelnen Qualitätskriterien der mit Spermac® gefärbten Objektträger zeigten über die dreimonatige Lagerung hinweg sinkende Mediane bis auf Werte von 4–5 zu t_3 .

In der statistischen Auswertung wiesen sowohl das Merkmal Detailerkennbarkeit als auch der Kontrast signifikante Abweichungen im Vergleich aller Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest auf. Dies betraf die Paarvergleiche von Spermac® zu Eosin und zu Eosin-Nigrosin hinsichtlich der Detailerkennbarkeit ($p = 0,029$). Im Kontrast bestand im Paarvergleich von Eosin-Nigrosin zu Spermac® eine statistisch signifikante Abweichung mit $p = 0,029$.

Mehrere Merkmale zeigten in der Spermac®-Färbung erhöhte Ausprägungen im Vergleich zu den anderen Färbemethoden. Dazu zählte die Pathologie „Akrosom in Ablösung“ mit einem Median von 0,25 %, während dieser Wert bei den anderen Färbungen bei 0 % lag. Vereinzelt wurden abgelöste Akrosomen identifiziert (Abbildung 15). Auch der Parameter „Schleifenform“ wies einen medianen Anteil von 8,75 % auf, was dem höchsten Ausprägungsanteil aller Färbemethoden entsprach. Die statistische Auswertung zeigte für die Prävalenz von Schleifenformen mit einem durchschnittlichen Anteil von 10,05 % in der Spermac®-Färbung eine signifikante Abweichung im Vergleich zur Färbung mit Diff-Quick® in Höhe von 5,6 % (arithmetischer Mittelwert aller Färbungen = 7,61 %, $p = 0,029$, Tabelle 11). Der mediane Anteil an Samenzellen mit pathomorphologischen Ausprägungen war mit 20,25 % der zweithöchste aller Färbemethoden (Minimum: 8 %, Maximum: 84 %, Tabelle 11).

Zu den am häufigsten dokumentierten Auffälligkeiten zählten Pigmentansammlungen ($n = 8$), welche meist an die Samenzellen angelagert

waren. In einer Probe traten in der Spermac®-Färbung gehäuft Riesenköpfe auf (Abbildung 16). Zudem wurde an einzelnen Präparaten mehrfach ein starker Pigmentverlust zum letzten Untersuchungszeitpunkt t_3 festgestellt. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass in mit Spermac® gefärbten Präparaten die geringste absolute Zahl an Auffälligkeiten dokumentiert wurde ($n = 19$).

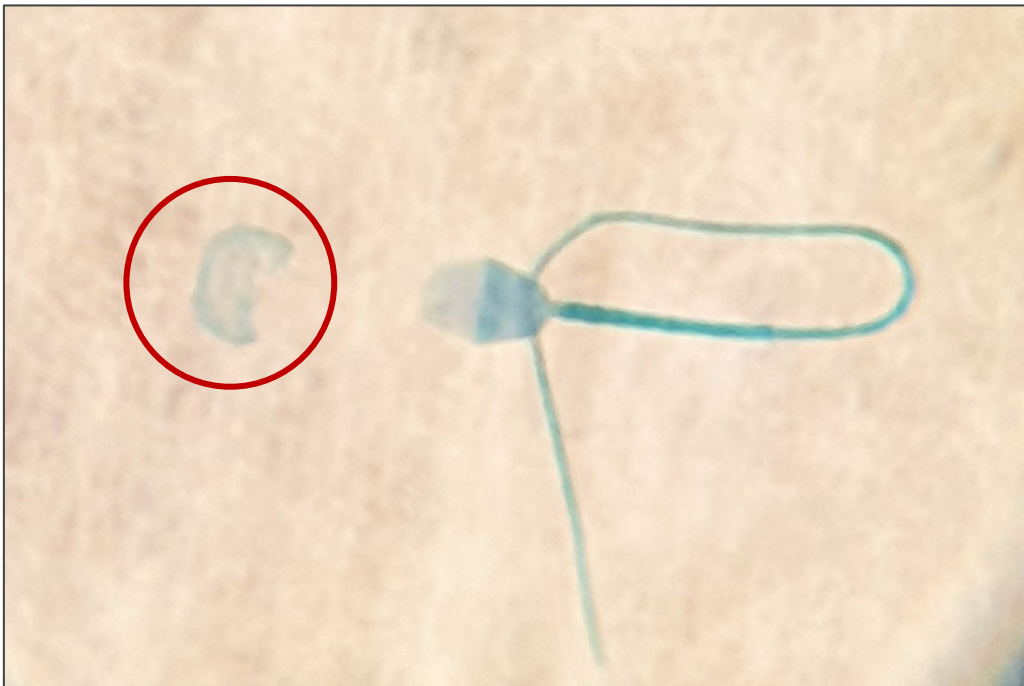


Abbildung 15: Spermac®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, Ausschnitt einer 1000-fach vergrößerten Aufnahme, mit Immersionsöl, abgelöste Kopfkappe (Markierung)



Abbildung 16: Spermac®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Riesenkopf (Markierung)

4.2.6 Formolzitrat-Bengalrosa

Die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung konnte bei allen 80 Objektträgern zu den vier Zeitpunkten ausgewertet werden. In dieser Färbung zeigte sich mit einer medianen Gesamt-Färbequalität von 6 über den gesamten Verlauf der Lagerung hinweg der höchste Wert. Das betraf auch die Farbintensität und den Kontrast mit Zentralwerten von 6 bei Betrachtung aller Untersuchungszeitpunkte. Insgesamt ergab sich zu keinem Zeitpunkt innerhalb der drei Qualitätsmerkmale ein Median unter einem Wert von 5. Die Qualitätsmediane wiesen über die Lagerungszeit von drei Monaten eine Abnahme von 0,5–1 Punkten auf. Trotz der fehlenden Konservierung unter einem Deckglas mittels Entellan® fiel dieser Abfall deutlich geringer als im Fall der Spermac®-Färbung aus (Zentralwert-Abnahmen von 2–2,5, Tabelle 10). In der statistischen Auswertung konnten für die Detailerkennbarkeit signifikante Unterschiede zu t_0 ohne Stresstest im Vergleich zu den Färbemethoden Eosin und Eosin-Nigrosin nachgewiesen werden (jeweils $p = 0,029$). Auch im Kontrast zeigte sich eine statistisch signifikante Abweichung zu t_0 ohne Stresstest gegenüber der Eosin-Nigrosin-Färbung mit einem p -Wert von 0,029.

Die Anfärbung mit Formolzitrat-Bengalrosa wies mit einem Median von 22,25 % den höchsten Gesamtanteil pathomorphologischer Auffälligkeiten auf. Statistisch zunächst hochsignifikant war das geringe Auftreten rudimentärer Schwänze mit einem Zentralwert von 1 % im Vergleich zu einer medianen Prävalenz von 3,25 % in der Eosin-Nigrosin-Färbung (p-Wert nach Bonferroni-Korrektur = 0,029). Gebrochene oder geknickte Formen fanden sich in dieser Färbung mit einem Median von 0,25 % am seltensten. Zu einer häufiger als im Mittel festgestellten Pathologie zählte das Merkmal „Schleifenform“ mit einem Zentralwert von 8,25 % und einem mittleren Anteil von 11,7 % (\bar{x} alle Färbemethoden = 7,61 %, Tabelle 11).

Als Besonderheit dieser Färbemethode fiel eine Häufung lanzenförmiger Spermienköpfe auf. Zu t_0 waren 5,2 % aller untersuchten Samenzellen lanzenförmig, was einem Median von 2,25 % entspricht, während der Median aller anderen Färbungen bei 0 % lag. 83,9 % der Beurteilungen dieser Pathologie wurden in der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung zu t_0 festgestellt, mit einem starken Rückgang in den Wiederholungsuntersuchungen. Zu den sonstigen Auffälligkeiten zählten Lufteinschlüsse mit in Nestern angeordneten Samenzellen ($n = 13$), Pigmentansammlungen ($n = 8$) und zu t_3 vereinzelt starke Farbkristallbildung ($n = 3$, Abbildung 17, Abbildung 18).

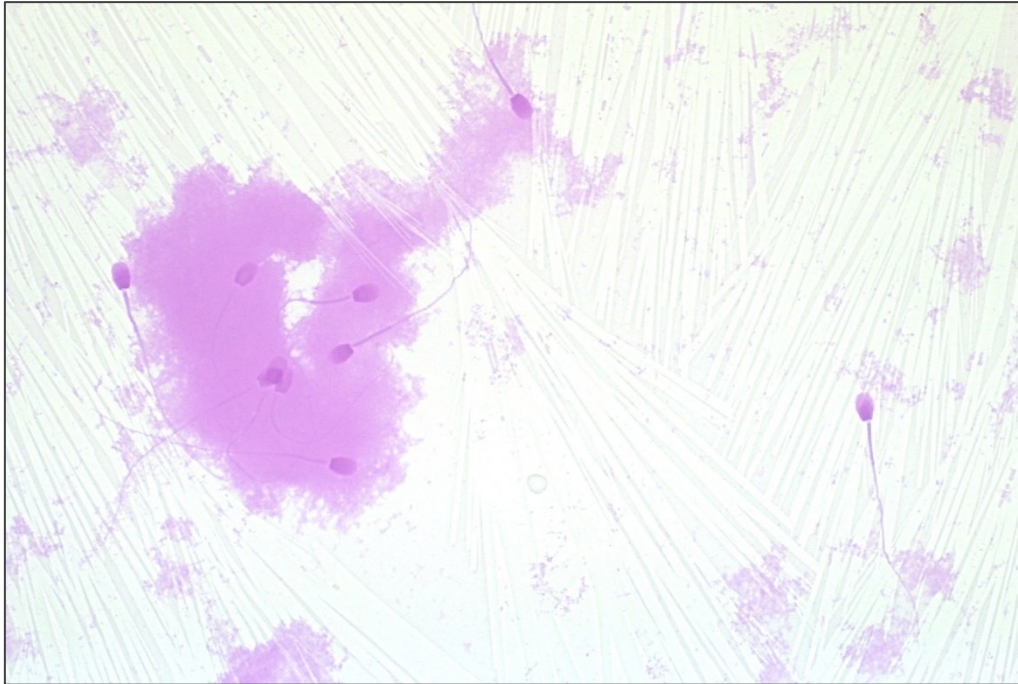


Abbildung 17: Formolzitrat-Bengalrosa, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl, starke Farbkristallbildung mit Spermien-Pigment-Nestern zu t_3



Abbildung 18: Formolzitrat-Bengalrosa, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl, Luft einschüsse um mit Pigment angereicherte Samenzellen

4.3 Vergleich der Färbemethoden

Zu t_0 ohne Stresstest wiesen die sechs Färbemethoden mediane Prävalenzraten morphologischer Abweichungen zwischen 13,25 und 22,25 % der analysierten Spermatozoen auf. Die initiale statistische Auswertung ergab eine hochsignifikante Differenz innerhalb der Methoden ($p = 0,0018$). Nach Adjustierung der p-Werte konnten jedoch keine signifikant unterschiedlichen Paarvergleiche mehr identifiziert werden.

Die am häufigsten beobachtete Pathologie waren Schleifenformen mit einer medianen Prävalenz von 5–8,75 %, wobei sich ein signifikanter Unterschied zwischen den sechs Färbemethoden zeigte ($p = 0,0027$). Infolge der Bonferroni-Korrektur verblieb ein Paarvergleich mit Unterschreitung des Signifikanzniveaus zwischen der Diff-Quick®- und der Spermac®-Färbung mit einem p-Wert von 0,0293. Die detaillierte Darstellung der Prävalenzverteilungen inklusive Minima, Maxima und Quartilen findet sich, aufgrund der höchsten Prävalenz, exemplarisch für das Merkmal „Schleifenformen“ in Tabelle 12. Die zweithäufigste Pathomorphologie stellten rudimentäre Schwanzstrukturen mit Zentralwerten von 1–4 % dar ($p = 0,0045$). Nach multiplen Paarvergleichen blieb ein signifikanter Unterschied zwischen den Färbemethoden Eosin-Nigrosin und Formolzitrat-Bengalrosa ($p = 0,0293$) bestehen. Die statistische Auswertung des Parameters „Riesenköpfe“ ergab zunächst ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Färbemethoden mit einem p-Wert von 0,008. Es konnte im Anschluss an die p-Wert-Adjustierung jedoch kein Paarvergleich mit Unterschreitung des Signifikanzniveaus mehr gefunden werden (Tabelle 11).

Tabelle 12: Prävalenz schleifenförmiger Samenzellen (Anteile in %) zu t_0 ohne Stresstest in den angewendeten Färbemethoden (Fett = $p \leq 0,05$)

Färbe- methode	Median	Mini- mum	Maxi- mum	Unteres Quartil	Oberes Quartil	90. Per- zentil
E	5,25	0	16	2,5	9	13,75
EN	6,75	1	12,5	3,5	11,5	12,5
DQ	5,5	2,5	11	3,5	7,5	9,5
H	5	0	10,5	1,5	7,5	10

Ergebnisse

S	8,75	3,5	26	8	9,5	18,5
FB	8,25	2	30,5	6,5	16	24,75

Abkürzung der Färbemethoden: E = Eosin, EN = Eosin-Nigrosin, DQ = Diff-Quick®, H = Hemacolor®, S = Spermac®, FB = Formolzitrat-Bengalrosa

Im Rahmen der pathomorphologischen Auswertung wurden neben den farbabhängigen Ausprägungen auch probenspezifische Auffälligkeiten festgestellt. Bei Probe 3 der Rasse Briard zeigte sich ein auffällig hoher Anteil deformierter und verdickter Mittelstücke der Samenzellen (Abbildung 19). Durchschnittlich 96,27 % aller deformierten Mittelstücke und 89,65 % aller verdickten oder schmalen Mittelstücke wurden in den Präparaten dieser Probe identifiziert. Die medianen Anteile dieser beiden Spermienanomalien in Probe 3 lagen mit 6,63 % (Mittelstück deformiert/asymmetrisch) bzw. 11,38 % (Mittelstück verdickt/schmal) deutlich über den Werten der neun weiteren Proben (Zentralwert jeweils = 0 %). Eine Darstellung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Ausprägung der auffälligen Mittelstückpathologien in Probe 3 im Vergleich zu den anderen neun Proben

Merkmal	Median aller Proben exklusive Probe 3 (%)	Median Probe 3 (%)
Mittelstück deformiert/ asymmetrisch	0	6,63
Mittelstück verdickt/schmal	0	11,38



Abbildung 19: Probe 3 in Spermac®-Färbung, aufgetautes TG-Rüdensperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl, verdickte und asymmetrisch deformierte Mittelstücke der Samenzellen (Markierung)

4.4 Spermatologische CASA-Untersuchung

Im Anschluss an die subjektive Auswertung wurden die Präparate der Probe 4 in den sechs Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest mittels CASA-Software (Computer-assisted Sperm Analysis) ausgewertet und ohne manuelle Nachklassifizierung als PDF-Datei exportiert. Es werden durch die AndroVision®-Software neben der Einstufung als „intakte Samenzelle“ nur die beiden pathomorphologischen Merkmale „Kopfdeformation“ und „Mittelstückdefekt“ erfasst.

Insgesamt zeigten sich während der explorativen Evaluierung Erkennungs- und Klassifizierungsfehler, die die Herstellerlimitierung rechtfertigen. Bei der Spermac®-Färbung konnten trotz kontrastreicher Einstellung der Sensibilitätsparameter und der empfohlenen Klassifizierungseinstellungen keine Samenzellen erkannt oder ausgewertet werden. Ein Großteil der tatsächlich durch die Software fotografierten Spermien in dieser Färbemethode wurde lediglich der Kategorie „Fremdpartikel“ zugeordnet. Bei den weiteren fünf Färbemethoden konnten Morphologie-Beurteilungen durchgeführt und Ergebnisse erzielt werden.

In der Eosin-Färbung wurden mittels CASA 46,03 % der Samenzellen als physiologisch klassifiziert (Abbildung 20), während es in der subjektiven Auswertung 89,5 % waren. Eine große Abweichung bestand auch beim Anteil an zugeordneten Kopfdeformationen mit 52,38 % in der computergestützten Auswertung gegenüber 1,5 % in der subjektiven Beurteilung. Die mit Eosin-Nigrosin gefärbten Spermien wurden in der automatischen Samenzellanalyse zu 28,53 % als intakt und zu 69,3 % mit Kopfdeformation beurteilt. Im Gegensatz dazu zeigte die subjektive Auswertung 90 % intakte Samenzellen, keine Kopfdeformationen sowie 0,5 % Mittelstückdefekte. Exemplarisch findet sich in Abbildung 21 die inkorrekte Zuordnung einer physiologischen Samenzelle zur Kategorie „Kopfdeformation“.

Der Anteil unauffälliger Spermien lag in der CASA-Auswertung der Diff-Quick®-Färbung bei 15,3 % und es wurden zu 83,22 % Mittelstückdefekte identifiziert. Die subjektive Auswertung ergab hingegen 93,5 % morphologisch unauffällige Samenzellen und keine Schäden an Mittelstücken. Das mit Hemacolor® gefärbte Präparat wurde durch die Software mit 15,38 % intakten Samenzellen und zu 82,67 % mit Kopfdeformation beurteilt, während die subjektive Beurteilung 88,5 % intakte Spermien und 0,5 % mit Kopfdeformation zeigte. In der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa wurde in der computergestützten Analyse ein Anteil an Kopfdeformationen von 83,22 % festgestellt, wohingegen in der subjektiven Auswertung nur 1 % festgestellt wurden. Der Anteil physiologischer Spermien lag in der subjektiven Untersuchung bei 87,5 %. Demgegenüber wurden in der CASA-Auswertung 15,3 % dieser Kategorie zugeordnet. Die Mediane der automatisierten und subjektiv erfassten Werte sind in Tabelle 14 über alle Färbemethoden hinweg dargestellt und zeigten jeweils eine hohe Diskrepanz der Merkmale „intakt“ und „Kopfdeformation“. Mittelstückdefekte hingegen wurden im Median zu 2,02 % in der Software und zu 2 % in der subjektiven Beurteilung identifiziert. Die CASA-Analyse war als explorative Einzeluntersuchung konzipiert und wurde daher ausschließlich an einer zufällig ausgewählten Probe durchgeführt. Bereits im Vorfeld bestand ein intensiver Austausch mit der Herstellerfirma, in dessen Rahmen die beobachteten Detektionsprobleme bekannt waren und sich auch während der Testläufe nicht verbesserten. Die erzielten Ergebnisse zeigten ausgeprägte Diskrepanzen zwischen

Ergebnisse

automatisierter und subjektiver Auswertung sowie zahlreiche Fehlklassifikationen.

Tabelle 14: Ergebnisse der CASA-Auswertungen an Probe 4 im Vergleich zur subjektiven pathomorphologischen Auswertung ohne Stresstest oder Lagerung (Anteile in %, FM = Färbemethoden, Md = Median)

Färbe- methode	intakt		Kopfdeformation		Mittelstückdefekt	
	CASA	subjektiv	CASA	subjektiv	CASA	subjektiv
E	46,03	89,5	52,38	1,5	1,59	2
EN	28,53	90	69,3	0	2,18	0,5
DQ	15,3	93,5	83,22	0	1,59	1,5
H	15,38	88,5	82,67	0,5	2,02	2,5
FB	15,3	87,5	83,22	1	2,02	2,5
Md alle FM	15,38	89,5	82,67	0,5	2,02	2

Abkürzung der Färbemethoden: E = Eosin, EN = Eosin-Nigrosin, DQ = Diff-Quick®, H = Hemacolor®, S = Spermac®, FB = Formolzitrat-Bengalrosa

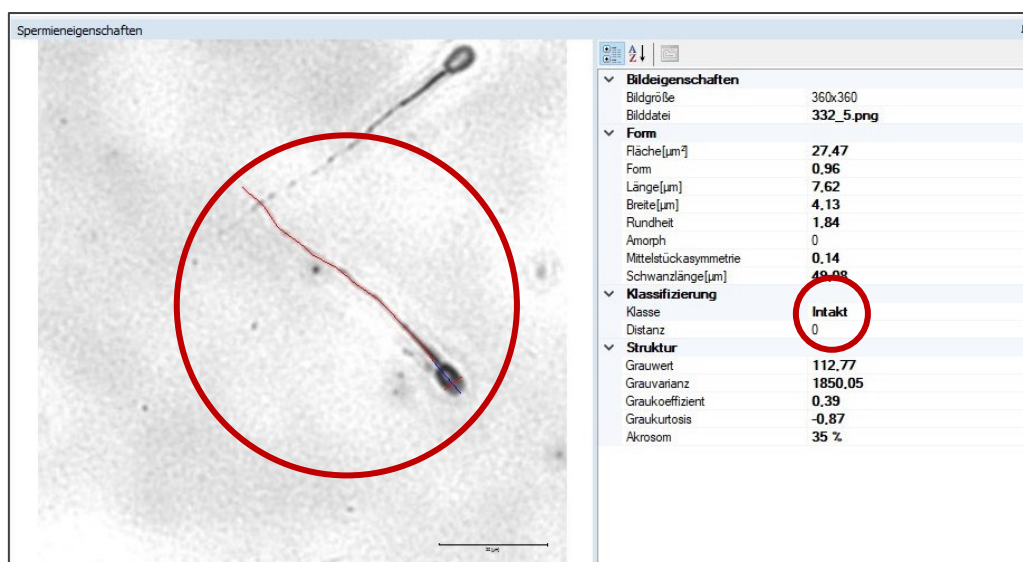


Abbildung 20: Bildschirmaufnahme der AndroVision®-Software mit Zuordnung einer Samenzelle in Eosin-Färbung als „intakt“ (Markierung)

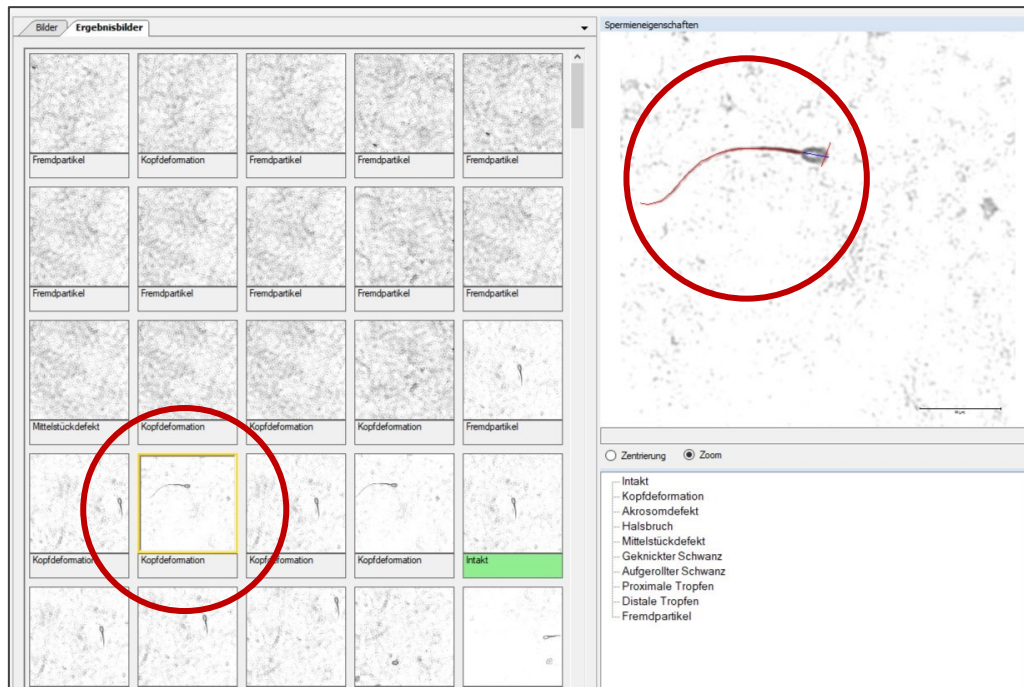


Abbildung 21: Bildschirmaufnahme der AndroVision®-Software mit Zuordnung einer intakten Samenzelle in Eosin-Nigrosin-Färbung als „Kopfdeformation“

4.5 Einfluss der Kryokonservierung

Um den Einfluss der Kryokonservierung auf die pathomorphologische Auswertung der Samenzellen zu analysieren, wurden die Ergebnisse der Eingangsuntersuchungen vor der Kryokonservierung (t_{-1} , Eosin-Färbung) mit denen aller Färbemethoden zu t_0 ohne Stresstest verglichen. Aufgrund des Vorliegens einer Normalverteilung bzw. annähernden Normalverteilung in 14 von 18 Konstellationen erfolgt zunächst die Beschreibung der Daten anhand des Mittelwerts und eine anschließende Ergänzung der Mediane und Minima bzw. Maxima der nicht normalverteilten Parameter.

In allen Färbemethoden außer der Hemacolor®-Färbung wichen die Anteile schleifenförmiger Spermien statistisch signifikant von dem in der Eingangsuntersuchung festgestellten Mittelwert von $2,4 \% \pm 1,94$ ab. Nach der Kryokonservierung waren alle Werte dieser Pathologie mindestens doppelt so hoch, mit der höchsten Ausprägung in der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa. Hier lag der Anteil bei durchschnittlich $11,7 \%$ Schleifenformen und einem p-Wert von $0,014$.

Auch das Merkmal „gebrochen/geknickter Schwanz“ wurde in 5 von 6 Färbemethoden, nicht betreffend die Hemacolor®-Färbung, mit signifikant

abweichenden Anteilen im Vergleich zu t_{-1} befundet. In dieser Kategorie lagen die Prävalenzen in allen Präparaten zu t_0 niedriger als zum Zeitpunkt der Eingangsuntersuchung, mit einem Mittelwert von $4,2 \% \pm 3,54$. Das Auftreten abgelöster Köpfe lag zu t_{-1} bei durchschnittlich $2,75 \% \pm 2,76$ und war somit häufiger als die mittleren Ergebnisse der einzelnen Färbungen. Mit Eosin oder Eosin-Nigrosin gefärbte Objektträger wiesen zu t_0 einen geringeren Anteil von 1% bzw. $0,95 \%$ auf und wichen signifikant von den Resultaten der Eingangsuntersuchung ab (p -Wert = $0,039$ bzw. $0,047$). Bei den weiteren vier Färbemethoden konnte beim Vergleich der Ausprägungen zu den beiden Untersuchungszeitpunkten keine Signifikanz nachgewiesen werden. Eine Auflistung der detaillierten Ergebnisse findet sich in Tabelle 15. Zu beachten ist, dass es sich bei den Merkmalen „gebrochen/geknickter Schwanz“ und „abgelöster Kopf“ um signifikante Merkmale auf insgesamt niedrigem Prävalenzniveau ($< 5 \%$) handelt.

Die Spermac®-Färbung wies hinsichtlich des Merkmals „Schleifenform“ keine Normalverteilung auf. Der Median für Schleifenformen lag bei 2% zu t_{-1} und $8,75 \%$ zu t_0 . Das Minimum betrug 0% zu t_{-1} und $3,5 \%$ zu t_0 , während das Maximum 6% zu t_{-1} und 26% zu t_0 entsprach.

Auch der Anteil abgelöster Köpfe war bei den Färbungen in Eosin, Eosin-Nigrosin, Hemacolor® und Spermac® nicht normalverteilt. Mit Eosin gefärbte Präparate zeigten diese Pathologie im Median zu t_{-1} mit $1,75 \%$ bzw. mit 1% zu t_0 . Die Minimalwerte lagen bei 1% (t_{-1}) und 0% (t_0), während die Maximalwerte 10% (t_{-1}) und $2,5 \%$ (t_0) betragen. Die Eosin-Nigrosin-Färbung wies bei der sofortigen Auswertung nach Kryokonservierung einen medianen Anteil von 1% abgelöster Köpfe mit einem Minimum von 0% und einem Maximum von $2,5 \%$ auf. Bei der Färbemethode Hemacolor® lag der Zentralwert dieses Merkmals zu t_0 bei 1% , der minimale Anteil bei 0% sowie der maximale Anteil bei 3% . Mit Spermac® gefärbte Präparate zeigten folgende Anteile abgelöster Köpfe: Median $1,5 \%$, Minimum 0% , Maximum 4% .

Im Mittel wurden vor der Kryokonservierung $20,1 \%$ pathologische Merkmale an den Samenzellen identifiziert. Nach dem Auftauen lagen die Werte aller sechs Färbemethoden durchweg oberhalb dieses Ausgangswerts, mit einer

Spannweite von 20,15 % (Hemacolor®) bis 30 % (Spermac®), wobei die Eosin-Färbung einen Mittelwert von 23,2 % erreichte.

Tabelle 15: Vergleich der Untersuchungsergebnisse vor der Kryokonservierung (Eosin t₁) mit t₀ in allen Färbungen ohne Stresstest (durchschnittliche Anteile in %) mit p-Wert-Berechnung (Fett = p ≤ 0,05)

Merkmal	Eosin t₁	E t₀	EN t₀	DQ t₀	H t₀	S t₀	FB t₀
Schleifenform	2,4	6,2	7,15	5,6	4,95	10,05	11,7
p-Wert		0,033	0,022	0,029	0,075	0,004	0,014
gebrochen / geknickter Schwanz	4,2	1,35	1	1,35	1,5	1,15	0,55
p-Wert		0,038	0,036	0,04	0,089	0,026	0,016
abgelöster Kopf	2,75	1	0,95	0,85	1,35	1,75	1,15
p-Wert		0,039	0,047	0,095	0,168	0,578	0,069

Abkürzung der Färbemethoden: E = Eosin, EN = Eosin-Nigrosin, DQ = Diff-Quick®, H = Hemacolor®, S = Spermac®, FB = Formolzitrat-Bengalrosa

4.6 Einfluss des Stresstests

Zur Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen (18 °C, 37 °C, 6 °C) vor Herstellung der Präparate erfolgte eine statistische Auswertung ebendieser zu t₀ innerhalb einer Färbemethode.

Einige Pathomorphologien, dazu zählen Auffälligkeiten hinsichtlich des Akrosoms, Vakuolen sowie Plasmotropfen am Endstück, traten nur in Einzelfällen auf. Aufgrund der geringen Fallzahlen konnte eine statistische Auswertung dieser Merkmale nicht durchgeführt werden. Durch die Vielzahl an Messwerten und Kombinationsmöglichkeiten erfolgte eine Beschränkung der Statistik auf Merkmale mit hoher Prävalenz. Dies betraf die Kriterien „Schleifenform“, „rudimentärer Schwanz“ und „abgelöster Kopf“. Zudem wurden die Qualitätsparameter „Farbintensität“, „Detailerkennbarkeit“ und „Kontrast“ in die Berechnungen eingeschlossen.

Da eine Normalverteilung der Residuen nicht gegeben war, wurde der nichtparametrische Friedman-Test mit Messwiederholung bezüglich des Stresstests innerhalb jeder der sechs Färbemethoden zu t_0 berechnet. Entsprechend erfolgt die Beschreibung der Daten anhand der medianen Anteile (pathomorphologische Parameter) bzw. Zentralwerte (Färbequalität) sowie der Minima und Maxima zu t_0 . In Tabelle 16 sind die Mediane mit und ohne Stresstest über alle Färbemethoden hinweg mit p-Wert-Berechnung dargestellt. Wenn eine signifikante Abweichung ($p \leq 0,05$) festgestellt wurde, beispielsweise bei dem Bewertungspunkt „rudimentärer Schwanz“ in der Eosin-Färbung, wurden multiple Paarvergleiche der verschiedenen Lagerungstemperaturen vor Anfärbung durchgeführt. Statistisch signifikante p-Werte, bei denen nach Bonferroni-Korrektur keine Paare mit einem Ergebnis $\leq 0,05$ übriggeblieben sind, wurden in den Tabellen 14–20 mit einem Sternchen (*) markiert. Die Auswertung erfolgte sowohl über alle Färbemethoden hinweg als auch für jede einzelne Färbemethode (Tabelle 16–Tabelle 22).

Bei der Betrachtung des Gesamtanteils der Samenzellen mit pathomorphologischen Auffälligkeiten über alle Färbemethoden hinweg zeigten sich in zuvor gestressten Präparaten höhere mediane Anteile (19,33–21,63 %) im Vergleich zu ungestressten Spermien ($Md = 17,79\%$). Für dieses Merkmal konnte eine statistisch signifikante Abweichung mit einem p-Wert von 0,036 identifiziert werden. Nach der p-Wert-Adjustierung blieb nur zwischen ungestressten und bei 37 °C gelagerten Samenzellen ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 ($p = 0,012$) bestehen. Auch das Merkmal „rudimentärer Schwanz“ war in gestressten Präparaten mit Medianen von 3,46–4,0 % häufiger vertreten als bei ungestressten Spermien ($Md = 2,75\%$). Hier zeigte sich zunächst ein p-Wert von 0,022. Infolge der Bonferroni-Korrektur verblieb ein Paarvergleich zwischen nicht gestressten und bei 37 °C gelagerten Samenzellen, der das Signifikanzniveau unterschritt ($p = 0,035$). Für die Qualitätsmerkmale „Farbintensität“, „Detailerkennbarkeit“ und „Kontrast“ wurden keine statistisch relevanten Abweichungen berechnet (Tabelle 16).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass höhere Lagerungstemperaturen vor der Herstellung der Präparate signifikant erhöhte mediane Anteile pathomorphologischer Auffälligkeiten wie Gesamtanomalien und rudimentärer

Schwänze verursachten, wobei der Effekt nach Bonferroni-Korrektur nur bei 37 °C bestehen blieb. Hingegen blieben die Qualitätsparameter temperaturunabhängig stabil.

Tabelle 16: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) über alle Färbemethoden hinweg mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	17,79	21,63	19,33	20,13	0,036
Schleifenform	7,46	9,13	8	7,38	0,246
rudimentärer Schwanz	2,75	4	3,67	3,46	0,022
abgelöster Kopf	1,08	0,79	1,29	1,08	0,777
Farbintensität	5,67	5,42	5,5	5,58	0,229
Detailerkennbarkeit	5,25	5,08	5,08	5,25	0,871
Kontrast	5,67	5,25	5,17	5,33	0,265

In der Eosin-Färbung konnte für das Merkmal „rudimentärer Schwanz“ eine signifikante Abweichung mit einem p-Wert von 0,032 festgestellt werden (Tabelle 17). Bei direkter Auswertung ohne Stresstest traten rudimentäre Schwänze mit einem medianen Anteil von 3 % auf. Nach dem Stresstest lagen die Zentralwerte mit 8 % bei 37 °C, 6,75 % bei 18 °C und 4 % bei 6 °C deutlich höher. Infolge der Bonferroni-Korrektur blieb ein signifikanter Unterschied zwischen den Präparaten ohne Stresstest und denen mit zweistündiger Lagerung bei 37 °C vor Färbung bestehen ($p = 0,023$). Auch das Merkmal „Schleifenform“ und der Gesamtanteil aller pathologischen Samenzellen wiesen nach dem Stresstest bei 37 °C die höchsten medianen Werte (7 % bzw. 27,25 %) auf. Insgesamt lag in der Eosin-Färbung keiner der

ausgewerteten Zentralwerte der gestressten Spermien unter dem Wert der ungestressten Samenzellpräparate.

Tabelle 17: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Eosin-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	18,75	27,25	19	18,25	0,218
Schleifenform	5,25	7	6	5,75	0,641
rudimentärer Schwanz	3	8	6,75	4	0,032
abgelöster Kopf	1	1	1,75	1	0,577
Farbintensität	5	5	5	5	0,951
Detailerkennbarkeit	4,5	5	5	5	0,662
Kontrast	5	5	5	5	0,912

Die verschiedenen Lagerungen vor Anfärbung zeigten bei mit Eosin-Nigrosin gefärbten Präparaten, bis auf das Merkmal „abgelöster Kopf“ nach Lagerung bei 18 °C, höhere mediane Anteile pathologischer Formen, mit den höchsten Zentralwerten bei einem Stresstest von 37 °C (Tabelle 18). Das Qualitätskriterium „Detailerkennbarkeit“ offenbarte in der statistischen Auswertung zunächst einen p-Wert von 0,04. Nach der p-Wert-Adjustierung blieb jedoch kein signifikanter Paarvergleich mehr übrig. Insgesamt fiel bei der Betrachtung des Gesamtanteils pathologischer Samenzellen auf, dass der höchste Median mit 22,5 % nach einer Lagerung bei 37 °C vor Anfärbung bestand. Es wurde für dieses Kriterium ein hochsignifikanter p-Wert von 0,007 ermittelt. Infolge der Bonferroni-Korrektur konnte eine statistisch signifikante Abweichung zwischen ungestressten und bei 37 °C gestressten Spermien mit einem p-Wert von 0,012 identifiziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 18: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Eosin-Nigrosin-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	16,25	22,5	16,25	19	0,007
Schleifenform	6,75	9	6,25	6,25	0,382
rudimentärer Schwanz	3,25	5	3,5	3,5	0,524
abgelöster Kopf	1	1	0,75	0,5	0,78
Farbintensität	5	5	5	5	0,392
Detailerkennbarkeit	3,5	4	4	4	0,04*
Kontrast	3,5	5	3,5	4	0,298

In der Diff-Quick®-Färbung ergaben sich bezogen auf die drei ausgewerteten Einzelmerkmale sowohl höhere als auch niedrigere Mediane bei gestressten Spermien im Vergleich zu ungestressten Samenzellen. Sowohl für diese Merkmale als auch für die Qualitätsparameter konnte keine Unterschreitung des Signifikanzniveaus festgestellt werden (Tabelle 19). Die Betrachtung der medianen Gesamtanteile aller Spermienpathologien offenbarte in den vor Anfärbung unterschiedlich gelagerten Präparaten höhere Zentralwerte im Bereich von 15,25–20,25 % im Vergleich zu einem Median von 13,25 % bei nicht gestressten Samenzellen. Es wurde ein p-Wert von 0,042 ermittelt. Nach der Bonferroni-Korrektur konnten jedoch keine signifikanten Paarvergleiche mehr gefunden werden.

Ergebnisse

Tabelle 19: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Diff-Quick®-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	13,25	20,25	15,25	18,25	0,042*
Schleifenform	5,5	5,5	4,5	6	0,442
rudimentärer Schwanz	4	5,75	3,5	2,25	0,263
abgelöster Kopf	0,5	0,5	1	1	0,370
Farbintensität	5,5	5	5,5	5,5	0,443
Detailerkennbarkeit	5	5	5	5	0,915
Kontrast	6,5	5	6	6	0,069

Mit Hemacolor® gefärbte Objektträger zeigten in den Messwerten „Schleifenform“ und „rudimentärer Schwanz“ stets höhere mediane Ausprägungen in den zuvor gestressten Fraktionen im Gegensatz zu den ungestressten Samenzellen. Die Zentralwerte des Merkmals „abgelöster Kopf“ lagen bei gestressten Präparaten sowohl über als auch unter dem Median ungestresster Spermien im Bereich von 0,5–1,25 %. Der mediane Gesamtanteil von der Norm abweichender Spermien lag in der Hemacolor®-Färbung mit 20,75 % nach einer Lagerung bei 6 °C am höchsten im Vergleich zu einem Anteil von 17,75 % ohne Stresstest. Insgesamt konnten weder in den pathomorphologischen Kriterien noch in den Qualitätsmerkmalen signifikante Abweichungen zwischen den vier Untersuchungsreihen festgestellt werden (Tabelle 20).

Tabelle 20: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Hemacolor®-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	17,75	17,5	18,75	20,75	0,106
Schleifenform	5	7,5	5,25	6,75	0,367
rudimentärer Schwanz	3	4,5	4,75	3,25	0,949
abgelöster Kopf	1	0,5	1,25	0,75	0,171
Farbintensität	5	5	5	5	0,656
Detailerkennbarkeit	5	5	5	5	0,143
Kontrast	5,5	5	5	5	0,927

In der Spermac®-Färbung konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der medianen Ausprägung rudimentärer Schwänze nachgewiesen werden ($p = 0,011$). Nach der p-Wert-Adjustierung blieb ein Paarvergleich mit Unterschreitung des Signifikanzniveaus zwischen den Stresstests bei 37 °C und 18 °C mit $p = 0,047$ bestehen. Die Zentralwerte dieses Merkmals lagen bei 1,75 % bzw. 3,5 %. Auch die Auswertung der Farbintensität zeigte zunächst einen p-Wert unter 0,05. Nach der Durchführung der Bonferroni-Korrektur konnte jedoch kein signifikanter Paarvergleich zwischen den ungestressten Samenzellen und den unterschiedlich vor Anfärbung gelagerten Präparaten festgestellt werden (Tabelle 21). Der mediane Gesamtanteil pathologischer Spermien lag bei nicht gestressten Spermien mit 20,25 % am niedrigsten. Den höchsten Zentralwert mit 24,5 % wiesen zuvor bei 6 °C gelagerte Samenzellen auf.

Tabelle 21: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Spermac®-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	20,25	24,25	21,5	24,5	0,373
Schleifenform	8,75	11	8,5	9	0,942
rudimentärer Schwanz	2,5	1,75	3,5	3,25	0,011
abgelöster Kopf	1,5	1,5	1,75	1	0,823
Farbintensität	7	6	5,5	7	0,008*
Detailerkennbarkeit	7	6,5	6	6,5	0,358
Kontrast	7	6	6	6	0,12

In der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa konnten entsprechend Tabelle 22 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Lagerungen bzw. ungestressten Proben festgestellt werden. Der mediane Gesamtanteil pathologischer Samenzellen lag nach einer Lagerung bei 6 °C mit 24,5 % am höchsten. Demgegenüber war der höchste Zentralwert des Merkmals „Schleifenform“ in der Fraktion der bei 37 °C gestressten Spermien in Höhe von 14 % vertreten.

Ein Kriterium, das nur in der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung gehäuft befundet wurde, stellen lanzenförmige Spermienköpfe dar (Abbildung 22). Ohne Stresstest lag der Mittelwert dieser Ausprägung bei sofortiger Auswertung mit 5,2 % am höchsten, während der Median bei 2,25 % lag. Bei den verschiedenen Lagerungstemperaturen vor Anfärbung ergaben sich aus den Beurteilungen niedrigere Mittelwerte: 3,7 % bei 37 °C, 3,25 % bei 18 °C und 4,25 % bei 6 °C. Die Zentralwerte lagen in den gestressten Fraktionen bei 2 % (37 °C), 2,75 % (18 °C) und 4 % (6 °C). Ungestresste Samenzellpräparate der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung wiesen sowohl das höchste Maximum von 19,5 % als auch den höchsten oberen Quartilswert von 11,5 % auf.

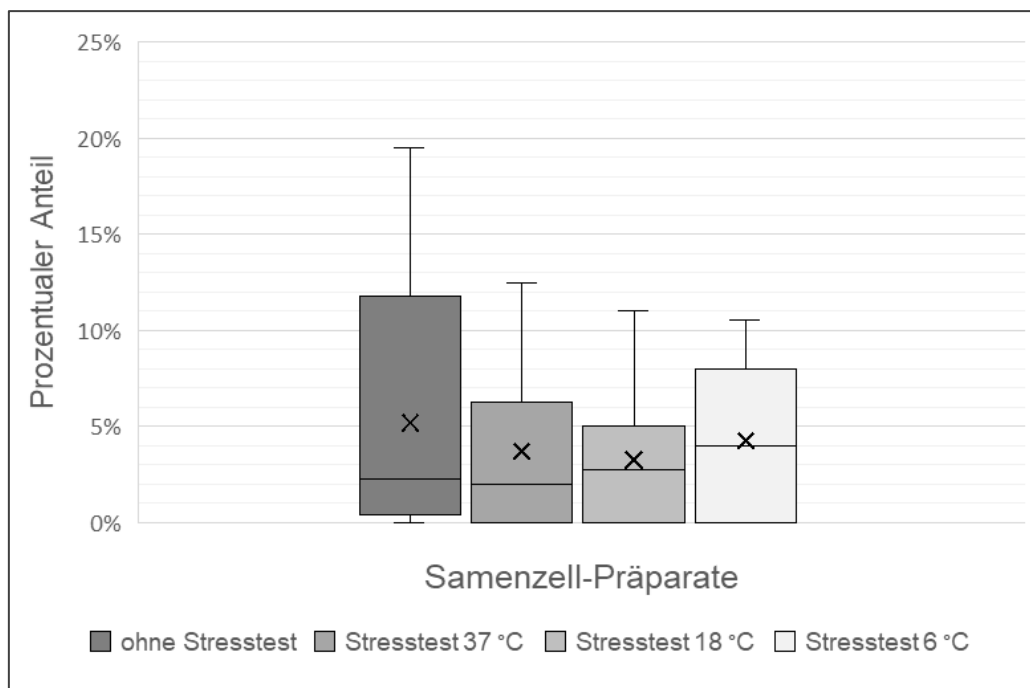


Abbildung 22: Darstellung von Median, Mittelwert (X), oberem und unterem Quartil lanzenförmiger Spermienköpfe in der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa mit und ohne Stresstest bei sofortiger Auswertung (t_0)

Tabelle 22: Vergleich der Pathomorphologie caniner Samenzellen (Mediane in %) und Qualitätsmerkmale der Färbemethoden (Mediane 1–7) an Formolzitrat-Bengalrosa-gefärbten Präparaten mit und ohne Stresstest zu t_0 mit p-Wert-Bestimmung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	ohne Stresstest	mit Stresstest			p-Wert
		37 °C	18 °C	6 °C	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	22,25	20,75	19,75	24,5	0,669
Schleifenform	8,25	14	9	10,75	0,218
rudimentärer Schwanz	1	1,25	1	1	0,323
abgelöster Kopf	1	0,5	0,75	1	0,748
Farbintensität	6	7	7	6,5	0,568
Detailerkennbarkeit	6	6	5	5,5	0,196
Kontrast	6	7	6	6	0,472

Ein weiteres bemerkenswertes Detail der deskriptiven Statistik ist die mediane Prävalenz des Kriteriums „Halsbruch“. Dieses Merkmal wies in den Färbemethoden Eosin-Nigrosin und Hemacolor® die absolut höchsten Mediane von jeweils 1,5 % nach einer zweistündigen Lagerung bei 6 °C auf. Auch in der Eosin- und Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung lagen hier nach diesem Stresstest neben anderen Fraktionen die höchsten Zentralwerte in Höhe von 1 % vor.

In den Anfärbungen mit Diff-Quick® und Spermac® bestanden die höchsten medianen Anteile in der zuvor bei 18 °C gelagerten Fraktion (Tabelle 23). Nach dem Stresstest bei 37 °C ergab sich für Eosin-Nigrosin-gefärbte Präparate ein Zentralwert von 0 %.

Tabelle 23: Vergleich der Mittelwerte des Merkmals „Halsbruch“ (mediane Anteile in %) bei den verschiedenen Färbemethoden mit und ohne Stresstest

Färbemethode	ohne Stresstest	mit Stresstest		
		37 °C	18 °C	6 °C
Eosin	1	1	0,75	1
Eosin-Nigrosin	1	0	0,25	1,5
Diff-Quick®	0,75	0,75	1,25	1
Hemacolor®	0,25	1	0,75	1,5
Spermac®	0	1	1,25	1
Formolzitrat-Bengalrosa	1	0,75	1	1

4.7 Einfluss der Lagerung

Um qualitative Unterschiede jeder Färbung im Verlauf der Lagerung statistisch auszuwerten, erfolgten drei Verlaufsauswertungen.

Die pathomorphologischen Merkmale wurden aufgrund der hohen Anzahl an Merkmalen und Kombinationsmöglichkeiten auf Kriterien mit einer hohen Prävalenz beschränkt. Es wurden die Kategorien „Halsbruch“, „Schleifenform“, „aufgerollt“ und „rudimentärer Schwanz“ eingeschlossen und die Anteile zu den Messpunkten t_{0-3} verglichen. Da aufgrund einer nicht gegebenen Normalverteilung der Residuen ein nichtparametrischer Test (Friedman-Test)

verwendet wurde, erfolgt die Beschreibung der Anteile in Form des Medians. Zusätzlich wurden die Qualitätsmerkmale Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast statistisch ausgewertet. Wenn signifikante Abweichungen mit $p \leq 0,05$ gegeben waren, wurden multiple Paarvergleiche der verschiedenen Lagerungszeitpunkte durchgeführt. Falls nach p-Wert-Adjustierung keine Paare mit einem Ergebnis $\leq 0,05$ übriggeblieben sind, wurden die p-Werte in den Tabellen 22–27 mit einem Sternchen (*) markiert.

Zur statistischen Auswertung wurden ausschließlich ungestresste Proben verwendet, um Lagereffekte nicht mit temperaturinduzierten Vorschädigungen zu vermischen. Es wurden im Verlauf der Lagerung an gestressten Samenzellpräparaten keine relevanten Abweichungen von den an ungestressten Spermien ausgewerteten Merkmalsausprägungen festgestellt. Die Analyse erfolgte für jede einzelne Färbemethode über alle Auswertungszeitpunkte hinweg (Tabelle 24–Tabelle 29).

An den mit Eosin gefärbten Präparaten konnten weder hinsichtlich der pathomorphologischen Parameter noch der Färbequalität statistisch signifikante Abweichungen im Vergleich zu den Untersuchungsergebnissen zu t_0 festgestellt werden (Tabelle 24). Zu t_0 bestand in der Eosin-Färbung mit 18,75 % der höchste Zentralwert des Gesamtanteils aller nicht physiologischen Spermien im Verlauf der Lagerung. Die Färbekriterien zeigten im Verlauf der Lagerung zumeist mediane Werte in Höhe von 5. Farbintensität und Kontrast lagen lediglich zu t_3 und die Detailerkennbarkeit zu t_0 etwas niedriger, bei einem Zentralwert von 4,5.

Tabelle 24: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Eosin-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p-Wert) der Abweichung

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	18,75	15,25	15,25	11,5	0,087
Halsbruch	1	0,5	0,25	0,5	0,154
Schleifenform	5,25	4,75	7	4,25	0,406
aufgerollt	0,75	0,5	0,25	0,5	0,933
rudimentärer Schwanz	3	2,25	1,5	2	0,788
Farbintensität	5	5	5	4,5	0,075
Detailerkennbarkeit	4,5	5	5	5	0,171
Kontrast	5	5	5	4,5	0,301

Präparate der Eosin-Nigrosin-Färbung wiesen zu den drei Folgeuntersuchungen keine statistisch signifikant abweichenden Werte hinsichtlich der Pathomorphologie auf (Tabelle 25). Der Gesamtanteil aller Samenzellen mit pathomorphologischen Auffälligkeiten zeigte schwankende Mediane mit einem Maximum zu t_1 mit 17,5 % und einem Minimum zu t_3 mit 10,75 %. Die Farbintensität, die zu den ersten drei Auswertungszeitpunkten einen medianen Wert von 5 aufwies, sank zu t_3 auf einen Wert von 4,5. In den Merkmalen „Detailerkennbarkeit“ und „Kontrast“ wurden im Verlauf der

Lagerung absteigende Werte von 3,5 zu t_0 auf Zentralwerte von 3 zu den folgenden drei Messpunkten festgestellt. In der statistischen Auswertung konnte für den Kontrast zunächst ein p-Wert von 0,031 errechnet werden. Nach der Anwendung der Bonferroni-Korrektur blieb jedoch kein statistisch signifikanter Paarvergleich mehr übrig.

Tabelle 25: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Eosin-Nigrosin-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p-Wert) der Abweichung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	16,25	17,5	14	10,75	0,167
Halsbruch	1	1,5	1,25	0,25	0,431
Schleifenform	6,75	7,5	5,75	4	0,618
aufgerollt	0	0,75	0,25	0,75	0,116
rudimentärer Schwanz	3,25	0,75	1,25	1,25	0,214
Farbintensität	5	5	5	4,5	0,26
Detailerkennbarkeit	3,5	3	3	3	0,444
Kontrast	3,5	3	3	3	0,031*

Auch in der Diff-Quick®-Färbung zeigten die Prävalenzen der ausgewerteten pathomorphologischen Merkmale keine signifikanten Abweichungen während der Lagerung (Tabelle 26). Bezogen auf den Gesamtanteil aller pathologischen Samenzellen offenbarten sich schwankende Mediane im Bereich von 13–14,5 %. Die Detailerkennbarkeit wies zu allen Auswertungszeitpunkten einen Zentralwert von 5 auf. Der Kontrast zeigte mit medianen Werten von 5,0 oder 5,5 niedrigere Ergebnisse zu den Messpunkten t_1 bis t_3 im Gegensatz zur ersten Beurteilung, bei der der mediane Kontrast 6,5 betrug. Es wurde ein p-Wert von 0,029 ermittelt. Nach der p-Wert-Adjustierung konnte jedoch kein statistisch signifikanter Paarvergleich mehr gefunden werden. Die deskriptive Statistik zeigte, dass einzig in der Diff-Quick®-

Färbung der Anteil abgelöster Köpfe über die Lagerungszeitpunkte anstieg, was in den anderen Färbemethoden nicht beobachtet wurde. Ohne Stresstest lag der mediane Anteil dieses Merkmals bei 0,5 % zu t_0 , 0,75 % zu t_1 , 1 % zu t_2 und stieg auf 1,25 % nach dreimonatiger Lagerung zu t_3 .

Tabelle 26: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Diff-Quick®-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p-Wert) der Abweichung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	13,25	14,5	13,75	13	0,558
Halsbruch	0,75	1	0,25	1,75	0,231
Schleifenform	5,5	4,75	5	6	0,854
aufgerollt	0,5	1,5	0	0,5	0,192
rudimentärer Schwanz	4	2,25	2	2,75	0,65
Farbintensität	5,5	5	5,5	5	0,165
Detailerkennbarkeit	5	5	5	5	0,522
Kontrast	6,5	5	5,5	5	0,029*

Mit Hemacolor® gefärbte Präparate zeigten in den ausgewerteten Pathomorphologie-Merkmalen keine signifikanten Abweichungen mit schwankenden Ausprägungen im zeitlichen Verlauf (Tabelle 27). Die medianen Gesamtanteile aller nicht physiologischen Spermien lagen zu t_0 und t_1 mit 17,75 % bzw. 16,75 % am höchsten, im Gegensatz zu 11,5 % zu t_2 und 12,25 % zum letzten Auswertungszeitpunkt.

In den drei Qualitätsmerkmalen wurden zur ersten Beurteilung die höchsten (Farbintensität = 5, Detailerkennbarkeit = 5, Kontrast = 5,5) und zur dritten Wiederholungsuntersuchung die niedrigsten Zentralwerte festgestellt (Farbintensität = 4, Detailerkennbarkeit = 4,5, Kontrast = 3,5). Die statistische Auswertung ergab für die Farbintensität einen p-Wert von 0,036 und einen p-

Ergebnisse

Wert von 0,021 für den Kontrast. Nach Durchführung der Bonferroni-Korrektur hat jedoch kein Paarvergleich mehr das Signifikanzniveau unterschritten.

Tabelle 27: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Hemacolor®-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p-Wert) der Abweichung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	17,75	16,75	11,5	12,25	0,086
Halsbruch	0,25	1,25	0,75	0,75	0,555
Schleifenform	5	5,75	4,5	5,25	0,874
aufgerollt	0,25	1	1	1	0,826
rudimentärer Schwanz	3	2,5	1,5	3,75	0,126
Farbintensität	5	4	4,5	4	0,036*
Detailerkennbarkeit	5	5	5	4,5	0,168
Kontrast	5,5	4,5	5	3,5	0,021*

Auch in der Spermac®-Färbung traten in drei der vier ausgewerteten Parameter sowie im Gesamtanteil aller Spermienpathologien schwankende Ausprägungen während der Lagerung auf. Beim Merkmal „Halsbruch“, welches bei den Wiederholungsuntersuchungen höhere mediane Prävalenzen ($t_0 = 0 \%$, $t_3 = 1,5 \%$) zeigte, wurde ein p-Wert von 0,016 errechnet. Nach der p-Wert-Adjustierung blieb ein signifikanter Paarvergleich zwischen t_2 und t_3 mit einem p-Wert von 0,047 bestehen (Tabelle 28).

Auffällig waren hohe Zentralwerte der drei Färbequalitäten, die zur ersten Beurteilung durchweg bei einem Wert von 7 lagen und zu t_3 deutlich niedriger ausfielen (Farbintensität = 3,5, Detailerkennbarkeit = 5, Kontrast = 4). Bei allen drei Qualitätsparametern konnten statistisch hochsignifikante p-Werte festgestellt werden (Farbintensität: $p = 0,002$, Detailerkennbarkeit: $p < 0,0001$, Kontrast: $p < 0,0001$) und es wurde infolgedessen eine Bonferroni-Korrektur mit Paarvergleichen durchgeführt. Das Merkmal „Farbintensität“ wies nach der

p-Wert-Adjustierung zwei signifikante Paarvergleiche zwischen t_0 und t_1 sowie zwischen t_0 und t_3 , jeweils mit $p = 0,047$, auf. Bei der Detailerkennbarkeit konnten bei allen drei Paaren im Vergleich zu t_0 statistisch signifikante p-Werte identifiziert werden (Paar t_0-t_1 $p = 0,047$, Paar t_0-t_2 $p = 0,023$, Paar t_0-t_3 $p = 0,012$). Auch die Unterschiede der Kontrastwerte zu den drei Untersuchungszeitpunkten t_{1-3} waren jeweils in den Paarvergleichen mit t_0 statistisch signifikant (Paar t_0-t_1 $p = 0,047$, Paar t_0-t_2 $p = 0,023$, Paar t_0-t_3 $p = 0,012$).

Das Kriterium „Akrosom nicht vorhanden“ wurde aufgrund geringer Prävalenzen innerhalb aller Färbemethoden nicht statistisch ausgewertet. In der deskriptiven Statistik konnte an Spermac®-gefärbten Präparaten im Verlauf der Lagerungsdauer ein konstant steigender medianer Anteil von 0 % zu t_0 bis 0,75 % zu t_3 beobachtet werden.

Tabelle 28: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Spermac®-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p-Wert) der Abweichung (Fett = $p \leq 0,05$)

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	20,25	19,25	21	26	0,107
Halsbruch	0	1	0,75	1,5	0,016
Schleifenform	8,75	7,5	10,5	8,25	0,872
aufgerollt	1	1	1,5	1	0,422
rudimentärer Schwanz	2,5	3,5	1,5	2,5	0,320
Farbintensität	7	5	4	3,5	0,002
Detailerkennbarkeit	7	6	5	5	< 0,0001
Kontrast	7	5	5	4	< 0,0001

Die mit Formolzitrat-Bengalrosa gefärbten Präparate wiesen in den statistisch ausgewerteten Pathologiemerkmalen leicht schwankende Prävalenzen im Verlauf der Lagerung im Vergleich zur sofortigen Auswertung auf. Im Verlauf

der Lagerung lagen die Zentralwerte der Farbintensität konstant bei 6. Die beiden weiteren Qualitätskriterien „Detailerkennbarkeit“ und „Kontrast“ zeigten von t_1 zu t_3 sinkende Mediane, jeweils von 6 auf 5 (Tabelle 29).

Auffällig in dieser Färbemethode war, wie in Kapitel 4.2.6 bereits erwähnt, ein hoher Anteil lanzenförmiger Spermienköpfe mit 5,2 % (Median = 2,25 %) bei der direkten Auswertung ungestresster Samenzellen. In den Folgeuntersuchungen war dieses Merkmal ohne Stresstest im Median nur zu 0 % (Mittelwerte: $t_1 = 0,1$ %, $t_2 = 0,05$ %, $t_3 = 0$ %) vertreten. Diese Tendenz konnte auch in Präparaten gestresster Spermien mit allen vorangegangenen Lagerungstemperaturen festgestellt werden. Die Zentralwerte gestresster Samenzellen lagen zwischen 2 und 4 % zum ersten Auswertungszeitpunkt, während die Mediane zu t_{1-3} jeweils bei 0 % lagen (Abbildung 23).

Tabelle 29: Vergleich der Ergebnisse (Pathomorphologie als Mediane in %, Qualitätsmerkmale von 1–7) an Formolzitrat-Bengalrosa-gefärbten Präparaten ohne Stresstest zu t_{0-3} mit statistischer Relevanz (p -Wert) der Abweichung

Merkmal	Auswertungszeitpunkt				p-Wert
	t_0	t_1	t_2	t_3	
Gesamtanteil Spermien mit Pathomorphologie	22,25	18	16,5	18,5	0,902
Halsbruch	1	1,25	1,25	1	0,135
Schleifenform	8,25	8,5	6,75	10	0,326
aufgerollt	0,5	1,5	1,25	1,75	0,568
rudimentärer Schwanz	1	0,5	1,5	1	0,069
Farbintensität	6	6	6	6	0,311
Detailerkennbarkeit	6	6	5,5	5	0,06
Kontrast	6	6	5	5	0,193

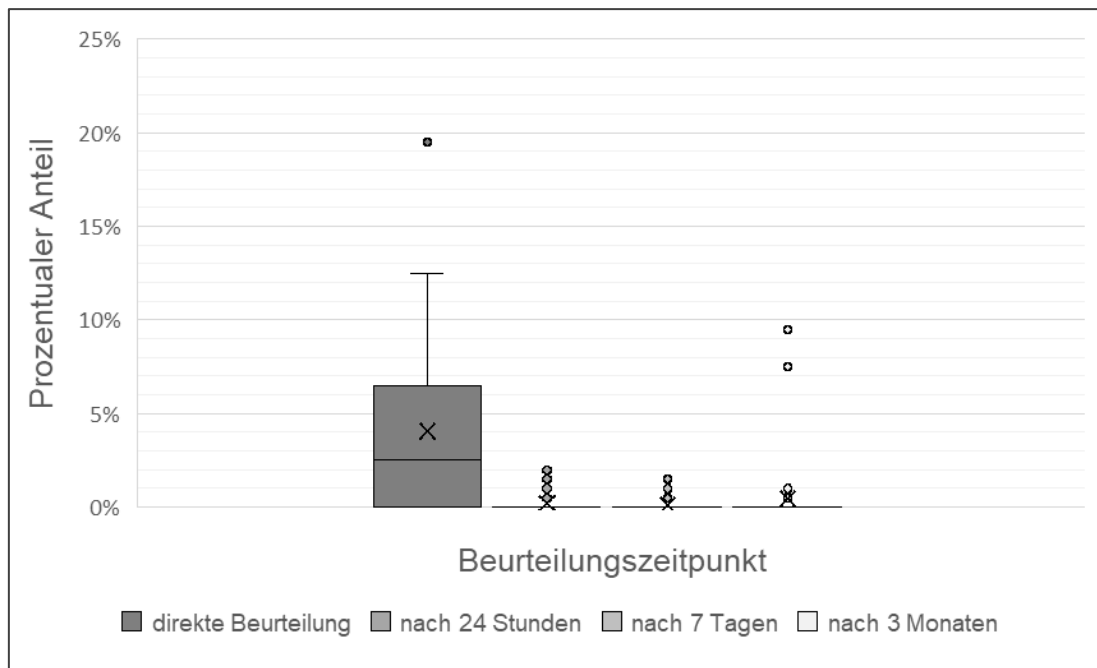


Abbildung 23: Darstellung von Median, Mittelwert (X), oberem und unterem Quartil lanzenförmiger Spermienköpfe in der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa mit und ohne Stresstest über die vier Auswertungszeitpunkte hinweg

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In der Reproduktionsmedizin von Hunden hat die Besamung mit kryokonserviertem Rüdensperma zunehmend an Bedeutung gewonnen (Peña et al., 2006; Dorado und Ortiz, 2025).

Die Qualitätskontrolle der zur Verwendung bestimmten Samenzellen ist ein essenzieller Bestandteil des Prozesses und wird von spezialisierten Praxen und Laboren vor der Besamung bzw. Kryokonservierung durchgeführt. Dabei sind neben der Vitalität, der Spermiedichte und dem mikrobiologischen Status insbesondere die Morphologie der einzelnen Spermatozoen von entscheidender Bedeutung für den Befruchtungserfolg (Bujan et al., 1988; Oettlé, 1990).

Für Rüdensperma gelten unterschiedliche Qualitätsstandards bezüglich der morphologischen Integrität der Spermien. Je nach Angaben in der Literatur werden beim Rüden zwischen 20 und 30 % (Busch und Waberski, 2007), maximal 20 % (Dreier, 2010) bzw. 10–25 % pathologische Spermienformen (Günzel-Apel, 2016) als normal eingestuft. Ein erhöhter Anteil morphologisch abweichender Spermatozoen korreliert negativ mit der Befruchtungsfähigkeit (Oettlé, 1990) und kann zu reduzierten Befruchtungsraten führen. Laut Kolster (2018) zählt die Spermienmorphologie beim Rüden neben der Gesamt-Spermienzahl und Viabilität zu den drei wichtigsten Kriterien zur Beurteilung der Samenqualität.

Die lichtmikroskopische Beurteilung nativer Spermaproben ist aufgrund des geringen Kontrastes zum ungefärbten Hintergrund und der limitierten Detailerkennbarkeit nur eingeschränkt möglich. Zur Verbesserung der Sichtbarkeit morphologischer Normabweichungen werden daher verschiedene Färbemethoden eingesetzt.

Die vorliegende Studie hatte das Ziel, diverse etablierte Färbemethoden für canine Spermatozoen hinsichtlich ihrer Effektivität in der Darstellung der Morphologie zu evaluieren. Es wurde untersucht, ob die Stresstests in Form unterschiedlicher Lagerungstemperaturen nach dem Auftauen eine erhöhte Zahl pathologisch veränderter Samenzellen provozieren, um die statistische Aussagekraft über die Färbequalität der verschiedenen Ausstriche zu

verbessern. Zusätzlich wurden wirtschaftliche Aspekte, wie der Zeit- und Kostenaufwand analysiert und die Archivierbarkeit der Präparate geprüft. Das übergeordnete Ziel war die Optimierung und Qualitätssicherung der Evaluierung von TG-Rüdensperma in veterinärmedizinischen Einrichtungen. Aufwändigere Untersuchungsmethoden, wie Fluoreszenz- oder Nukleinsäurefärbungen, die spezielle Ausrüstung erfordern und primär in der Forschung angewandt werden, waren nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Auch wenn die Literatur zu den angewandten Färbemethoden teilweise auf älteren Primärstudien basiert, werden diese seit ihrer Etablierung weitgehend unverändert angewandt. Sie gelten somit als methodisch stabil. Die historische Entwicklung an Samenzellen verschiedener Säugetiere ist gut dokumentiert, es existiert jedoch nur eine begrenzte Anzahl aktueller Arbeiten, die sich speziell auf die pathomorphologische Beurteilung von Rüdenspermien beziehen. Ebenso wurde der Einfluss unterschiedlicher Stressbedingungen auf die Prävalenz morphologischer Abweichungen, die Lagerfähigkeit sowie wirtschaftliche Unterschiede bislang kaum systematisch untersucht. Daher wurden diese Aspekte in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. Für die Fragestellung stellt die vorhandene Literaturlage somit eine belastbare Grundlage dar und besitzt weiterhin diagnostische Relevanz.

5.2 Diskussion der Methodik

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Spermienproben von zehn fertilen Zuchtrüden aus der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde in Gießen verwendet, um ein realitätsnahes Untersuchungsszenario abzubilden. Das untersuchte Probenkollektiv setzte sich aus acht verschiedenen Hunderassen zusammen (Border Collie, Rhodesian Ridgeback, Mastiff, American Bulldog, Briard, Deutscher Schäferhund, Eurasier und American Akita). Dadurch wurde eine repräsentative und praxisnahe morphologische Ausgangslage abgebildet. Als Verdünnungsmedium kam einheitlich das etablierte Uppsala Equex-2 System zum Einsatz. Pro Rüde wurden zwei Pailletten zu je 0,5 ml entsprechend den Empfehlungen der WHO (World Health Organization, 2010) aufgetaut. Nicht auszuschließen ist, dass der Verdüner Einfluss auf die Färbeergebnisse nimmt. Dieser Aspekt sollte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Vor der Kryokonservierung erfolgte eine Eingangsuntersuchung (t_{-1}) durch Mitarbeitende des Kliniklabors, einschließlich pathomorphologischer Beurteilung. Diese Eingangsdaten wurden einbezogen, um Veränderungen der Pathomorphologie infolge des Tiefgefriervorgangs analysieren zu können. Ihre Vergleichbarkeit mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten war aufgrund methodischer Unterschiede jedoch erschwert. So konzentrierte sich die Eingangsuntersuchung im klinischen Routinelabor standardmäßig auf vier Hauptdefekte (Schleifenform, geknickter Schwanz, Plasmotropfen, abgelöster Kopf) in Eosin-Färbung. Zusätzliche pathomorphologische Merkmale wurden manuell ergänzt. Die Analyse der aufgetauten Samenzellproben im Rahmen dieser Studie hingegen umfasste sechs Färbemethoden, einschließlich Eosin. Ein methodischer Vorteil der Untersuchung ist, dass Eosin sowohl vor als auch nach der Kryokonservierung einheitlich angewendet wurde, was einen direkten Vergleich erlaubte, während die weiteren Färbemethoden mögliche Effekte abweichender Färbungen abbildeten. Da die untersuchende Person zu t_{-1} nicht dokumentiert wurde, sind Beobachter-Einflüsse nicht auszuschließen. Auch die präanalytischen Bedingungen konnten nicht detailliert nachvollzogen werden. Diese Limitationen sollten bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Die Besamung mit TG-Sperma beim Rüden nimmt im Vergleich zum Natursprung oder der Besamung mit frischem oder gekühltem Samen derzeit einen kleineren Anteil ein. Sie ermöglicht jedoch die Nutzung genetisch wertvoller Zuchtrüden über große Distanzen und Zeiträume hinweg und zeigt einen zunehmenden Anwendungstrend (Domain et al., 2024). Da bei den kryokonservierten Spermienproben eine geringe Prävalenz morphologischer Auffälligkeiten zu erwarten war, wurden drei Fraktionen zunächst einem zweistündigen Stresstest unterzogen (bei 6 °C, 18 °C und 37 °C). Eine vierte Fraktion diente als ungestresste Kontrolle und wurde unmittelbar weiterverarbeitet. Ziel war es, dadurch die Häufigkeit pathomorphologischer Formen zu erhöhen (Batista et al., 2012; Cunha et al., 2014; Hori et al., 2014). Des Weiteren wurde geprüft, ob die Färbequalität bei geschädigten Spermien verändert wird oder ob die Stresstests generell einen Einfluss auf die Färbemethoden haben. Für zukünftige Studien wäre eine noch höhere

Prävalenz pathologischer Samenzellen wünschenswert, um die Aussagekraft der Daten weiter zu stärken.

Für den Methodenvergleich wurden sechs in der Tiermedizin etablierte Färbemethoden für die Untersuchung von Rüdenspermien ausgewählt. Der Fokus lag nicht auf einer erneuten methodischen Validierung, sondern auf dem direkten Vergleich der praktischen Anwendbarkeit und der Färbequalität. Ein Teil der Färbemittel ist als kommerziell vorgefertigtes Set erhältlich (Diff-Quick®, Hemacolor®, Spermac®). Die genutzten Färbemethoden waren entweder bereits im Kliniklabor vorhanden oder wurden gezielt beschafft. Als Anleitung für die Präparation der Ausstriche dienten die jeweiligen Packungsbeilagen (Diff-Quick®, Hemacolor®, Spermac®, Eosin, Eosin-Nigrosin) bzw. Angaben in der Literatur (Formolzitrat-Bengalrosa). Zur Herstellung eines mit Formolzitrat-Bengalrosa gefärbten Präparats wurde die Zusammenstellung nach Riesenbeck et al. (2001) angewandt (vgl. 3.4.6). Uneinheitliche Angaben zur Fixierungsdauer, Färbezeit und zu den Bedingungen der Lagerung in der Literatur erschweren jedoch die Vergleichbarkeit mit anderen Studien.

Ein grundsätzlich limitierender Faktor aller Färbemethoden besteht darin, dass Farbstoffe selbst Schäden an Spermien hervorrufen oder Artefakte erzeugen können (Banaszewska et al., 2015; Czubaszek et al., 2019). Auch während der Präparation und Trocknung können, insbesondere bei Ausstrichpräparaten, Artefakte oder mechanisch bedingte Veränderungen der Spermienmorphologie entstehen. Hierzu zählen beispielsweise Deformationen der Spermenschwänze, Schleifenformen oder abgelöste Köpfe sowie Lufteinschlüsse, Kristallbildungen und Pigmentansammlungen. Bemerkenswert war das vermehrte Auftreten lanzenförmiger Spermienköpfe zu t0 (\bar{x} = 5,2 %, Md = 2,25 %), welche zu 83,9 % in der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung identifiziert wurden, deren Prävalenz jedoch in den Folgeuntersuchungen stark abnahm. Dies spricht für eine geringe Reproduzierbarkeit und legt nahe, dass es sich eher um ein durch die Färbemethode bedingtes Artefakt als um eine stabile Pathologie handelte. Morphologisch entspricht diese Form nicht abgeflachten Spermienköpfen, die sich zum Zeitpunkt der Auswertung offenbar noch nicht vollständig auf der

Fläche des Objektträgers abgelagert hatten. Obwohl gemäß Literatur eine 30-minütige Lagerungszeit zur Abflachung vorgesehen ist (Hoffmann, 2003; Moritz, 2013), deuten die Befunde darauf hin, dass diese Dauer an aufgetauten TG-Rüdenspermien nicht ausreichend war. Eigene Beobachtungen zeigten bereits deutlich geringere Häufigkeiten nach mehr als 45 Minuten. Künftige Untersuchungen sollten daher ermitteln, welche Abflachungszeit zu einer Minimierung dieses Artefakts führt, um die Präparationsqualität zu erhöhen. Darüber hinaus zeigten sich in der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung trotz identischer Abflachungszeit je nach vorangegangenem Stresstest unterschiedliche Häufigkeiten lanzenförmiger Spermienköpfe. Das deutet darauf hin, dass die Temperaturbelastung die Zellstruktur und somit die benötigte Abflachungszeit beeinflussen kann. Da es sich um nicht fixierte Nasspräparate handelt, können zeitabhängige Prozesse nach dem Auftauen ungehindert ablaufen. Die heterogene Verteilung der Werte (Abbildung 22), insbesondere in der ungestressten Kontrollgruppe, legt zudem nahe, dass einzelne Proben mit hoher Ausprägung dieses Artefakts den Mittelwert aufgrund der geringen Stichprobengröße übermäßig beeinflussten, während der Median die tatsächliche Verteilung realistischer widerspiegelt.

Auf die Herstellung und Anfärbung der Präparate folgte die pathomorphologische und qualitative Beurteilung der caninen Samenzellen. Sie erfolgte entsprechend den Kriterien von Busch und Waberski (2007), indem 200 Samenzellen mit einem elektronischen Zählgerät erfasst wurden. Diese Zahl entspricht zwar einer vergleichsweise kleinen Stichprobe, ist jedoch durch die Vorgaben in der Literatur gedeckt und entspricht dem Standard vieler Studien. Bei geringer Prävalenz pathologischer Formen kann die Aussagekraft der Daten daher eingeschränkt sein. Da entsprechend dem empfohlenen Standard auch bei Vorliegen mehrerer Abweichungen nur die schwerwiegendste notiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass dadurch gewisse Anomalien überlagert werden (Oettlé, 1993).

Die Beurteilung der Spermienpathomorphologie orientierte sich grundsätzlich an den Vorgaben des WHO-Handbuchs und wurde zudem an die in der veterinärmedizinischen Literatur üblichen Einteilungskriterien angepasst

(Hoffmann, 2003; Dreier, 2010; Günzel-Apel, 2016; Kolster, 2018; Chłopik und Wysokińska, 2020). Zur Analyse der qualitativen Eigenschaften der Färbemethoden wurden die Parameter Farbintensität, Kontrast und Detailerkennbarkeit systematisch erfasst. Weitere Auffälligkeiten wurden separat dokumentiert. Die Erfassung auf einer siebenstufigen ordinalen Skala ermöglichte eine differenzierte Betrachtung der Färbequalität. Aufgrund der fehlenden Intervallskalierung wurden Mediane anstelle von Mittelwerten verwendet. Die daraus abgeleiteten statistischen Aussagen beziehen sich daher auf Rangfolgen, wodurch sowohl die Vergleichbarkeit als auch die Stärke der beobachteten Unterschiede nur einschränkt beurteilt werden kann. Um den subjektiven Einflussfaktor der Bewertung möglichst klein zu halten, erfolgte die Beurteilung aller Präparate durch eine einzelne Untersucherin. Dies verhindert eine interindividuelle Variabilität, kann jedoch gleichzeitig die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch andere Untersucher einschränken (Martínez, 2004). Eine Herausforderung stellte die Befundung enganliegender Schleifenformen dar. Diese können je nach Färbemethode und Darstellungsqualität mit geknickten oder rudimentären Schwanzenden verwechselt werden. Das kann wiederum zu Abweichungen hinsichtlich ihrer Zuordnung führen. Dies könnte plausibel den beobachteten Rückgang geknickter und gleichzeitig den Anstieg schleifenförmiger Spermischwänze nach der Kryokonservierung erklären. Im Rahmen dieser Studie wurde eine möglichst hohe Konsistenz der Befunde durch ein praxisorientiertes, intensives Training unter Anleitung erfahrener Labormitarbeiter der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde gewährleistet (Agarwal et al., 2022). Dennoch lassen sich subjektive Einflüsse innerhalb eines Untersuchers grundsätzlich nicht vollständig ausschließen.

Zusätzlich erfolgte ein umfangreicher Vergleich der Wirtschaftlichkeit der sechs Färbemethoden unter realitätsnahen Bedingungen. Hierzu wurden der zeitliche und der finanzielle Aufwand detailliert dokumentiert. Einen methodischen Einfluss hatte die empfohlene Vergrößerung zur mikroskopischen Beurteilung der Samenzellen (World Health Organization, 2010). Bei 400-facher Vergrößerung (z. B. Eosin-Färbung) können mehr Spermien pro Gesichtsfeld erfasst werden, wodurch die Auswertung schneller erfolgen kann. Gleichzeitig ermöglicht die 1000-fache Vergrößerung mit

Ölimmersion (z. B. Eosin-Nigrosin-Färbung) eine präzisere Erkennung pathologischer Veränderungen, wenn auch verbunden mit einem höheren Zeitaufwand. Die Unterschiede der empfohlenen Vergrößerung schränken die direkte Vergleichbarkeit der Methoden hinsichtlich des Zeitaufwands zur Befundung ein. Eosin und Eosin-Nigrosin werden routinemäßig auch zur Beurteilung der Spermiovitalität eingesetzt. Für diese beiden Methoden wurde zusätzlich der zeitliche Aufwand für die Vitalitätsdiagnostik festgehalten. Ein direkter methodischer Vergleich dieser wird durch die abweichenden Vergrößerungen ebenfalls eingeschränkt.

Der finanzielle Aufwand beinhaltet die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Färbemittel sowie Arbeitskosten, die von der Präparationsdauer abhängen. Fixkosten wie die Grundausstattung eines Labors oder Geräteabschreibungen wurden bewusst ausgeklammert, da sie alle Färbemethoden gleichermaßen betreffen. Teils deutliche Schwankungen der Färbemittelkosten in Abhängigkeit vom individuellen Verbrauch führten zu einer erschwerten direkten Vergleichbarkeit. Insbesondere bei Diff-Quick® und Hemacolor® hatten hohe Verbräuche bis zu 17 % bzw. 55 % höhere Gesamtkosten zur Folge. Mengenrabatte oder günstigere Einkaufskonditionen wurden nicht berücksichtigt, haben jedoch einen großen Einfluss auf die wirtschaftliche Beurteilung einzelner Methoden. Die ermittelten Materialkosten beziehen sich zudem auf den Stichtag 28.10.2024 und unterliegen wirtschaftlichen Schwankungen sowie der Inflation.

Für eine realistische Einschätzung der Wirtschaftlichkeit wurde der gesamte Zeitaufwand je Präparat und Färbemethode den aktuellen Arbeitskosten gegenübergestellt und mit den Materialkosten addiert. So wurde verhindert, dass materialgünstige, aber in der Präparation zeitintensive Methoden fälschlicherweise als besonders wirtschaftlich erscheinen. Der Arbeitsaufwand wurde inklusive aller Trocknungs- und Wartezeiten erfasst. In der Praxis könnten diese jedoch potenziell effizient mit anderen Tätigkeiten kombiniert werden. Somit ergab sich ein realitätsnahes und gleichzeitig konservatives Abbild der zeitlichen Belastung. Die Höhe des Stundenlohns stellt mit 12,69 € grundsätzlich einen wichtigen Einflussfaktor dar. Abweichungen davon beeinflussen zwar die absoluten Gesamtkosten, das relative Verhältnis der Färbemethoden zueinander bleibt jedoch bestehen.

Aus gutachterlichen Gründen kann es erforderlich sein, die Spermienmorphologie von Zuchtrüden zu dokumentieren und zu archivieren. Zur Beurteilung der Lagerstabilität wurden die Präparate von fünf der sechs Färbemethoden (Ausnahme: Formolzitrat-Bengalrosa) unter einem Deckglas mit Entellan® konserviert und trocken sowie lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Durch das Aufbringen des Deckglases können Lufteinschlüsse entstehen. Zudem sind trotz Fixierung insbesondere im Randbereich artefaktuelle Veränderungen, etwa durch Oxidation, Farbstoffdiffusion oder lokale Austrocknung, nicht auszuschließen. Die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung stellte als unfixiertes Nasspräparat eine Besonderheit dar. Die entfallende Konservierung erleichtert die praktische Anwendung geringfügig. Gleichwohl erhöht dies grundsätzlich das Risiko für mikrobielle Beeinträchtigungen oder physikalisch bedingte zeitabhängige Veränderungen.

Neben der direkten Auswertung erfolgten Wiederholungsuntersuchungen nach 24 Stunden, 7 Tagen und 3 Monaten, bei denen sowohl Veränderungen der Pathomorphologie als auch die Färbequalität beurteilt wurden. In die statistische Auswertung der Lagerstabilität der Färbemethoden wurden lediglich ungestresste Spermien einbezogen, um temperaturinduzierte Schädigungen nicht mit Lagerungseffekten zu vermischen. Dieses Vorgehen bildet ein realitätsnahes Szenario der in der Regel hochwertigen Proben von Deckrüden ab. Die Stresstests erfolgten vor der Präparation, sodass kein direkter Einfluss auf die Lagerung der fixierten Präparate zu erwarten ist. Im Verlauf zeigten sich, bis auf die zuvor erwähnten Abweichungen der Prävalenz lanzenförmiger Spermien in Formolzitrat-Bengalrosa, keine relevanten Unterschiede zu gestressten Proben. Potenzielle Wechselwirkungen zwischen vorgeschädigten Spermien und der Aufbewahrungsdauer lassen sich jedoch nicht vollständig ausschließen.

Zusätzlich wurde geprüft, ob sich die sechs Färbemethoden für eine automatisierte pathomorphologische Analyse mittels CASA-System (AndroVision®) bei TG-Rüdenspermien eignen. Der Vorteil einer computergestützten Auswertung liegt in ihrer Objektivität mit automatisierter Beurteilung. Dadurch können im Idealfall reproduzierbare Ergebnisse mit minimalen subjektiven Einflüssen bei kurzer Auswertungszeit erzielt werden.

Zusätzlich liegen die Daten sofort digital vor, was einen zeitsparenden Faktor darstellen kann. An einer zufällig ausgewählten Probe erfolgten Konfiguration und Auswertung anhand der Bedienungsanleitung und in enger Abstimmung mit Mitarbeitenden der Herstellerfirma. Dabei wurden die Sensitivitätsparameter der Software zur Optimierung des Kontrasts angepasst. Die CASA-Software erfasst jedoch lediglich die drei Kategorien „intakte Samenzelle“, „Kopfdeformation“ und „Mittelstückdefekt“, was ihre Aussagekraft einschränkt. Eine manuelle Nachklassifikation zu weiteren Spermien-Pathologien ist zwar möglich, würde jedoch den Zeitvorteil der Automatisierung verhindern. Zudem würde erneut ein subjektiver Faktor in die Ergebnisse einfließen.

Die Überprüfung der automatisch zugeordneten Merkmale anhand der gespeicherten Samenzell-Aufnahmen zeigte eine hohe Rate an Fehlzugeordnungen. Eine zuverlässige automatisierte Analyse von Rüdenspermien konnte trotz intensiver Anpassungen nicht erreicht werden. Bei der Spermac®-Färbung war zudem kein Ergebnis-Export möglich. Der Fokus der vorliegenden Studie lag auf den automatisch generierten Ergebnissen der CASA-Untersuchung bei Verwendung der empfohlenen Messparameter ohne eine manuelle Nachklassifikation. Die grundsätzlich notwendige Kalibrierung war mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden. Dies hatte zur Folge, dass eine erwartete Zeitersparnis nicht realisiert werden konnte. Eine manuelle Nachklassifikation hätte diesen Effekt weiter verstärkt. Die pathomorphologische Auswertung im Vergleich der sechs Färbemethoden konzentrierte sich daher auf die rein subjektive, manuelle Beurteilung. Dies erhöhte zum einen die Vergleichbarkeit innerhalb dieser Studie. Zum anderen begrenzte es jedoch die grundsätzliche Objektivierbarkeit der Daten sowie Aussagen zu CASA-Auswertungen.

Die statistische Auswertung beschränkte sich auf Pathomorphologien mit hoher Prävalenz, um trotz der Vielzahl an Parametern und Kombinationsmöglichkeiten eine robuste Bewertung der Färbemethoden zu erzielen. Dies hatte grundsätzlich eine eingeschränkte Aussagekraft für seltene oder komplexe Veränderungen zur Folge. Zudem lag in vielen Fällen keine Normalverteilung der Daten vor, weshalb nichtparametrische Tests

eingesetzt wurden. Die fehlende Normalverteilung ist vor allem auf die geringe Stichprobengröße von zehn Proben, biologische Unterschiede zwischen ebendiesen sowie einzelne Ausreißer zurückzuführen. Zudem erfolgte die Einteilung der morphologischen Veränderungen in klar abgegrenzte Kategorien, was zu einer stufenartigen Verteilung führt. Die Verteilung der Werte war häufig asymmetrisch, da seltene Pathologien nur in wenigen Proben hohe Werte aufwiesen. Auch wenn nichtparametrische Tests robust gegenüber Ausreißern und nicht-normalverteilten Daten sind, erschwerte ihre geringe Teststärke bei kleinen Stichproben die Vergleichbarkeit zwischen Studien. Diese Limitation ist im Hinblick auf die geringe Probenanzahl zu berücksichtigen.

Die vorliegende Methodik zeichnet sich durch eine hohe Praxisnähe aus. Es wurden ausschließlich kryokonservierte Proben von Zuchtrüden verwendet, die auch routinemäßig in der tierärztlichen Reproduktionsmedizin eingesetzt werden. Durch die Auswahl etablierter Färbemethoden sowie eine umfassende Bewertung unter realitätsnahen Bedingungen konnte ein differenziertes Bild der Eignung für die pathomorphologische Beurteilung gewonnen werden. Die Vergleichbarkeit innerhalb der Untersuchung wurde durch die Erhebung qualitativer Parameter und die standardisierte Auswertung durch eine geschulte Person erhöht. Gleichzeitig schränkte dies jedoch die Übertragbarkeit auf andere Untersuchende ein. Zudem zeigte sich, dass einige methodische Ansätze ihre angestrebte Funktion nur bedingt erfüllten: Während die Stresstests lediglich bei 37 °C eine signifikante Erhöhung der Pathomorphologie-Prävalenz bewirkten, erwies sich der Einsatz des CASA-Systems für die pathomorphologische Beurteilung von TG-Rüdenspermien als nicht geeignet. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterführender methodischer Anpassungen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Wirtschaftlicher Aufwand

5.3.1.1 Zeitlicher Aufwand

Die Arbeitszeiten zur Herstellung und Auswertung der Präparate sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Spanne zwischen der schnellsten und der zeitlich aufwendigsten Methode betrug 27,36 Minuten (Eosin: 3,17 Min. \pm 0,14, Formolzitrat-Bengalrosa: 30,53 Min. \pm 0,03).

Auffällig war, dass die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung trotz einer durchschnittlich nur 0,53 Minuten langen tatsächlichen Herstellungszeit aufgrund der hier erforderlichen 30-minütigen Wartezeit zur Abflachung der Spermienköpfe insgesamt den größten Zeitbedarf aufwies. Ohne diese Lagerungsphase wäre sie hingegen die mit Abstand zeitsparendste Färbung. Die Notwendigkeit dieser Wartezeit ergibt sich daraus, dass die Spermien suspension tropfenförmig auf den Objektträger aufgebracht und lediglich mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde, anstatt ausgestrichen zu werden. Die standardisierte Dauer von 30 Minuten erwies sich retrospektiv als zu knapp bemessen. Beobachtungen während der Untersuchung deuteten darauf hin, dass bis zu 60 Minuten notwendig sein könnten, um Fehlinterpretationen der Kopfform zu vermeiden. Daher erscheinen weitere Untersuchungen zur Optimierung dieser Wartezeit an Rüdenspermien sinnvoll.

Die Spermac®-Färbung erwies sich aufgrund zahlreicher Arbeitsschritte und unterschiedlicher Eintauchzeiten ebenfalls als vergleichsweise zeitintensiv (Herstellungszeit: 25,2 Min. \pm 0,06). Zwar erlaubt die 15-minütige erste Trocknungsphase eine gewisse zeitgleiche Ausführung mit anderen Labortätigkeiten, dennoch lässt sich diese Methode nur schwierig effizient in den Routinebetrieb integrieren. Eine Reduktion des Zeitaufwands der Herstellung ist daher nur bedingt möglich, da andernfalls eine erhöhte Fehleranfälligkeit zu erwarten wäre. Im Gegensatz dazu lässt sich die 30-minütige Lagerungszeit bei der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung vermutlich besser in den Laboralltag integrieren.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Auswertungsdauer war die verwendete Vergrößerung. Bei 400-facher Vergrößerung können mehr Spermien gleichzeitig im Gesichtsfeld erfasst werden, was die Auswertung beschleunigt. Währenddessen erlaubt die 1000-fache Vergrößerung unter Immersionsöl eine präzisere Beurteilung, bei der weniger Samenzellen auf einen Blick erkennbar sind. Zwei der drei unter 1000-facher Vergrößerung analysierten Methoden (Eosin-Nigrosin und Formolzitrat-Bengalrosa) wiesen auch die längsten mittleren Auswertungszeiten auf. Die Spermac®-Färbung stellt eine Ausnahme dar: Trotz 1000-facher Vergrößerung lag ihre mittlere Auswertungsdauer mit 4,71 Minuten auf einem vergleichbaren Niveau wie die bei 400-facher Vergrößerung beurteilten Methoden (4,65–4,98 Minuten), was möglicherweise auf die besonders gute Färbequalität bei direkter Auswertung zurückzuführen ist.

Die schnellste Herstellung gelang mit Eosin (3,17 Min. \pm 0,14) und Eosin-Nigrosin (3,77 Min. \pm 0,27), da bei beiden Methoden kein Nativausstrich erforderlich war. Dabei ergab sich die Differenz aus dem zusätzlichen Vermischen mit der Nigrosin-Farblösung auf dem Objektträger. Beide Methoden bieten zusätzlich die Option der Vitalitätsbeurteilung. Der hierzu erforderliche zeitliche Mehraufwand war bei beiden Verfahren nahezu identisch und wurde separat dokumentiert, da diese Funktion bei den anderen Färbungen nicht gegeben ist.

Die Färbemethoden Diff-Quick® und Hemacolor® benötigen jeweils einen Nativausstrich und erfordern feste Eintauchzeiten, was zu längeren Herstellungszeiten führt. In beiden Fällen entfiel ein Großteil des zeitlichen Aufwands, ähnlich wie bei Eosin und Eosin-Nigrosin, auf Trocknungszeiten. Der Unterschied in den Trocknungszeiten zwischen Eosin und Eosin-Nigrosin erklärt sich durch das größere Flüssigkeitsvolumen bei letzterem Verfahren, was eine im Mittel um 0,51 Minuten längere Trocknung erforderte.

Insgesamt zeigten sich deutliche Unterschiede im zeitlichen Aufwand der sechs Färbemethoden. Als besonders zeitsparend erwiesen sich Eosin, Diff-Quick®, Hemacolor® und Eosin-Nigrosin.

5.3.1.2 Kostenaufwand

Die untersuchten Färbemethoden zeigten hinsichtlich der Kosten teils deutliche Unterschiede pro Präparat (Tabelle 8). Während die Eosin-Färbung mit 0,13 € die geringsten Kosten verursachte, stellte sich Hemacolor® bei hohem Verbrauch mit bis zu 2,28 € als die kostenintensivste Methode dar, was einer Differenz von bis zu 2,15 € entspricht. Bei geringerem Verbrauch war hingegen Spermac® mit 1,04 € je Präparat am teuersten, wodurch sich eine Differenz von 0,91 € zur kostengünstigsten Methode ergab.

Eine grundlegende Erkenntnis war, dass nicht kommerziell vorgefertigte Färbemethoden, wie die Eosin-, Eosin-Nigrosin- oder die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung, mit deutlich geringeren Kosten verbunden waren. Die Farblösungen dieser Methoden lagen jeweils nur bei 0,01 € je Präparat. Den größten Anteil an den Gesamtkosten machten Verbrauchsmaterialien mit durchschnittlich 0,16–0,26 € aus. Bei kommerziellen Färbesets wie Diff-Quick®, Hemacolor® und Spermac® hingegen hatten die vergleichsweise hohen Preise der Farblösungen einen hohen Anteil der Materialkosten.

5.3.1.3 Gesamtkosten

Unter Einbezug der benötigten Arbeitszeit verschiebt sich die Rangfolge bezogen auf die Gesamtkosten teils deutlich (Tabelle 9). So relativieren sich die Vorteile kostengünstiger, aber zeitaufwändiger Färbemethoden ebenso wie die Nachteile kostenintensiver, jedoch schnell durchführbarer Verfahren. Unter Berücksichtigung eines Arbeitslohns von 12,69 € pro Stunde ergaben sich Gesamtkosten zwischen 1,85 € (Eosin) und 7,85 € (Formolzitrat-Bengalrosa), was einer Differenz von 6,00 € pro Objektträger entspricht.

Besonders deutlich wird der Einfluss längerer Wartezeiten (> 5 Minuten). Werden diese effizient in den Laborablauf integriert, reduziert sich der Aufwand für die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung auf 1,51 €, für Spermac® auf 4,19 €. In diesem Szenario läge die Differenz zwischen der kostenintensivsten (Hemacolor®: 4,49 €) und der günstigsten Methode (Formolzitrat-Bengalrosa: 1,51 €) nur noch bei 2,98 € je Präparat, wodurch sich das Kostenverhältnis erheblich verändert.

Insgesamt ist die Eosin-Färbung sowohl in Bezug auf Materialkosten als auch auf die Arbeitszeit als besonders ökonomisch vorteilhaft einzustufen. Auch die

Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung kann bei effizientem Zeitmanagement eine preiswerte Alternative darstellen. Im Gegensatz dazu erscheinen Diff-Quick® und Hemacolor® bei hohem Reagenzienverbrauch sowie Spermac® aus wirtschaftlicher Sicht weniger günstig.

5.3.2 Färbemethoden

Die Auswertung der Ergebnisse zeigt, dass alle sechs untersuchten Färbemethoden grundsätzlich für die Beurteilung kryokonservierter Rüdenspermien geeignet sind. Unter Berücksichtigung aller Auswertungszeitpunkte und Stresstests erzielte die Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa die höchste mediane Gesamt-Färbequalität, bestehend aus den Parametern Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast, auf (Md FQ = 6). Gleichzeitig wies die Spermac®-Färbung zum Zeitpunkt t_0 mit einem Zentralwert von 7 besonders hohe Werte auf. Dies zeigt, dass sich einzelne Färbemethoden in speziellen Anwendungsszenarien, wie zum Beispiel bei einer sofortigen Beurteilung ohne Lagerung, besonders gut eignen können.

Die statistisch hochsignifikanten Unterschiede ($p < 0,0001$) in den Parametern Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast bei der direkten Auswertung (= t_0) weisen auf deutliche Qualitätsunterschiede zwischen den Färbemethoden hin. Nach Adjustierung der p-Werte zeigte sich für die Farbintensität keine statistisch signifikante Differenz mehr, was darauf hindeutet, dass sich die Methoden in diesem Merkmal bei der sofortigen Beurteilung weitgehend ähneln. Für die Detailerkennbarkeit und den Kontrast hingegen blieben signifikante Unterschiede zwischen mehreren Färbemethoden bestehen. Dies betont die Relevanz der Qualitätsparameter für eine differenzierte Bewertung der Färbemethoden.

Die statistische Analyse bei direkter Auswertung offenbarte bei den pathomorphologischen Parametern „Gesamtanteil morphologischer Abweichungen“ und „Riesenköpfe“ zunächst hochsignifikante p-Werte. Nach der Bonferroni-Korrektur konnten diese jedoch nicht bestätigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die anfänglichen Unterschiede durch die Vielzahl der Paarvergleiche beeinflusst sein könnten und entsprechend zurückhaltend zu interpretieren sind. Weitere signifikante Unterschiede der Merkmale

„Schleifenform“ und „rudimentärer Schwanz“ werden bei der entsprechenden Färbemethode diskutiert.

5.3.2.1 Eosin

Die Eosin-Färbung erwies sich über alle Zeitpunkte hinweg als auswertbar und zeigte in den drei Qualitätsparametern konstant gute mediane Werte. Gleichmäßige Ergebnisse über drei Monate Lagerzeit unterstreichen die Stabilität der Färbemethode. Die festgestellten Artefakte wie gestückelte oder wellige Schwänze sowie vereinzelte Kristallbildungen und Lufteinschlüsse traten in dieser Methode nur sporadisch auf. Sie können als technisch bedingte Effekte eingestuft werden und schränkten die Auswertbarkeit der Präparate nicht wesentlich ein. Ergänzend fiel auf, dass bei der Färbung mit reinem Eosin die Schwanzenden der Spermien teilweise nur schwer erkennbar waren. Mögliche Ursachen hierfür sind eine geringe Bindung des Farbstoffs an die feinen, proteinarmen distalen Strukturen. Durch Präparationsartefakte könnte dieser Effekt potenziell verstärkt worden sein.

In der Detailerkennbarkeit bestanden signifikante Abweichungen im Vergleich zur Spermac®- und Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung. Das ist ein Indiz dafür, dass Eosin zwar solide Färbeergebnisse liefert, bei der Darstellung filigraner Strukturen oder Defekte jedoch Schwächen aufweist. Dadurch könnten geringfügige Abweichungen von der Norm möglicherweise nicht zuverlässig erkannt werden.

Bemerkenswert war der vergleichsweise hohe Anteil an Spermien mit gebrochenen oder geknickten Schwänzen ($Md = 1,5\%$) in Eosin. Eine statistische Signifikanz konnte für dieses relativ seltene Merkmal nicht nachgewiesen werden. Es lässt sich anhand der Daten nicht klären, ob diese Auffälligkeit durch die Färbemethode selbst oder durch methodische Einflüsse verursacht wird.

Die Prävalenz pathomorphologischer Veränderungen lag bei der Eosin-Färbung mit einem Median von 18,75 % im Mittelfeld der untersuchten Methoden. Dieser Wert kann auf eine zuverlässige Sensitivität für morphologische Auffälligkeiten hinweisen. Gleichwohl sollte er kritisch betrachtet werden, da sowohl echte Pathologien als auch durch die Färbemethode bedingte Artefakte zur Gesamtprävalenz beitragen können.

5.3.2.2 Eosin-Nigrosin

Die Eosin-Nigrosin-Färbung zeigte zu allen Zeitpunkten eine vollständige Auswertbarkeit, offenbarte jedoch im Verlauf der Lagerung eine leichte Abnahme der Gesamt-Färbequalität. Der zusätzliche Farbstoffkomplex mit Nigrosin bot anfangs einen Kontrastvorteil durch den dunkleren Hintergrund, könnte jedoch mit zunehmender Lagerungsdauer die Transparenz zellulärer Strukturen beeinträchtigt haben.

Unter den Qualitätsparametern wies insbesondere die „Farbintensität“ im Vergleich zu Kontrast und Detailerkennbarkeit die höchsten Werte auf, was auf eine starke Anfärbung der Spermien und des Hintergrunds durch die Farbstoffkombination hindeutet.

Bereits zu t_0 wurden bei vielen Präparaten ausgeprägte Pigmentansammlungen beobachtet, die im Verlauf der Lagerung bei abnehmenden Qualitätsparametern die Beurteilung zusätzlich erschwert haben könnten.

Im Vergleich zu anderen Färbemethoden zeigte Eosin-Nigrosin eine signifikant schlechtere Detailerkennbarkeit (Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa) sowie einen geringeren Kontrast (Diff-Quick®, Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa), was die Schwächen dieser Färbung unterstreicht. Die wiederholt dokumentierte eingeschränkte Beurteilbarkeit feiner Strukturen, wie der Schwanzenden, spiegelte sich trotz der 1000-fachen Vergrößerung auch in der längeren Auswertungszeit einzelner Präparate wider.

Der Anteil von 16,25 % pathomorphologischen Veränderungen lag in der Eosin-Nigrosin-Färbung auf einem im Vergleich niedrigen Niveau. Dies könnte auf eine realitätsnahe Abbildung der Pathomorphologie hinweisen, alternativ aber auch darauf, dass strukturelle Details nicht zuverlässig erkennbar waren und pathomorphologische Auffälligkeiten daher unterschätzt wurden. Auf Basis der vorliegenden Daten kann keine eindeutige Unterscheidung vorgenommen werden.

Die signifikant höhere Prävalenz rudimentärer Schwänze (Md = 3,25 %) im Vergleich zu Formolzitrat-Bengalrosa (Md = 1 %) kann ein Hinweis darauf sein, dass die Färbemethode bestimmte Defekte begünstigt, betont oder falsch positiv erscheinen lässt. Vor allem enganliegende Schleifenformen könnten bei eingeschränkter Beurteilbarkeit fälschlicherweise als rudimentäre

Schwanzenden gewertet worden sein. Dies würde die erhöhte Prävalenz in der Eosin-Nigrosin-Färbung erklären.

Aufgrund der insgesamt niedrigen medianen Färbequalität erscheint die Methode insbesondere bei längerer Lagerung weniger geeignet für detaillierte morphologische Analysen. Eine Optimierung der Farbstoffkonzentration oder des Färbeprotokolls könnte die Qualität potenziell verbessern.

5.3.2.3 Diff-Quick®

Die Diff-Quick®-Färbung überzeugte über den gesamten Lagerungszeitraum hinweg durch stabile und durchgängig gute Mediane in allen Qualitätsparametern, was für die Robustheit dieser Methode spricht. Die signifikante Abweichung nach oben im Kontrast gegenüber der Eosin-Nigrosin-Färbung stützt diese These.

Bei dieser Färbemethode traten trotz standardisierter Präparation vereinzelt Artefakte, wie wellige Schwänze oder Ansammlungen von Pigmenten, auf. Diese sollten bei der Auswertung der Spermienmorphologie berücksichtigt werden, da sie besonders bei Proben mit eingeschränkter Spermienqualität die Beurteilung erschweren können.

Diff-Quick® zeigte den niedrigsten Anteil pathomorphologischer Spermien (Median = 13,75 %), was auf eine gute Darstellung der tatsächlichen Morphologie oder eine geringere Neigung zu artefaktbedingten Fehlinterpretationen hindeuten könnte. Ein im Vergleich zu verschiedenen Eosin-Nigrosin-Färbungen erhöhter Anteil physiologischer Spermien wird auch durch Root Kustritz et al. (1998) beschrieben. Allerdings ist bei dieser Methode keine differenzierte Anfärbung des Akrosoms möglich, wodurch entsprechende Defekte kaum erkennbar sind und somit systematisch unterschätzt werden könnten. Diese Einschränkung sollte bei der Auswertung berücksichtigt werden.

Der signifikant geringere Anteil schleifenförmiger Schwänze (Md = 5,5 %) im Vergleich zur Färbung mit Spermac® (Md = 8,75 %) kann auf eine realitätsnahe Darstellung physiologischer Morphologien hindeuten, da Schleifenformen häufig als färbebedingte Artefakte gelten. Die mit 4 % auffällig hohe mediane Prävalenz rudimentärer Schwänze wirft die Frage auf, ob diese die tatsächliche Ausprägung des Merkmals an dieser Probe widerspiegelt.

Ebenso ist es möglich, dass die Färbemethode morphologische Veränderungen besonders hervorhebt oder selektiv bestimmte Strukturen betont, wodurch pathologische Veränderungen verstärkt wirken. Gleichzeitig könnte es sein, dass besonders enganliegende Schleifenformen nicht ausreichend abgrenzbar waren und daher fälschlicherweise dieser Pathologie zugeordnet wurden. Dies würde die geringere Prävalenz schleifenförmiger Spermien erklären und ist gleichzeitig exemplarisch für die Grenzen der detaillierten morphologischen Beurteilung.

Dass abgelöste Köpfe in dieser Färbemethode am seltensten identifiziert wurden, stützt die These einer sorgfältigen Verarbeitung der Proben. Zudem sprechen die durchweg guten medianen Werte von Kontrast, Detailerkennbarkeit und Farbtintensität gegen ein systematisches Übersehen pathomorphologischer Merkmale. Sie deuten vielmehr auf eine insgesamt verlässliche Darstellung der Spermienmorphologie hin.

5.3.2.4 Hemacolor®

Die Hemacolor®-Färbung erzielte insgesamt gute Ergebnisse hinsichtlich der Qualitätsparameter. Über die vier Testzeitpunkte blieben die Medianwerte der Qualitätsmerkmale weitgehend konstant bei 5. Lediglich zu t_3 zeigte sich eine geringfügige Abnahme der Detailerkennbarkeit ($Md = 4,5$). Trotz der stark schwankenden Farbtintensität einzelner Präparate, welche möglicherweise auf Färbungsartefakte oder Rückstände der Fixierung zurückzuführen sind, war die Gesamtqualität als stabil zu bewerten.

Die pathomorphologischen Untersuchungen zeigten für die Hemacolor®-Färbung den niedrigsten Anteil an Schleifenformen ($Md = 5\%$), was zum einen auf einen besonders geringen Einfluss dieser Pathologie durch die Färbemethode hinweisen kann. Zum anderen kann nicht ausgeschlossen werden, dass filigrane Strukturen oder enganliegende Schleifen, bedingt durch eine begrenzte Detailerkennbarkeit, übersehen wurden. Die mitunter beobachteten schlecht erkennbaren Schwanzenden unterstützen diese These.

Durch die bei der Hemacolor®-Färbung vermehrt dokumentierten Pigmentansammlungen, welligen Schwanzenden und Tropfenbildungen könnten morphologische Details überzeichnet worden oder schwerer

erkennbar gewesen sein. Der mediane Anteil pathomorphologischer Veränderungen lag mit 17,75 % im mittleren Bereich aller untersuchten Methoden. Dies könnte darauf hinweisen, dass Hemacolor® bestimmte morphologische Auffälligkeiten begünstigt oder Details differenzierter darstellt als beispielsweise die Diff-Quick®-Färbung. Dagegen spricht jedoch, dass keine signifikanten Abweichungen in den Prävalenzen festgestellt wurden. Dennoch ist es möglich, dass Hemacolor® einzelne Strukturen überbetont oder mehr artefaktbedingte Veränderungen verursacht, die aufgrund der niedrigen Prävalenzen unterhalb des Signifikanzniveaus blieben. Insgesamt zeigte Hemacolor® eine verlässliche Färbequalität, was eine ausreichend zuverlässige Identifikation pathologischer Veränderungen an Samenzellen ermöglichte.

5.3.2.5 Spermac®

Die Färbemethode Spermac® zeigte zu t_0 mit Abstand die höchsten Werte in den Kategorien Detailerkennbarkeit ($Md = 7$), Kontrast ($Md = 6,5$) und Gesamtfärbequalität ($Md = 7$) und wies damit eine exzellente initiale Anfärbequalität auf. Die signifikant bessere Detailerkennbarkeit im Vergleich zu Eosin und Eosin-Nigrosin sowie der höhere Kontrast gegenüber Eosin-Nigrosin sprechen für die Eignung von Spermac® für eine pathomorphologische Beurteilung von kryokonservierten Rüdenspermien.

Über die dreimonatige Lagerungszeit nahmen insbesondere der Kontrast und die Farbintensität deutlich ab (jeweils $Md = 4$ zu t_3). Ursächlich kann dies auf eine Instabilität des Farbstoffkomplexes dieser Methode zurückzuführen sein. Spermac® wies insgesamt die geringste Anzahl dokumentierter Pathomorphologien auf ($n = 19$). Nur vereinzelt traten Pigmentansammlungen sowie ein Pigmentverlust zum letzten Auswertungszeitpunkt auf (t_3). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Methode eine vergleichsweise schonende und zuverlässige Färbung ermöglicht.

Das gehäufte Auftreten von Riesenköpfen ($Md = 0,75 \%$), das bei den anderen Färbungen seltener oder gar nicht beobachtet wurde, deutet auf mögliche färbebedingte Artefakte hin. Auch Pigmentansammlungen traten in der Spermac®-Färbung vereinzelt auf. Beide Effekte blieben in ihrer Ausprägung jedoch moderat und beeinträchtigten die Auswertbarkeit nicht.

Vermeehrt wurden Akrosomen in Ablösung (Md = 0,25 %) identifiziert, was vor allem der gezielten Anfärbung des Akrosoms geschuldet sein kann und somit die Erkennung dieser Pathologie erleichtert. Gleichzeitig zeigte Spermac® den höchsten Anteil an Schleifenformen (Md = 8,75 %), signifikant mehr als Diff-Quick® (Md = 5,5 %). Dies kann zum einen auf die bessere Hervorhebung subtiler morphologischer Details, zum anderen auf präparationsbedingte Einflüsse zurückzuführen sein.

Obwohl die Spermac®-Färbung den zweithöchsten Anteil an pathomorphologischen Merkmalen (Md = 20,25 %) aufwies, zeigten andere Färbemethoden mit gleicher Probenvorbereitung kaum oder gar keine Akrosomablösung. Das deutet eher darauf hin, dass Spermac® diese Veränderungen genauer beurteilbar macht, als sie selbst zu verursachen. Insgesamt zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass Spermac® sich aufgrund seiner hohen Färbequalität besonders gut für die direkte morphologische Beurteilung eignete und zudem eine Bewertung des Akrosoms ermöglichte.

5.3.2.6 Formolzitrat-Bengalrosa

Die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung überzeugte durch eine hohe durchschnittliche Gesamt-Färbequalität (Md = 6). Auch nach dreimonatiger Lagerung ohne Konservierung unter einem Deckglas gingen die einzelnen Qualitätswerte lediglich um 0,5 bis 1 Punkt auf Werte zwischen 5 und 6 zurück. Das spricht für eine hohe Präparationsqualität unter hygienischen Bedingungen und eine gleichzeitig unerwartet gute Stabilität des Farbstoffkomplexes.

Die statistische Auswertung ergab signifikant bessere Ergebnisse in der Detailerkennbarkeit im Vergleich zu Eosin und Eosin-Nigrosin sowie im Kontrast gegenüber Eosin-Nigrosin (jeweils $p = 0,029$). Damit eignet sich die Färbemethode besonders für die morphologische Auswertung in der veterinärmedizinischen Routinediagnostik. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass eine erhöhte Detektierbarkeit subtiler Veränderungen durch die überdurchschnittlich gute Färbequalität auch zu einer vergleichsweise höheren Anzahl morphologischer Auffälligkeiten führen kann. Diese müssen jedoch nicht zwangsläufig eine klinische Relevanz besitzen.

Die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung wies mit einem Median von 22,25 % den höchsten Anteil an pathomorphologischen Auffälligkeiten auf. Diese hohe Prävalenz kann einerseits auf die gute Farbintensität und Detaillierbarkeit zurückzuführen sein. Andererseits muss ein Einfluss methodenbedingter Artefakte in Betracht gezogen werden, insbesondere bei Auffälligkeiten, die in dieser Färbung überproportional häufig oder ausschließlich auftraten.

So war das Merkmal „rudimentärer Schwanz“ (Md = 1 %) signifikant seltener als bei Eosin-Nigrosin (Md = 3,25 %). Auch gebrochene oder geknickte Schwänze traten am seltensten auf (Md = 0,25 %), was darauf hinweisen kann, dass diese Färbemethode weniger artefaktanfällig ist als andere Verfahren. Demgegenüber traten Schleifenformen gehäuft auf (Md = 8,25 %), die möglicherweise durch die Präparation als Artefakte begünstigt wurden. Gestützt wird diese These durch eine Untersuchung von Oberlender et al. (2012), in der in Bengalrosa-gefärbten Ausstrichen an Eberspermien erhöhte Prävalenzen schleifenförmiger Samenzellen beschrieben wurden. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch ein Nasspräparat an Rüdenspermien untersucht wurde, ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt. Alternativ kann die erhöhte Prävalenz von Schleifenformen auch auf eine höhere Sensitivität dieser Methode für entsprechende Schäden hinweisen.

Der zu t_0 festgestellte hohe Anteil lanzenförmiger Spermienköpfe dürfte auf ein methodisch bedingtes Artefakt aufgrund unzureichender Abflachungszeit zurückzuführen sein. Er kann als Erklärung für den höheren Gesamtanteil morphologisch auffälliger Samenzellen in dieser Färbung dienen. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass die Gesamtprävalenz pathomorphologischer Spermien bei den Wiederholungsuntersuchungen nur noch im Bereich von 16,5–18,5 % lag.

In der Literatur wird eine Eignung dieser Färbemethode zur Beurteilung des Akrosoms bei Rüdenspermien beschrieben (Hoffmann, 2003; Cardoso et al., 2007). Die kontrastreiche Darstellung unter 1000-facher Vergrößerung ermöglichte grundsätzlich eine Beurteilung der Kopfkappe. Jedoch gibt es keine differenzierte Anfärbung des Akrosoms im Vergleich zum Spermienkopf selbst, sodass geringfügige akrosomale Veränderungen potenziell übersehen werden können.

Weitere Auffälligkeiten wie Lufteinschlüsse mit Zellnestern, Pigmenteinlagerungen und vereinzelte Kristallbildung im Verlauf der Lagerung könnten auf eine gewisse Anfälligkeit für Lagerungs- und Fixierungsartefakte hinweisen. Sie führten jedoch zu keiner erschwerten Beurteilbarkeit. Insgesamt bietet die Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung eine sehr gut beurteilbare Darstellung der Spermienstruktur, erfordert jedoch als Nasspräparat aufgrund der fehlenden Konservierung eine besonders sorgfältige Probenhandhabung.

5.3.3 Vergleich der Färbemethoden

Die statistische Analyse offenbarte methodenabhängige Unterschiede sowohl in der Gesamtprävalenz pathologischer Spermien als auch bei der Identifikation einzelner Pathomorphologien.

Die identifizierte Gesamt-Prävalenz pathomorphologischer Veränderungen bei aufgetautem Rüdensperma lag im Median zwischen 13,25 % und 22,25 %. Grundsätzlich können höhere Prävalenzen ein Hinweis auf eine höhere Sensitivität der jeweiligen Färbemethode sein. Allerdings können sie auch durch methodische Effekte verursacht werden. Eine zu niedrige Prävalenz hingegen könnte auf eine mangelnde Sensitivität oder auf eine höhere Selektivität hindeuten. Der initial hochsignifikante Unterschied zwischen den Färbemethoden ($p = 0,0018$) war zwar ein Hinweis auf eine individuelle Sensitivität der Methoden. Dieser relativierte sich jedoch nach der p-Wert-Adjustierung, sodass kein signifikanter Unterschied einer Färbemethode hinsichtlich der Erfassungsrate aller pathomorphologischen Veränderungen gefunden werden konnte.

Darüber hinaus konnten verschiedene Färbemethoden bestimmte Pathologien unterschiedlich gut sichtbar machen. Die Qualität der Anfärbung und der erzielte Kontrast beeinflussten entscheidend die Sichtbarkeit feiner morphologischer Veränderungen. Ein ausgeprägter Kontrast erleichtert zwar die Detektion subtiler Pathologien, kann jedoch dazu führen, dass kleinere Abweichungen überproportional hervortreten, besonders wenn keine messbar einheitlichen Bewertungskriterien, wie etwa bezüglich rudimentärer Spermienchwänze, bestehen.

Die Schleifenform war mit medianen Prävalenzen von 5–8,75 % die häufigste Anomalie und zeigte auch nach Anpassung der p-Werte einen signifikanten Paarvergleich zwischen der Diff-Quick®- und der Spermac®-Färbung ($p = 0,0293$). Dies spricht dafür, dass zumindest für bestimmte pathomorphologische Merkmale Unterschiede in der Detektionsrate zwischen den Methoden bestehen. Alternativ könnten einzelne Färbemethoden gewisse Artefakte begünstigen. Ähnliche Befunde zeigten sich bei rudimentären Schwanzstrukturen, der zweithäufigsten Pathologie (Md = 1–4 %). Auch hier war der Unterschied zwischen Eosin-Nigrosin (Md = 3,25 %) und Formolzitrat-Bengalrosa (Md = 1) signifikant ausgeprägt. Dies untermauert die These, dass Färbetechniken das morphologische Erscheinungsbild einzelner Spermienbestandteile gezielt beeinflussen können, und ist für die Auswahl geeigneter Färbemethoden klinisch relevant. Beim Merkmal „Riesenköpfe“ gab es initial signifikante Unterschiede zwischen den Methoden ($p = 0,008$), diese konnten nach der p-Wert-Adjustierung jedoch nicht mehr bestätigt werden. Aufgrund der niedrigen Prävalenz dieses Merkmals sind weitere Untersuchungen mit größeren Stichproben notwendig, um verlässliche Aussagen zu Abweichungen zwischen den Methoden treffen zu können.

Ein auffälliger Einzelfund zeigte sich bei der Probe eines Briard-Rüden, bei der ein überproportional hoher Anteil deformierter und verdickter Mittelstücke identifiziert wurde (Md = 6,63 % bzw. Md = 11,38 %). Währenddessen lag die mediane Prävalenz dieser Merkmale in den übrigen neun Proben anderer Hunderassen bei 0 %. In der Literatur sind bislang keine rassespezifischen Auffälligkeiten des Mittelstücks beim Briard beschrieben, sodass es sich um eine individuelle Auffälligkeit handeln könnte. Weitere Untersuchungen an TG-Rüdenspermien des Briards sind notwendig, um zwischen den möglichen Ursprüngen dieser Auffälligkeit differenzieren zu können. Bereits bei der Eingangsuntersuchung des spermatologischen Materials dieses Rüden wurde ein auffällig hoher Anteil Plasmatropfen festgestellt. Da in dieser Befundung jedoch die Merkmale „deformiertes Mittelstück“ bzw. „verdicktes Mittelstück“ nicht separat erfasst wurden, unterstreicht dies die Herausforderung, pathomorphologische Auffälligkeiten eindeutig zu beurteilen. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Färbemethoden selbst als auch biologische Faktoren

einen erheblichen Einfluss auf die Beurteilung der Spermienmorphologie haben können.

5.3.4 Spermatologische CASA-Untersuchung

Die Ergebnisse bestätigten die bereits im Austausch mit der Herstellerfirma thematisierten Limitierungen des Systems bei der Analyse caniner Spermien. Erhebliche Abweichungen zwischen der subjektiven Auswertung und der computergestützten Spermienanalyse (AndroVision®-Software) sowie eine hohe Rate von Fehlklassifikationen sprechen für diese Einschätzung.

Die CASA-Analyse zeigte in den fünf auswertbaren Färbemethoden durchweg deutlich niedrigere Anteile an intakten Samenzellen und einen viel höheren Anteil an Kopfdeformationen im Vergleich zur subjektiven Auswertung. Beispielsweise wurden bei der Eosin-Färbung lediglich 46 % der Spermien als intakt eingestuft, während manuell 89,5 % als physiologisch beurteilt wurden. Kopfdeformationen betrug mit CASA mehr als 50 % gegenüber 1,5 % in der subjektiven Auswertung. Die Überprüfung der einzelnen Zuordnungen anhand der jeweils automatisch erstellten Aufnahmen offenbarte, dass ein Großteil fehlerhaft war. Die Abweichungen der Ergebnisse deuten auf unzureichende Klassifikationsalgorithmen der AndroVision®-Software hin, die bei komplexeren Färbungen oder den morphologischen Merkmalen von TG-Rüdenspermien an ihre Grenzen stoßen. Obwohl die Medianwerte der Mittelstückdefekte in der CASA-Analyse (2,02 %) und der subjektiven Auswertung (2 %) nahezu identisch erscheinen, entspricht dies keiner tatsächlichen Übereinstimmung. Durch die regelmäßigen Fehlklassifikationen handelte es sich vielmehr um ein zufälliges Resultat, das die Abweichung zwischen den beiden Beurteilungsformen maskierte. Im Gegensatz dazu lieferte die subjektive Auswertung konsistentere und biologisch plausiblere Ergebnisse. Eine Ausweitung des Versuchsaufbaus auf weitere Proben war nicht vorgesehen und hätte aufgrund der unveränderten Erkennungsprobleme keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn gebracht.

Insgesamt erwies sich die CASA-Methode in der vorliegenden Form für die pathomorphologische Beurteilung der TG-Rüdenspermien bei den angewandten Färbemethoden methodisch als nicht geeignet. Zukünftige technologische Entwicklungen, insbesondere KI-gestützte Klassifikations-

verfahren, könnten die automatische Erkennung feiner morphologischer Details verbessern und eine objektivere sowie reproduzierbare Beurteilung ermöglichen. Eine gezielte Weiterentwicklung der CASA-Software AndroVision® in Verbindung mit einer spezifischen Kalibrierung für canine Samenzellen erscheint essenziell. Diese Einschätzungen decken sich mit der aktuellen Literatur, wonach CASA-Systeme hohe Ansprüche an die technische Integration stellen und die manuelle, subjektive Beurteilung der Spermienmorphologie weiterhin als Goldstandard gilt (Zeller, 2020; Finelli et al., 2021; Surmacz et al., 2022).

5.3.5 Einfluss der Kryokonservierung

Die Kryokonservierung hatte signifikante Auswirkungen auf die Morphologie von Rüdenspermien. Besonders auffällig war der Anstieg schleifenförmiger Spermenschwänze, der in fünf von sechs Färbemethoden, ausgenommen in der Hemacolor®-Färbung, statistisch signifikant war. Am stärksten war dieser Effekt bei der Färbung mit Formolzitrat-Bengalrosa ausgeprägt. Zudem zeigten sich insgesamt erhöhte Anteile aller pathologischen Samenzellen (Eosin t_1 : 20,1 %, Eosin t_0 : 23,2 %; Bereich aller Färbemethoden: 20,15–30 %). Diese Zunahmen sind typisch für kryoinduzierte Schäden und gut dokumentiert (Angrimani et al., 2022; Dorado und Ortiz, 2025).

Unerwartet war hingegen die signifikante Abnahme geknickter Schwänze (fünf von sechs Färbemethoden) sowie abgelöster Köpfe (zwei von sechs Färbemethoden) nach der Kryokonservierung. Diese Ergebnisse waren höchstwahrscheinlich keine Folge einer tatsächlichen morphologischen Verbesserung. Es ist vielmehr denkbar, dass diese Befunde im Zusammenhang mit klassifikationsabhängigen Einflüssen oder abweichender Darstellung zwischen den Färbemethoden stehen. Die niedrigeren Prävalenzen abgelöster Köpfe nach Kryokonservierung (0,85–1,75 %) und das Fehlen einer Normalverteilung in mehreren Färbemethoden (vier von sechs beim Merkmal „abgelöste Köpfe“) erschwerten eine robuste statistische Bewertung.

Zusammenfassend wurde der erwartete Anstieg kryoassoziierter Schäden, wie Schleifenformen, durch die Daten bestätigt. Gleichzeitig ließ sich der Rückgang anderer Merkmale eher methodischen Einflüssen zuordnen. Auch

wenn die Bedingungen weitgehend standardisiert waren, lassen sich diese nicht vollständig ausschließen. Für künftige Untersuchungen ist daher die Anwendung identischer Methoden zu empfehlen, um durch die Kryokonservierung verursachte Veränderungen noch zuverlässiger erfassen zu können.

5.3.6 Einfluss des Stresstests

Die Stresstests der Samenzellproben bei verschiedenen Temperaturen vor Herstellung der Präparate hatten teilweise Einfluss auf die Pathomorphologie der kryokonservierten Rüdenspermien. Besonders auffällig war die signifikante Zunahme pathomorphologischer Abweichungen nach dem Stresstest bei 37 °C, darunter ein Anstieg der Gesamtanomalien und rudimentärer Schwänze. Dies deutet auf temperaturinduzierte Prozesse hin. Auch Batista et al. (2012) konnten für bei 37 °C inkubierten Rüdenspermien einen Qualitätsrückgang feststellen. Durch weitere Untersuchungen konnte ein deutlicher Rückgang der Spermienqualität caniner Samenzellen nach Wärmeexposition nachgewiesen werden (Lyrio et al., 2023). Ursächlich könnten höhere Temperaturen durch eine gesteigerte metabolische Aktivität zu Veränderungen an der Zellmembran und dem Zytoskelett der Spermien führen. Gleichzeitig ist die Plasmamembran des Spermiums durch einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren anfällig für Lipidperoxidation und auch lytische Enzyme könnten bei erhöhten Temperaturen einen Einfluss auf die Pathomorphologie haben (Rizkallah et al., 2022; Zduńczyk et al., 2025).

Bei den im Kühlschrank gestressten Proben zeigten einzelne Färbemethoden höhere mediane Anteile pathologischer Formen. Neben der erhöhten Gesamtprävalenz in Hemacolor® und Formolzitrat-Bengalrosa ohne statistische Signifikanz lagen Halsbrüche mit 1–1,5 % auf einem niedrigen Prävalenzniveau. Obwohl für niedrige Temperaturen üblicherweise ein protektiver Effekt erwartet wird (Batista et al., 2012), könnte die rasche Abkühlung unmittelbar nach dem Auftauen die Stabilität der Spermienstruktur beeinträchtigt und zu mechanisch bedingten Veränderungen beigetragen haben. Die beobachteten Abweichungen traten jedoch ohne konsistentes

Muster auf und lassen daher nicht auf einen belastbaren temperaturabhängigen Effekt schließen.

Für die Qualitätsparameter Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast konnte über alle Stresstests hinweg keine signifikante Abweichung zur Kontrollgruppe ermittelt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Färbequalität von der Lagerungstemperatur kaum beeinflusst wurde. Somit waren die beobachteten pathomorphologischen Auffälligkeiten vermutlich zellulärer Natur und sind nicht auf Färbeartefakte zurückzuführen.

Auffällig war eine unterschiedlich starke Ausprägung der beobachteten Effekte je nach Färbemethode. Die Eosin- und Eosin-Nigrosin-Färbung zeigten deutlichere Veränderungen infolge der Stresstests, während dies bei anderen Färbemethoden weniger stark der Fall war. Das kann für eine unterschiedliche Detektionsempfindlichkeit je nach untersuchter Färbetechnik sprechen. Gleichzeitig waren die durch die Stresstests ausgelösten Auffälligkeiten insofern konsistent, als dass sie in mehreren Methoden nachgewiesen werden konnten (Eosin, Eosin-Nigrosin). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich um robuste Veränderungen handelt. Der signifikante Unterschied zwischen bei 18 °C und bei 37 °C gelagerten Fraktionen trat ausschließlich in der Spermac®-Färbung und zudem bei insgesamt niedriger Prävalenz unter 4 % auf. Da keine der anderen Methoden diesen Befund bestätigte, ist eher von einem auf diese Färbemethode bezogenen Phänomen als von einem belastbaren biologischen Effekt auszugehen. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist daher beschränkt.

Die Ergebnisse der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung zeigten, dass die Häufigkeit lanzenförmiger Spermienköpfe abhängig vom durchgeführten Stresstest zu unterschiedlichen Prävalenzen führte. Daraus lässt sich ableiten, dass die zweistündige Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen auch zeitabhängige Prozesse beeinflussen kann, die nach dem Auftauvorgang weiterhin ablaufen.

Insgesamt zeigt sich, dass bereits leichte Abweichungen von der optimalen Lagerung vor der Präparation einen maßgeblichen Einfluss auf die Pathomorphologie von Rüdenspermien haben können. Die weitgehend stabilen Qualitätsparameter über alle Stresstests hinweg stärken die Aussagekraft der pathomorphologischen Befunde. Die Zielsetzung, durch

Stresstests eine Steigerung der Prävalenz pathomorphologischer Formen zu erreichen, wurde nur bei 37 °C deutlich erfüllt. Dieser Befund hat eine unmittelbare praktische Relevanz für die diagnostische Anwendung. Präparate sollten möglichst zeitnah und bei Raumtemperatur hergestellt werden, um temperaturbedingte Artefakte zu vermeiden. Für künftige Studien erscheint es sinnvoll, mithilfe einer erhöhten Stichprobengröße seltene Pathologien mit zu berücksichtigen. Auch eine Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Färbemethoden und Stresstests ist erforderlich, um die Aussagekraft für die veterinärmedizinische Diagnostik bei TG-Rüdenspermien weiter zu verbessern.

5.3.7 Einfluss der Lagerung

Die Ergebnisse zeigten, dass die untersuchten Färbemethoden im Verlauf der dreimonatigen Lagerung insgesamt eine hohe Stabilität sowohl hinsichtlich der morphologischen Beurteilung der Spermien als auch bezüglich der Färbequalität aufwiesen. Dies deckt sich mit Angaben in der Literatur, wonach gefärbte Präparate bei sorgfältiger Präparation Monate bis Jahre lagerfähig sein können (World Health Organization, 2021). Die Prävalenz pathomorphologischer Merkmale blieb im Rahmen dieser Untersuchung überwiegend konstant. Veränderungen zeigten sich vor allem in den Qualitätsparametern der Färbemethoden, die teilweise statistisch signifikant waren.

Ein übergreifendes Muster in den Ergebnissen war, dass für mehrere Färbemethoden zunächst globale Unterschiede festgestellt wurden (Kontrast: Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®; Farbintensität: Hemacolor®), die sich nach der Bonferroni-Korrektur jedoch nicht bestätigten.

Deutlich wurden die Abweichungen bei der Anfärbung mit Spermac®, welches im Zeitverlauf eine signifikante Abnahme von Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast aufwies. Dies deutet auf eine geringere Haltbarkeit der verwendeten Farblösungen hin. Daraus lässt sich schließen, dass Präparate möglichst zeitnah ausgewertet und die Ergebnisse mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden sollten. Trotz der Abnahme der Qualitätsparameter blieb die Beurteilbarkeit aufgrund der sehr hohen initialen Werte grundsätzlich zu jedem Zeitpunkt gegeben. Die Befunde decken sich

mit Berichten über ein zeitabhängiges Verblässen von Farbstoffen während der Lagerung (Lorsuwannarat et al., 2024; Braune et al., 2025). Im Gegensatz dazu blieb die Färbequalität in Formolzitrat-Bengalrosa-gefärbten Präparaten über den Untersuchungszeitraum weitgehend stabil.

Leichte Anstiege selten auftretender Pathomorphologien, wie abgelöste Köpfe bei der Diff-Quick®-Färbung oder Halsbrüche und akrosomfreie Köpfe bei Spermac®, traten ausschließlich bei Parametern mit sehr niedriger Prävalenz ($\leq 1,5\%$) auf. Die Befunde können im Rahmen lagerungsbedingter Artefakte erklärt werden und sollten entsprechend zurückhaltend interpretiert werden.

Die pathomorphologischen Ergebnisse dieser beiden Färbemethoden nach dreimonatiger Lagerung könnten auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber lagerungsbedingten Einflussfaktoren hinweisen und sollten daher vorsichtig interpretiert werden. Bei den weiteren Färbungen lassen die stabilen pathomorphologischen Ergebnisse darauf schließen, dass die Färbequalität eine ausreichende Beurteilung ermöglichte.

Bemerkenswert war, dass in der Färbemethode mit Formolzitrat-Bengalrosa trotz fehlender Konservierung unter einem Deckglas und Entellan® keine relevante Verschlechterung der Färbequalität oder Pathomorphologie festgestellt wurde. Dies deutet darauf hin, dass beim Anfertigen des Nasspräparats mögliche mikrobielle Beeinträchtigungen minimal waren. Eine Besonderheit stellten lanzenförmige Spermienköpfe in der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung dar. Zu t_0 lag ihr Median bei 2,25 %, während er in den Folgeuntersuchungen bei 0 % lag. Diese Befunde sind auf die natürliche Abflachung der Spermienköpfe zurückzuführen und zeigen, dass morphologische Auffälligkeiten vorsichtig interpretiert werden sollten. Auch Schneider (2014) stellte einen deutlich erhöhten Anteil lanzenförmiger Kopfveränderungen an porzinen Samenzellen in dieser Färbemethode bei sofortiger Auswertung fest, die nach dreimonatiger Lagerung nur noch zu durchschnittlich 0,09 % identifiziert wurden.

Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse, dass die Färbemethoden für die Beurteilung von aufgetauten TG-Rüdenspermien nach dreimonatiger Lagerung geeignet sind. Die beobachteten Qualitätseinbußen blieben bei allen Färbungen im tolerablen Rahmen. Geringfügige Abweichungen der Pathomorphologien, Artefakte oder eine Verschlechterung der Färbequalität

sind prinzipiell möglich. Daher wird eine ergänzende digitale Dokumentation direkt nach Präparation für forensische Gutachten oder zur Archivierung besonders empfohlen.

5.4 Schlussbetrachtung und Fazit für die Anwendung in der veterinärmedizinischen Praxis

Ziel dieser Untersuchung war es, sechs etablierte Färbemethoden an aufgetauten TG-Rüdenspermien hinsichtlich ihrer Eignung zur lichtmikroskopischen Beurteilung zu vergleichen. Als Grundlage für die Bewertung dienten die Pathomorphologie, die Färbequalität, der zeitliche und wirtschaftliche Aufwand, die Lagerfähigkeit der Präparate sowie eine objektive CASA-Analyse. Unterschiedliche Stresstests der Spermienfraktionen wurden angewandt, um die Prävalenz pathomorphologischer Formen gezielt zu erhöhen.

Alle sechs untersuchten Methoden eigneten sich prinzipiell dazu aufgetautes TG-Rüdensperma zu evaluieren, unterschieden sich jedoch deutlich in ihren Stärken und Schwächen. Hinsichtlich der Pathomorphologien ergaben sich nur vereinzelt signifikante Unterschiede, wie ein erhöhter Anteil an Schleifenformen in der Spermac®-Färbung im Vergleich zu Diff-Quick®.

Die Eosin-Färbung erwies sich als für den Routineeinsatz in der veterinärmedizinischen Praxis geeignet, da sie stabile Färbeergebnisse mit hoher Färbequalität lieferte. Als weitere Methode, die zudem eine Vitalitätsbeurteilung erlaubt, erzielte Eosin-Nigrosin jedoch die geringste mittlere Färbequalität mit zum Teil eingeschränktem Kontrast. Dadurch kann die Beurteilung feiner Details mehr Zeit erfordern. Diff-Quick® und Hemacolor® erzielten als vorgefertigte Färbesets insgesamt gute Färbequalitäten, wobei Hemacolor® teilweise zu einer blassen Anfärbung führte. Diff-Quick® wies gleichzeitig den geringsten medianen Anteil morphologisch veränderter Samenzellen auf. Die Spermac®-Färbung lieferte bei der sofortigen Auswertung die höchsten Qualitätsmerkmale und ermöglichte eine präzise Analyse des Akrosoms. Formolzitrat-Bengalrosa erzielte ebenfalls eine sehr gute Färbequalität und gleichzeitig den höchsten medianen Anteil pathomorphologischer Spermien bei direkter Beurteilung.

Der zeitliche Aufwand zur Herstellung wies eine Spanne von knapp 30 Minuten zwischen den Färbemethoden auf. Je nach Einbindung der Wartezeiten in den Laboralltag relativiert sich die tatsächliche Präparationsdauer, was besonders Formolzitrat-Bengalrosa und Spermac® betrifft. Auch abhängig von der verwendeten Vergrößerung entstanden Abweichungen in der Auswertungszeit, wobei die meisten Färbemethoden in 400-facher Vergrößerung schneller beurteilt werden konnten.

Die Materialkosten lagen zwischen 0,13 € (Eosin) und 2,28 € (Hemacolor®) je Präparat und waren teils stark abhängig vom Reagenzienverbrauch. Selbst hergestellte Färbelösungen waren insgesamt kostengünstiger als kommerziell erhältliche Färbesets. Unter Berücksichtigung der Arbeitszeit inklusive Wartezeiten schwankten die Gesamtkosten pro Objektträger stark zwischen 1,85 € (Eosin) und 7,85 € (Formolzitrat-Bengalrosa).

Die vergleichende CASA-Analyse mit der Software AndroVision® erwies sich im gegebenen Versuchsaufbau mit den angewandten Färbemethoden als nicht geeignet zur Analyse von TG-Rüdenspermien. Die erwarteten Effekte der Kryokonservierung zeigten sich in einer Zunahme der Gesamtprävalenz pathologischer Spermienformen und Schleifenformen. Gleichzeitig wurde eine Abnahme rudimentärer Schwänze beobachtet, die sich durch methodische Ursachen erklären lässt und die Herausforderung einer standardisierten Diagnostik verdeutlicht.

Die vor der Anfärbung durchgeführten Stresstests hatten keinen Einfluss auf die Färbequalität, führten jedoch insgesamt zu moderat erhöhten Anteilen pathomorphologischer Auffälligkeiten abhängig von der jeweiligen Temperaturbelastung. Signifikant war dieser Effekt beim Gesamtanteil aller Pathomorphologien sowie bei rudimentären Schwänzen infolge der Lagerung bei 37 °C. Bei einzelnen Färbemethoden ließ sich dieser Befund ebenfalls bestätigen. Aufgrund der Beschränkung der Effekte auf einen Stresstest eignete sich der Versuchsaufbau nur begrenzt, um die Aussagekraft des Vergleichs der sechs Färbemethoden zu erhöhen.

Die dreimonatige Lagerung der Präparate hatte nur einen geringfügigen Einfluss auf die Auswertung. Alle Färbemethoden blieben prinzipiell zu jedem Auswertungszeitpunkt beurteilbar und eignen sich somit für forensische Fragestellungen. Während die pathomorphologischen Ergebnisse im Verlauf

der Lagerung weitgehend stabil blieben, zeigten sich in den Qualitätsparametern relevante Unterschiede. Im Gegensatz zu den bemerkenswert stabilen Werten der Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung verzeichnete Spermac® signifikante Abnahmen der initial sehr hohen Qualitätswerte. Daher erscheint eine zusätzliche digitale Dokumentation unmittelbar nach Präparation sinnvoll.

Insgesamt zeigt die vorliegende Untersuchung, dass alle sechs Färbemethoden grundsätzlich für die lichtmikroskopische Beurteilung aufgetauter TG-Rüdenspermien geeignet sind. Für den routinemäßigen Einsatz in der veterinärmedizinischen Praxis bieten sich robuste Färbungen wie Eosin und Diff-Quick® an. Sie eignen sich insbesondere bei hohem Probenaufkommen. Für Fragestellungen mit erhöhten Anforderungen an die Färbequalität oder zur Beurteilung des Akrosoms stellen Spermac® und Formolzitrat-Bengalrosa sinnvolle Alternativen dar.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie vergleicht sechs etablierte Färbemethoden (Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa) für die lichtmikroskopische Untersuchung kryokonservierter Rüdenspermien. Nach dem Auftauen wurden die Proben von zehn Rüden in vier Fraktionen aufgeteilt und entweder keinem oder einem zweistündigen Stresstest bei 6 °C, 18 °C oder 37 °C unterzogen. Ziel war es, die pathomorphologische Varianz für eine bessere Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse zu erhöhen. Im Anschluss wurden gefärbte Samenzellpräparate angefertigt und sowohl eine pathomorphologische Begutachtung als auch eine Beurteilung der Färbequalität unmittelbar nach der Präparation durchgeführt. Wiederholungsuntersuchungen zur Lagerungsstabilität erfolgten nach 24 Stunden, 7 Tagen und 3 Monaten. Ergänzend wurde das CASA-System AndroVision® eingesetzt.

Pro Färbemethode wurden 40 (Eosin, Diff-Quick®, Hemacolor®) bzw. 80 Präparate (Eosin-Nigrosin, Spermac®, Formolzitrat-Bengalrosa) erstellt. Die Gesamtanalyse umfasste 360 Präparate mit 960 Evaluationsprozessen. Dabei ergaben sich folgende wesentliche Erkenntnisse:

Eosin

- Färbequalität: gute Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast, stabil über 3 Monate.
- Im Vergleich: Detailerkennbarkeit: zu t_0 signifikant schlechter als Spermac® und Formolzitrat-Bengalrosa (jeweils $p = 0,029$).
- Zeitaufwand: schnellste Methode mit mittlerem Arbeitsaufwand zur Präparation und Beurteilung je Objektträger von $8,15 \pm 0,36$ Min. (mit Vitalitätsbeurteilung $+5,29 \pm 0,22$ Min.).
- Kosten: günstigste Methode mit 0,13 € je Präparat für Verbrauchsstoffe; 1,85 € inklusive Personalkosten (mit Vitalitätsbeurteilung $+1,12$ €).
- Stresstest: signifikant mehr rudimentäre Schwänze bei 37 °C im Vergleich zu ungestressten Proben.
- Lagerungsstabilität: keine relevanten Veränderungen der Pathomorphologie.

- Besonderheiten: sehr gut für die Routinediagnostik geeignet, sofern keine Beurteilung des Akrosoms benötigt wird.

Eosin-Nigrosin

- Färbequalität: gute Farbintensität; leicht unterdurchschnittliche Detailerkennbarkeit und Kontrast.
- Im Vergleich: signifikant schlechtere Detailerkennbarkeit als Spermac®- und Formolzitrat-Bengalrosa-Färbung; schlechterer Kontrast als Diff-Quick®, Spermac® und Formolzitrat-Bengalrosa (jeweils $p = 0,029$).
- Zeitaufwand: $10,54 \pm 0,50$ Min. (mit Vitalitätsbeurteilung $+5,45 \pm 0,28$ Min.).
- Kosten: 0,26 € Verbrauchsstoffe; 2,49 € inklusive Personalkosten (mit Vitalitätsbeurteilung $+1,15$ €).
- Stresstest: signifikant mehr Pathomorphologien bei 37 °C im Vergleich zu ungestressten Samenzellen ($p = 0,012$).
- Lagerung: keine maßgeblichen Veränderungen der Pathomorphologie oder Qualitätsparameter.
- Besonderheiten: feine Strukturen (Schwanzenden) teils nur mit erhöhtem Zeitaufwand beurteilbar, daher eingeschränkt für fein graduierte morphologische Beurteilung geeignet.

Diff-Quick®

- Färbequalität: gute Detailerkennbarkeit, mittlere Farbintensität und sehr guter Kontrast.
- Im Vergleich: signifikant höherer Kontrast als bei Eosin-Nigrosin ($p = 0,029$).
- Pathomorphologie: niedrigster Anteil pathomorphologischer Veränderungen (Md = 13,75 %); signifikant weniger Schleifenformen als bei Spermac® ($p = 0,029$).
- Zeitaufwand: $10,24 \pm 0,38$ Min.
- Kosten: 0,46–0,91 € Verbrauchsstoffe, abhängig vom Verbrauch der Farblösungen; 2,63–3,08 € inklusive Personalkosten.

- Stresstest und Lagerung: keine signifikanten Effekte auf Pathomorphologie-Prävalenzen oder Färbequalität.
- Besonderheiten: robuste und schnelle Methode, die sich bei niedrigem Farbstoffverbrauch für Labore mit hohem Probenaufkommen eignet.

Hemacolor®

- Färbequalität: gute Farbintensität, Detailerkennbarkeit und Kontrast; vereinzelt hohe Variabilität der Farbintensität (blass) ohne Beeinträchtigung der Beurteilbarkeit.
- Zeitaufwand: $10,46 \pm 0,32$ Min.
- Kosten: 0,69–2,28 € Verbrauchsstoffe, abhängig vom Verbrauch der Farblösungen; 2,90–4,49 € inklusive Personalkosten.
- Stresstest und Lagerung: keine signifikanten Effekte auf Pathomorphologie-Prävalenzen oder Färbequalität.
- Besonderheiten: beständige und schnelle Ergebnisse; wirtschaftlich jedoch nur bei niedrigem Verbrauch der Farblösungen oder geringer Priorität der Wirtschaftlichkeit sinnvoll.

Spermac®

- Färbequalität: beste Ergebnisse aller Methoden zu t_0 .
- Im Vergleich: signifikant bessere Detailerkennbarkeit im Vergleich zu Eosin und Eosin-Nigrosin; signifikant höherer Kontrast als Eosin-Nigrosin (jeweils $p = 0,029$).
- Pathomorphologie: höchste Prävalenz schleifenförmiger Spermien ($Md = 8,75\%$); signifikant mehr als bei Diff-Quick® ($p = 0,029$).
- Zeitaufwand: sehr zeitintensiv mit $29,91 \pm 0,33$ Min.
- Kosten: 1,04 € Verbrauchsstoffe; 7,37 € inklusive Personalkosten.
- Stresstest: für rudimentäre Schwänze signifikanter Unterschied zwischen 37 °C ($Md = 1,75\%$) und 18 °C ($Md = 3,5\%$, $p = 0,047$).
- Lagerung: signifikante Qualitätsverluste aller Parameter (Farbintensität: t_0 im Vergleich zu t_1/t_3 ; Detailerkennbarkeit und Kontrast: t_0 im Vergleich zu den drei Wiederholungsuntersuchungen); vereinzelt Pigmentverlust.
- Besonderheiten: insgesamt geringste Häufigkeit an Artefakten; sehr gut zur unmittelbaren pathomorphologischen Beurteilung inklusive

Akrosom geeignet; aufgrund des Zeit- und Kostenaufwands für die Routinediagnostik nur eingeschränkt empfehlenswert.

Formolzitrat-Bengalrosa

- Färbequalität: durchweg hohe Mediane in allen Parametern.
- Im Vergleich: bessere Detailerkennbarkeit im Vergleich zu Eosin und Eosin-Nigrosin; höherer Kontrast als Eosin-Nigrosin (jeweils $p = 0,029$).
- Pathomorphologie: höchste Prävalenz pathomorphologischer Veränderungen ($Md = 22,25\%$); gehäuft lanzenförmige Spermienköpfe bei direkter Auswertung ($Md = 2,25\%$) als Artefakt unzureichend abgeflachter Spermienköpfe, die nach Lagerung nicht mehr auftraten.
- Zeitaufwand: durch 30-minütige Lagerungsphase mit $36,00 \pm 0,33$ Min. zeitaufwändigste Methode.
- Kosten: 0,24 € Verbrauchsstoffe; 7,85 € inklusive Personalkosten.
- Stresstest und Lagerung: keine signifikanten Effekte auf Pathomorphologie oder Färbequalität; nach dreimonatiger Lagerung höchste Qualitätsparameter.
- Besonderheiten: aufgrund sehr guter Färbequalität und Lagerstabilität für präzise pathomorphologische Analysen geeignet; bei effizienter Integration in Laborabläufe zeitsparender als und kostentechnisch vergleichbar mit Eosin, jedoch mit höherer Färbequalität.

Alle Präparate waren zu allen vier Auswertungszeitpunkten auswertbar, sodass sich die sechs Färbemethoden zur Archivierung kryokonservierter Rüdenspermien eignen. Die computergestützte Spermienanalyse (AndroVision®) konnte nicht erfolgreich eingesetzt werden. Infolge der Kryokonservierung wurden vermehrt Schleifenformen, jedoch seltener gebrochene/geknickte Schwänze oder abgelöste Köpfe identifiziert, was möglicherweise methodisch begründet ist. Die Stresstests beeinflussten die Färbequalität nicht, jedoch induzierte der Stresstest bei 37 °C signifikant höhere mediane Anteile pathologischer Auffälligkeiten im Vergleich zu ungestressten Samenzellen (Gesamtanteil pathologischer Spermien: $p = 0,012$; rudimentäre Schwänze: $p = 0,035$).

7 Summary

The present study compares six established staining methods (Eosin, Eosin-Nigrosin, Diff-Quick®, Hemacolor®, Spermac®, and Formol-citrate Bengal Rose) for the light microscopic evaluation of cryopreserved canine spermatozoa. Post-thaw, samples from ten dogs were divided into four fractions and exposed to either no stress test or a two-hour stress test at 6 °C, 18 °C or 37 °C. The aim was to increase the pathomorphological variance to improve the interpretative validity of the results. Subsequently, stained sperm smears were prepared, followed by immediate pathomorphological assessment and staining quality evaluation. Repeated assessments for storage stability were performed after 24 hours, 7 days, and 3 months. Complementary spermatological analysis was performed using the AndroVision® CASA system.

For each staining method, 40 (Eosin, Diff-Quick®, Hemacolor®) or 80 slides (Eosin-Nigrosin, Spermac®, Formol-citrate Bengal Rose) were prepared. The overall analysis encompassed 360 preparations and 960 evaluation processes. Key findings are summarised as follows:

Eosin

- Staining quality: good colour intensity, detail discernibility, and contrast were stable over three months.
- Comparison: detail discernibility was significantly lower at t_0 compared with Spermac® and Formolcitrate-Bengal Rose ($p = 0.029$ for each).
- Time requirement: the fastest method; mean working time for preparation and evaluation per slide was 8.15 ± 0.36 minutes (with additional assessment of vitality $+5.29 \pm 0.22$ minutes).
- Cost: least expensive for consumables with €0.13 per preparation; €1.85 including personnel costs (with vitality assessment $+€1.12$).
- Stress test: significantly higher proportion of rudimentary tails at 37 °C compared with unstressed samples.
- Storage: no relevant effects on pathomorphology.
- Special notes: particularly suitable for routine diagnostics if acrosome evaluation is not required.

Eosin-Nigrosin

- Staining quality: good colour intensity; detail discernibility and contrast slightly below average.
- Comparison: significantly lower detail recognition than Spermac® and Formolcitrate-Bengal Rose; lower contrast than Diff-Quick®, Spermac®, and Formolcitrate-Bengal Rose ($p = 0.029$ for each).
- Time requirement: 10.54 ± 0.50 minutes (with vitality assessment $+5.45 \pm 0.28$ minutes).
- Cost: €0.26 consumables; €2.49 including personnel costs (with vitality assessment $+€1.15$).
- Stress test: significantly more sperm pathomorphologies at 37 °C compared to unstressed samples ($p = 0.012$).
- Storage: no relevant changes in pathomorphology or staining quality.
- Special notes: Fine structures (tail ends) are sometimes only discernible with increased time expenditure, limiting its use for detailed morphological assessment.

Diff-Quick®

- Staining quality: good detail discernibility, medium colour intensity and very good contrast.
- Comparison: significantly better contrast than Eosin-Nigrosin ($p = 0.029$).
- Pathomorphology: lowest proportion of pathomorphological anomalies (Md = 13.75%); significantly fewer loop-shaped sperm than Spermac® ($p = 0.029$).
- Time requirement: 10.24 ± 0.38 minutes.
- Cost: €0.46–€0.91 for consumables depending on reagent consumption; €2.63–€3.08 including personnel costs.
- Stress test and storage: no significant effects on pathomorphology prevalences or staining quality.
- Special notes: robust and fast method; suitable for high-throughput laboratories, provided that low dye consumption is ensured.

Hemacolor®

- Staining quality: good colour intensity, detail discernibility, and contrast; individual preparations with high variation of colour intensity (pale), without affecting evaluability.
- Time requirement: 10.46 ± 0.32 minutes.
- Cost: €0.69–€2.28 for consumables depending on reagent consumption; €2.90–€4.49 including personnel costs.
- Stress test and storage: no significant effects on pathomorphology prevalences or staining quality.
- Special notes: consistent and rapid results; economically suitable only with low dye consumption or low priority on cost efficiency.

Spermac®

- Staining quality: best results among all methods at t_0 .
- Comparison: significantly higher detail discernibility than Eosin and Eosin-Nigrosin; significantly higher contrast than Eosin-Nigrosin ($p = 0.029$ for each).
- Pathomorphology: highest prevalence of loop-shaped sperm ($Md = 8.75\%$); significantly more than Diff-Quick® ($p = 0.029$).
- Time requirement: 29.91 ± 0.33 minutes.
- Cost: €1.04 consumables; €7.37 including personnel costs.
- Stress test: significant difference for rudimentary tails between 37 °C ($Md = 1.75\%$) and 18 °C ($Md = 3.5\%$, $p = 0.047$).
- Storage: significant quality loss in all parameters (colour intensity: t_0 vs t_1/t_3 ; detail discernibility and contrast: t_0 vs all follow-up assessments); occasional pigment loss.
- Special notes: lowest frequency of artefacts; very suitable for immediate pathomorphological evaluation including acrosome assessment; due to time and cost, less practical for routine diagnostics.

Formol-citrate Bengal Rose

- Staining quality: consistently high medians across all parameters.
- Comparison: higher detail discernibility than Eosin and Eosin-Nigrosin; higher contrast than Eosin-Nigrosin ($p = 0.029$ for each).

Summary

- Pathomorphology: highest prevalence of pathomorphological anomalies (Md = 22.25%); increased lanceolate sperm heads at immediate evaluation (Md = 2.25%) as artefacts of inadequately flattened sperm heads, which disappeared after storage.
- Time requirement: most time-consuming due to a 30-minute storage step (36.00 ± 0.33 minutes).
- Cost: €0.24 consumables; €7.85 including personnel costs.
- Stress test and storage: no significant effects on pathomorphology or staining quality; highest quality parameters after 3 months of storage.
- Special notes: very suitable for precise morphological analysis due to high staining quality and storage stability; may be more time-saving than and cost-comparable to Eosin with higher staining quality if integrated efficiently into laboratory workflows.

All preparations were evaluable at all four assessment time points, indicating that the six staining methods are suitable for the archiving of cryopreserved canine spermatozoa. The computer-assisted sperm analysis (AndroVision®) could not be applied successfully. Cryopreservation resulted in an increased prevalence of loop-shaped forms but fewer broken or bent tails and detached heads, likely due to methodological factors. Stress tests did not influence staining quality. However, the stress test at 37 °C induced significantly elevated median proportions of pathological anomalies compared to unstressed spermatozoa (total proportion of pathological spermatozoa: $p = 0.012$; rudimentary tails: $p = 0.035$).

8 Literaturverzeichnis

Agarwal A (2016): Andrological Evaluation of Male Infertility. A Laboratory Guide. Springer International Publishing AG, Cham.

Agarwal A, Sharma R, Gupta S, Finelli R, Parekh N, Panner Selvam MK, Henkel R, Durairajanayagam D, Pompeu C, Madani S, Belo A, Singh N, Covarrubias S, Darbandi S, Sadeghi R, Darbandi M, Vogiatzi P, Boitrelle F, Simopoulou M, Saleh R, Arafa M, Majzoub A, Kandil H, Zini A, Ko E, Alvarez JG, Martinez M, Ramsay J, Jindal S, Busetto GM, Sallam H, Maldonado I, Anagnostopoulou C, Alves MG, Sengupta P, Gilany K, Evenson DP, Lewis SEM, Gosalvez J, Ambar RF, Shah R (2022): Sperm Morphology Assessment in the Era of Intracytoplasmic Sperm Injection: Reliable Results Require Focus on Standardization, Quality Control, and Training. *The World Journal of Men's Health* 40: 347–360.

Anderson J (1945): The semen of animals and its use for artificial insemination. Technical Communication of the Bureau of Animal Breeding, Edinburgh, No. 6.

Angrimani DSR, Bicudo LdC, Luceno NL, Leemans B, Nichi M, Vannucchi CI, van Soom A (2022): A triple stain method in conjunction with an in-depth screening of cryopreservation effects on post-thaw sperm in dogs. *Cryobiology* 105: 56–62.

Arlt SP, Reichler IM, Herbel J, Schäfer-Somi S, Riege L, Leber J, Frehner B (2023): Diagnostic tests in canine andrology - What do they really tell us about fertility? *Theriogenology* 196: 150–156.

Baker HW, Clarke GN (1987): Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clinical Reproduction and Fertility* 5: 37–43.

Bamba K (1988): Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245–1251.

Banaszewska D, Andraszek K, Czubaszek M, Biesiada-Drzazga B (2015): The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. *Animal Reproduction Science* 159: 17–24.

- Bartlett DJ (1962):** Studies on dog semen. I. Morphological characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility* 3: 173–189.
- Batista M, Santana M, Alamo D, González F, Niño T, Cabrera F, Gracia A (2012):** Effects of incubation temperature and semen pooling on the viability of fresh, chilled and freeze-thawed canine semen samples. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 1049–1055.
- Baum H (2019):** Pappenheim-Färbung. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, 1819.
- Beatty RA (1957):** I—Nigrosin-Eosin Staining of Rabbit Spermatozoa and the Fertility of Semen. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biology* 67: 1–31.
- Begemann H, Rastetter J (1979):** Staining Methods. In: Heilmeyer L (Hrsg.), *Atlas of Clinical Hematology*. Springer 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, 9–23.
- Björndahl L, Söderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR, Kvist U (2004):** Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of Andrology* 25: 671–678.
- Björndahl L, Söderlund I, Kvist U (2003):** Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction* 18: 813–816.
- Blom E (1950):** A one-minute live-dead sperm stain by means of Eosin-Nigrosin. *Fertility and Sterility* 1: 176–177.
- Boguth W, Müller E (1951):** Die Bestimmung toter Spermien mittels Eosin im Bullensperma. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*: 50–52.
- Boucher JH, Foote RH, Kirk RW (1958):** The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *The Cornell Veterinarian* 48: 67–86.
- Braune A, Wehrend A, Kauffold J, Farshad A (2025):** Comparative Assessment of Sperm Morphology in Liquid-Preserved Boar Semen Using Cytological Stains. *Animals* 15: 2737.

Brum AM, Thomas AD, Sabeur K, Ball BA (2006): Evaluation of Coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research* 67: 358–362.

Brunelle JL, Green R (2014): Chapter Thirteen - Coomassie Blue Staining. *Methods in Enzymology* 541: 161–167.

Bujan L, Mieusset R, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F (1988): Sperm morphology in fertile men and its age related variation. *Andrologia* 20: 121–128.

Busch W, Waberski D (2007): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer, Stuttgart. 103–108.

Buttle HRL, Hancock JL, Purser AF (1965): Counting dead spermatozoa in frozen semen. *Animal Science* 7: 59–65.

Campbell RC, Dott HM, Glover TD (1956): Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agricultural Science* 48: 1–8.

Cardoso RCS, Silva AR, Silva LDM, Chirinéa VH, Souza FF, Lopes MD (2007): Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm–oocyte interaction assay. *Reproduction in Domestic Animals* 42: 11–16.

Chan PJ, Corselli JU, Jacobson JD, Patton WC, King A (1996): Correlation between intact sperm acrosome assessed using the Spermac stain and sperm fertilizing capacity. *Archives of Andrology* 36: 25–27.

Chłópek A, Wysokińska A (2020): Canine spermatozoa-What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reproduction in Domestic Animals* 55: 113–126.

Christensen BW, Meyers S (2023): Canine Semen Evaluation and Processing. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 53: 921–930.

Coetzee K, Bermes N, Krause W, Menkveld R (2001): Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia* 33: 159–163.

Cunha ICN, Henning H, Urhausen C, Beyerbach M, Günzel-Apel AR (2014): A commercial box for dog semen transport: What happens inside when the environmental temperature is increasing? *Animal Reproduction Science* 147: 86–92.

Czubaszek M, Andraszek K, Banaszewska D, Walczak-Jędrzejowska R (2019): The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. *PLoS ONE* 14: e0214243.

Daub L (2015): Ein Vergleich zwischen den Vitalfärbungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin und dem NucleoCounter SP-100® zur Beurteilung der Spermienmembranintegrität bei Spermaproben von Rüden und Bullen. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.

Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otzdorff C (2016): Sperm membrane integrity in fresh and frozen-thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the NucleoCounter SP-100. *Theriogenology* 86: 651–656.

Domain G, Kappen M, van Mil A, Beijer I de, van Puyvelde M, van Leeuwenberg R, Spanoghe L, Posastiuc F, van Soom A (2024): Rising trends in the use of frozen dog sperm: a retrospective study in Belgium and the Netherlands. *Frontiers in Veterinary Science* 11: 1499266.

Dorado J, Ortiz I (2025): Cryopreservation of Dog Semen. *Methods in Molecular Biology* 2897: 147–157.

Dott HM, Foster GC (1972): A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live-dead' stain. *Journal of Reproduction and Fertility* 29: 443–445.

Dott HM, Foster GC (1975): Preservation of differential staining of spermatozoa by formol citrate. *Journal of Reproduction and Fertility* 45: 57–60.

Dougherty KA, Emilson LB, Cockett AT, Urry RL (1975): A comparison of subjective measurements of human sperm motility and viability with two live-dead staining techniques. *Fertility and Sterility* 26: 700–703.

Dougherty KA, Urry RL, Cockett AT (1977): Supravital staining of spermatozoa: relationship of eosin concentration to the percentage of cells staining live. *The Journal of Urology* 118: 1008–1009.

- Dreier H-K (2010):** Klinik der Reproduktionsmedizin des Hundes. Schlütersche, Hannover.
- Eliasson R (1977):** Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 28: 1257.
- Eliasson R (1981):** Analysis of semen. In: Burger HG, DeKretser DM (Hrsg.), *The testis*. Raven Press, New York, 381–399.
- Eliasson R, Treichl L (1971):** Supravital staining of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 22: 134–137.
- Fa. Labor + Technik Eberhard Lehmann GmbH (2012):** Diff-Quick Gebrauchsanleitung, Berlin.
- Fa. Merck KGaA (2017):** Hemacolor® (Produktinformation), Darmstadt.
- Fa. Microptic S.L. (2011):** Sperm Stain Protocol (Produktinformation), Barcelona.
- Fa. Microptic S.L. (2024):** SpermBlue® Protocol (Produktinformation), Barcelona.
- Fa. Minitüb GmbH (2014):** Spermac Färbung Anleitung, Tiefenbach.
- Fa. Minitüb GmbH (2016):** Eosin Eosin-Nigrosin-Färbung (Produktinformation), Tiefenbach.
- Fa. Minitüb GmbH (2017):** AndroVision® Gebrauchsanleitung, 9. Auflage, Tiefenbach.
- Finelli R, Leisegang K, Tumallapalli S, Henkel R, Agarwal A (2021):** The validity and reliability of computer-aided semen analyzers in performing semen analysis: a systematic review. *Translational Andrology and Urology* 10: 3069–3079.
- Gago C, Pérez-Sánchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C (1998):** Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the *Cynomolgus* monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *International Journal of Andrology* 21: 169–176.
- García-Herreros M, Aparicio IM, Barón FJ, García-Marín LJ, Gil MC (2006):** Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for

automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology* 29: 553–563.

Garde JJ, Ortiz N, García A, Gallego L (1997): Use of a triple-stain technique to detect viability and acrosome reaction in deer spermatozoa. *Archives of Andrology* 39: 1–9.

Garner DL, Johnson LA (1995): Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction* 53: 276–284.

Geisler A (1990): Prüfung von Vitalfärbungen für Spermien von Haussäugetieren. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.

Glazier DB, Marmar JL, Diamond SM, Gibbs M, Corson SL (2000): A modified acrosome induction test. *Archives of Andrology* 44: 59–64.

Goericke-Pesch S, Failing K (2013): Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac®. *Reproduction in Domestic Animals* 48: 213–217.

Goetz A, Goetz SS (1938): Vitrification and Crystallization of Organic Cells at Low Temperatures. *Journal of Applied Physics* 9: 718–729.

Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ (1998): Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *Journal of Andrology* 19: 704–709.

Günzel-Apel AR (1994): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. *Der Zuchtrüde*. Fischer, Jena, Stuttgart. 11–47.

Günzel-Apel AR (2016): Andrologie des Hundes. Untersuchungstechniken. In: Günzel-Apel AR, Bostedt H (Hrsg.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze*. Schattauer, Stuttgart, 640–659.

Hackett AJ, Macpherson JW (1965): Some staining procedures for spermatozoa. A review. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne* 6: 55–62.

Hancock JL (1951): A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature* 167: 323–324.

Hewitt DA, England GCW (1998): An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Animal Reproduction Science* 51: 321–332.

Hoffmann B (2003): Andrologie. Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung; Skript nach der Vorlesung. LOB.de - Lehmanns Media, Berlin. 25–28.

Hofmann N, Hilscher B (1991): Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men*. *Human Reproduction* 6: 979–982.

Hori T, Yoshikuni R, Kobayashi M, Kawakami E (2014): Effects of storage temperature and semen extender on stored canine semen. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76: 259–263.

Kawakami E, Vandervoort CA, Mahi-Brown CA, Tollner TL, Overstreet JW (1993): Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. *The Journal of Experimental Zoology* 265: 599–603.

Kitiyanant Y, Schmidt MJ, Pavasuthipaisit K (2000): Evaluation of sperm acrosome reaction in the Asiatic elephant. *Theriogenology* 53: 887–896.

Kolster KA (2018): Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 48: 533–545.

Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA (1987): A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology* 18: 275–277.

Kvist U, Björndahl L (2002): Manual on Basic Semen Analysis 2002. ESHRE Monographs. Oxford University Press.

Lasley JF, Easley GT, McKenzie FF (1942): A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *The Anatomical Record* 82: 167–174.

Laux E-M (2017): Untersuchungen zur Chromatinkondensation caniner Spermatozoen. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation.

Laux E-M, Farshad A, Wehrend A, Hammadeh ME (2025): Application of Staining Methods to Compare Chromatin Condensation in Fresh and Freeze-Thawed Dog Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 60: e70023.

Lorsuwannarat N, Kaewsanit A, Charoenpitakchai M, Ruangpratheep C, Arnutti P, Nimmanon T (2024): Optimizing Re-staining Techniques for the Restoration of Faded Hematoxylin and Eosin-stained Histopathology Slides: A Comparative Study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 72: 733–742.

Lyrio LL, Lazaro MA, Sonegheti R, Moulin L, Coslop L, Sarto CG, Loureiro B, Favoreto MG (2023): Effects of heat stress on sperm quality of French Bulldogs. *Theriogenology* 199: 131–137.

Martínez AIP (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science* 82-83: 209–224.

Mayer DT, Squiers CD, Bogart R, Oloufa MM (1951): The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. *Journal of Animal Science* 10: 226–235.

Microsoft Corporation (2024): Microsoft 365. Microsoft Corporation, Redmond, Washington.

Miß N (2012): Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdünner. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation.

Mocé E, Graham JK (2008): In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science* 105: 104–118.

Monachesi NE, Neild D, Carretero MI (2019): Dog sperm DNA: Raw semen evaluation with Toluidine blue stain. *Reproduction in Domestic Animals* 54: 1078–1084.

Moritz A (Hrsg.) (2013): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer, Stuttgart.

Mortimer D (1985): The male factor in infertility. Part I: Semen analysis. *Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility* 8: 1–87.

- Mota PC, Ramalho-Santos J (2006):** Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 65: 1360–1375.
- Nandi P, Ghosh S, Jana K, Sen PC (2012):** Elucidation of the involvement of p14, a sperm protein during maturation, capacitation and acrosome reaction of caprine spermatozoa. *PLoS ONE* 7: e30552.
- Niżański W, Partyka A, Rijsselaere T (2012):** Use of fluorescent stainings and flow cytometry for canine semen assessment. *Reproduction in Domestic Animals* 47 Suppl 6: 215–221.
- Oberlender G, Murgas LD, Zangeronimo MG, Silva AC, Pereira LJ, Muzzi RA (2012):** Comparison of two different methods for evaluating boar semen morphology. *Archivos de Medicina Veterinaria* 44: 201–205.
- Oettlé EE (1986):** Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12: 145–150.
- Oettlé EE (1990):** Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopic study. Cape Town, University of Cape Town, Dissertation.
- Oettlé EE (1993):** Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 47: 257–260.
- Oettlé EE, Soley JT (1986):** Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing: a pilot trial. *Archives of Andrology* 17: 145–150.
- Paulenz H, Grevle IS, Berg KA, Thomassen R (1995):** The Use of a Dichromatic Stain Method (Spermac®) for Determining Changes in the Acrosomal Integrity of Boar Semen during Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 30: 113–116.
- Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C (1999):** Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52: 965–980.
- Peña AI, Quintela LA, Herradón PG (1998):** Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50: 1211–1220.

Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM (2006): Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals* 41 Suppl 2: 21–29.

Ponglowhapan S, Suwimonteerabutr J, Thuwanut P (Hrsg.) (2016): Comparison of Three Different Stains for Evaluating Acrosome Status of Dog Spermatozoa. In: *Proceedings of the 8th ISCFR*.

Rauhaus H (1990): Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.

Riedelsheimer B, Büchl-Zimmermann S (2015): Färbungen. In: Mulisch M, Welsch U (Hrsg.), *Romeis - Mikroskopische Technik*. Springer 19. Auflage, Berlin, Heidelberg, 172–282.

Riesenbeck A, Vögler D, Hoffmann B (2001): Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma. *Tierärztliche Praxis* 29: 116–120.

Rijsselaere T, van Soom A, Maes D, Kruif A de (2002): Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57: 1669–1681.

Rijsselaere T, van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, Kruif A de (2005): New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology* 64: 706–719.

Risopatrón J, Catalán S, Miska W, Schill W-B, Sánchez R (2002): Effect of Albumin and Polyvinyl Alcohol on the Vitality, Motility and Acrosomal Integrity of Canine Spermatozoa Incubated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 37: 347–351.

Rizkallah N, Chambers CG, Graaf SP de, Rickard JP (2022): Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement. *Animals* 12: 244.

Root Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK (1998): The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association* 34: 348–352.

- Rota A, Ström B, Linde-Forsberg C (1995):** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 44: 885–900.
- Sabnis RW (2010):** Handbook of biological dyes and stains. Synthesis and industrial applications. Wiley, Hoboken, NJ.
- SAS® Institute Inc. (2024):** Base SAS®. SAS® Institute Inc., Cary, NC.
- Schäfer S, Holzmann A (2000):** The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 59: 201–211.
- Schneider A (2014):** Methodische Untersuchung zur Färbung von flüssigkonserviertem Ebersperma. Gießen, Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation.
- Schnorr B, Kressin M (2006):** Embryologie der Haustiere. Ein Kurzlehrbuch. Enke, 5. Auflage, Stuttgart.
- Seager SW, Platz CC (1977):** Collection and evaluation of canine semen. *The Veterinary Clinics of North America* 7: 765–773.
- Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B (2000):** Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53: 789–802.
- Soler C, Gadea B, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Núñez J, Moreira PN, Núñez M, Gutiérrez R, Sancho M, Garde JJ (2005):** Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology* 64: 1236–1243.
- Surmacz P, Niwinska A, Kautz E, Gizinski S, Faundez R (2022):** Comparison of two staining techniques on the manual and automated canine sperm morphology analysis. *Reproduction in Domestic Animals* 57: 678–684.
- Swanson EW, Bearden HJ (1951):** An Eosin-Nigrosin Stain for Differentiating Live and Dead Bovine Spermatozoa. *Journal of Animal Science* 10: 981–987.

Talbot P, Chacon RS (1981): A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *The Journal of Experimental Zoology* 215: 201–208.

Tamuli MK, Watson PF (1994): Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science* 35: 247–254.

Tsakmakidis IA, LyMBERopoulos AG, Khalifa TA (2010): Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *Journal of Veterinary Science* 11: 151–154.

Wales RG (1959): The differential staining of human and dog spermatozoa. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 37: 433–439.

Wehrend A, Bostedt H (2013): Genitaltrakt. Untersuchungsmethoden bei männlichen Kleintieren. In: Moritz A (Hrsg.), *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. Schattauer 7. Auflage, Stuttgart, 503–507.

Weitze KF (2001): Spermatologische Untersuchung. In: Busch W, Holzmann A (Hrsg.), *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer, Stuttgart, 93–108.

Wemmers A, Scholz V (2022): Der große Gehaltsreport für Tiermedizinische Fachangestellte, Stühr.

Williams WW, Pollak OJ (1950): Study of Sperm Vitality with the Aid of Eosin-Nigrosin Stain. *Fertility and Sterility* 1: 178–181.

World Health Organization (1999): WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 4. Auflage, Cambridge.

World Health Organization (2010): WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. World Health Organization, 5. Auflage, Geneva.

World Health Organization (2021): WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. World Health Organization, 6. Auflage, Geneva.

Wysokińska A, Wójcik E, Chłopik A (2021): Evaluation of the Morphometry of Sperm from the Epididymides of Dogs Using Different Staining Methods. *Animals* 11: 227.

Yu I, Songsasen N, Godke RA, Leibo SP (2002): Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. *Cryobiology* 44: 62–78.

Zduńczyk S, Domosławska A, Jamioł M, Kankofer M (2025): Impact of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Quality in Dogs. *Animals* 15: 3169.

Zeller R (2020): Untersuchung von Ejakulatparametern und Hodendimensionen fetiler Rüden unter 10 kg Körpergewicht. München, Ludwig-Maximilians-Universität München, Dissertation.

9 Anhang

Tabelle 30: Rezeptur des zweistufigen Uppsala-Equex-Verdünners (Verdünner I/II) für die Kryokonservierung von Rüdensperma, an der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, Gießen

Komponente	Verdünner I	Verdünner II
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Merck, Art. Nr. 1.08382.1000)	3,025 g	3,025 g
Citronensäure Monohydrat (Fa. Merck, Art. Nr. 1.00242.1000)	1,7 g	1,7 g
Fructose	1,25 g	1,25 g
Aqua bidest.	ad 77 ml	ad 72 ml
Glycerin	3 ml	7 ml
Eigelb	20 ml	20 ml
Equex-Paste (Fa. Minitüb, Art. Nr. 13560/0008)	–	1 ml
Endvolumen	100 ml	100 ml
pH-Wert	6,72	6,74
Osmolarität	865 mOsm	1.495 mOsm
Zubereitung: Die Bestandteile werden abgewogen, in bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend mit Glycerin und Eigelb ergänzt. Für Verdünner II wird zudem Equex-Paste hinzugefügt. Der pH-Wert sowie die Osmolarität werden jeweils kontrolliert und dokumentiert. Die Verdünner werden anschließend portioniert in 2,5-ml-Gefäße abgefüllt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 6 °C gelagert.		

Tabelle 31: Tabellarisches Einfrierprotokoll zur Kryokonservierung von Rüdensperma unter Verwendung des Uppsala-Equex-Verdünners (Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, Gießen)

Prozessphase	Durchführung, Ziel	Temperatur	Dauer
1. Ejakulatgewinnung	manuelle Stimulation nach Standardmethode (Dreier, 2010), Auffangen in vorgewärmten Tulpengläsern	Körpertemperatur	individuell
2. Erste Kühlung	Probe in Kühlschrank überführen, Temperaturadaption	6 °C	unmittelbar
3. Konzentrationsberechnung	Verdünnung entsprechend gewünschter Enddichte berechnen, Ziel: 50 Mio. Spermien je Paillette	37 °C / 6 °C	wenige Minuten
4. Verdünnung I	Zugabe Verdünnung I	6 °C	sofort
5. Abkühlung	Inkubation im Kühlschrank im Wassergefäß, kontrollierte Abkühlung	6 °C	1 Stunde
6. Verdünnung II	Zugabe Verdünnung II	6 °C	Sofort
7. Abfüllung	Probe in Pailletten abfüllen und beschriften, eindeutige Kennzeichnung	6 °C	unmittelbar
8. Vorkühlen	Pailletten 15 Min. über mit Stickstoffdampf gefüllter Wanne kontrolliert abkühlen	ca. –80 bis –120 °C	15 Min.
9. Endgefrieren	Pailletten vollständig in Stickstoff eintauchen, vollständige Kryokonservierung	–196 °C	sofort
10. Lagerung	Einlagerung im Stickstoffcontainer, Dokumentation der Lagerposition	–196 °C	individuell
11. Qualitätskontrolle	nach 24 h Auftauen einer Paillette, Bewertung Auftaurate und Motilität	s. Auftau-protokoll	nach 24 h

Tabelle 32: Ergebnisse der Eingangsuntersuchung der TG-Samenproben 1–5 fertiler Rüden (Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, Gießen), Pathomorphologie-Merkmale und Gesamtanteil in %

Parameter	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Datum	24.02.2015	19.11.2019	16.05.2019	22.08.2014	24.11.2020
Kryokonservierung					
Rasse	Mastiff	American Bulldog	Briard	Border Collie	Deutscher Schäferhund
Name	Fuego	Krümel	Tardieu	Naish	Mondo
abgelöster Kopf	1,5	1	1	4	10
abgeknickter Schwanz	5	3	0	2,5	7
schleifenförmiger Schwanz	3,5	0	0	1,5	2
Plasmatropfen Hals	0	0	0	0	0
Plasmatropfen Mittelstück	2,5	41	36	0	1
Plasmatropfen Endstück	0	0	0	0	0
aufgerollter Schwanz	1,5	0	0	0	2
Halsbruch	2,5	0	3	1	0
kleiner Kopf	0	0	0	0	1
Gesamtanteil	16,5	45	40	9	23

Tabelle 33: Ergebnisse der Eingangsuntersuchung der TG-Samenproben 6–10 fertiler Rüden (Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde, Gießen), Pathomorphologie-Merkmale und Gesamtanteil in %

Parameter	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
Datum	07.09.2020	21.03.2018	19.01.2021	08.11.2012	25.11.2020
Kryokonservierung					
Rasse	Rhodesian Ridgeback	Eurasier	Border Collie	Rhodesian Ridgeback	American Akita
Name	Matobo	Dusty	Lucky	Runaka Chengu	Batch
abgelöster Kopf	3	1	3	2	1
abgeknickter Schwanz	12	2	4	0,5	6
schleifenförmiger Schwanz	4	6	4	1	2
Plasmatropfen Hals	0	0	0	0	0
Plasmatropfen Mittelstück	0	3	2	3	0
Plasmatropfen Endstück	0	0	0	4	0
aufgerollter Schwanz	0	0	0	0,5	0
Halsbruch	2	1	0	0,5	0
kleiner Kopf	0	0	0	0	0
Gesamtanteil	21	13	13	11,5	9

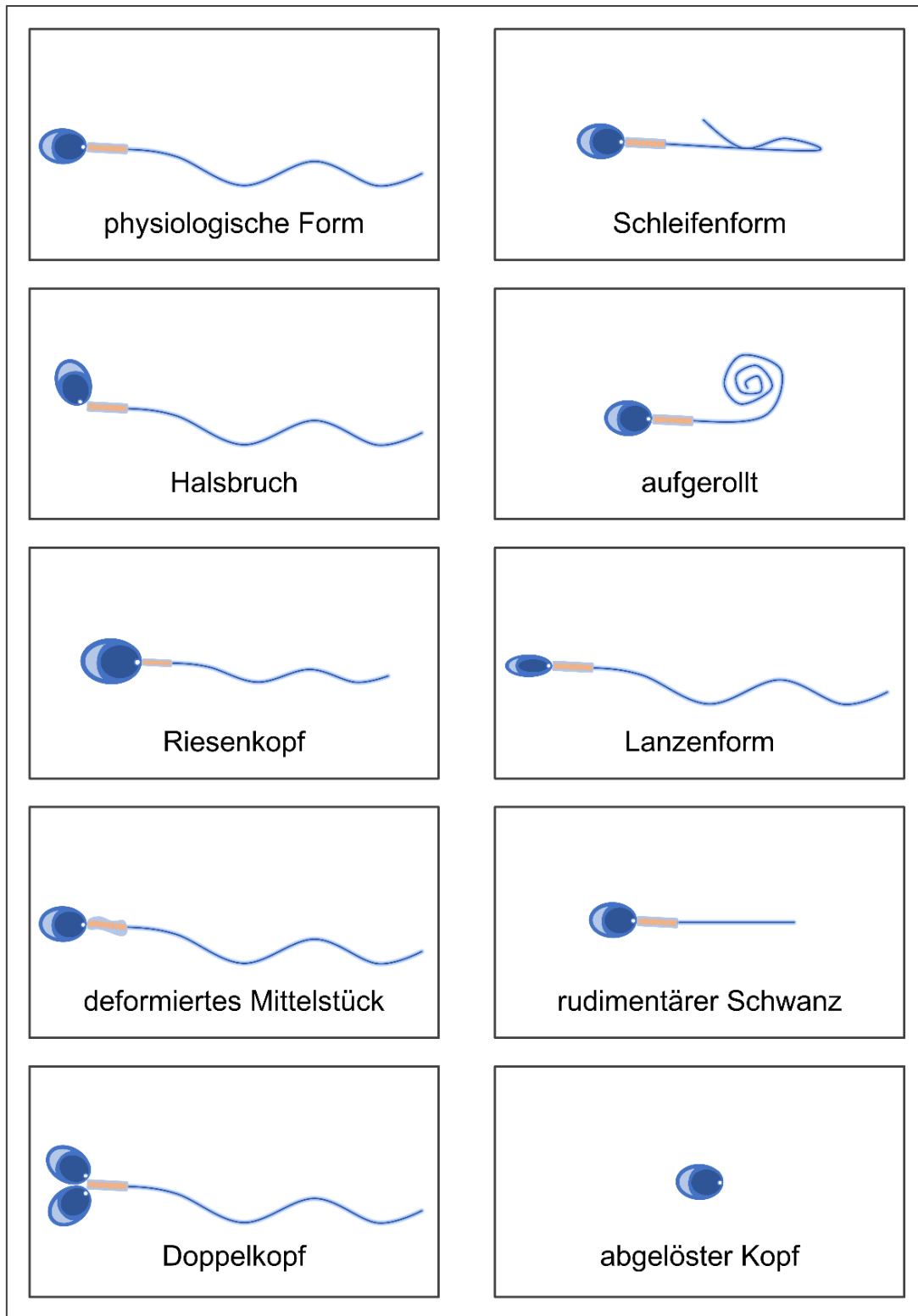


Abbildung 24: Schematische Darstellung gebräuchlicher Pathomorphologien bei aufgetauten TG-Rüdenspermien, eigene Darstellung basierend auf wissenschaftlicher Literatur

Tabelle 34: Befundbogen zur Erhebung der pathomorphologischen Untersuchungsergebnisse (PT = Plasmatrophen)

Probe						
Untersuchungsdatum						
Uhrzeit (Auftaubeginn)						
Färbung	Eosin	Eosin-Nigrosin	Diff-Quick®	Hemacolor®	Spermac®	Formolzitrat-Bengalrosa
Stresstest	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C	<input type="checkbox"/> kein Stresstest <input type="checkbox"/> 37 °C <input type="checkbox"/> 18 °C <input type="checkbox"/> 6 °C
Lagerungsdauer	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate	<input type="checkbox"/> direkt <input type="checkbox"/> 24 h <input type="checkbox"/> 7 Tage <input type="checkbox"/> 3 Monate
Gesamtanteil morphologische Abweichungen (in %)						
Kappenveränderungen						
Akrosom nicht vorhanden						
Akrosom in Ablösung						
Akrosom zu gros/zu klein						
Vakuolen						
Kopfveränderungen						
Zwergkopf						
Riesenkopf						
lanzenförmig						
birnenförmig						
rund						
unregelmäßig deformiert						
Doppelkopf						
abgelöster Kopf						
Mittelstück- und Halsveränderungen						
Halsbruch						
Mittelstück						
deformiert/asymmetrisch						
Mittelstück verdickt/schmal						
Haupt- und Endstückveränderungen						
Schleifenform						
aufgerollt						
gebrochen/geknickt						
rudimentärer Schwanz						
Plasmatrophen						
PT am Mittelstück						
PT am Hauptstück						
PT am Endstück						
Qualitätsparameter						
Farbintensität * ¹						
Detailerkennbarkeit * ²						
Kontrast * ³						
Sonstige Auffälligkeiten						
* ¹ : blass = 1, blass-mäßig = 2, mäßig = 3, mäßig-gut = 4, gut = 5, gut-intensiv = 6, intensiv = 7						
* ² : schlecht = 1, schlecht-mäßig = 2, mäßig = 3, mäßig-gut = 4, gut = 5, gut-deutlich = 6, deutlich = 7						
* ³ : schlecht = 1, schlecht-mäßig = 2, mäßig = 3, mäßig-gut = 4, gut = 5, gut-deutlich = 6, deutlich = 7						

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, die in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Indra Sara Klumb

11 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Axel Wehrend für die sorgfältige und zeitnahe Betreuung und Beratung in allen Phasen der Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Tierklinik für Reproduktionsmedizin und Neugeborenenkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen für die angenehme Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt den Labormitarbeiterinnen, allen voran Frau Simone Heerdt, für die Unterstützung und die schnelle Bereitstellung notwendiger Materialien.

Frau PD Dr. Kathrin Büttner aus der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung danke ich herzlich für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung und die stets verlässliche Betreuung in allen statistischen Fragen.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, meiner besten Freundin Nadine und ganz besonders meinem Mann Johannes für die Geduld und den ständigen Rückhalt – nicht nur während der Promotionszeit. Ein besonderer Dank gilt außerdem allen Babysitterinnen und Babysittern, deren Unterstützung maßgeblich dazu beigetragen hat, dass wissenschaftliches Arbeiten und Familienleben miteinander vereinbar waren.