

**Einfluss verschiedener Konzentrationen von *E. coli*  
var. *haemolytica* und Gentamicin auf selektierte Vital-  
parameter in flüssigkonserviertem Rüdensperma**

**André Sywall**



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

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere  
mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. A. Wehrend

Prof. Dr. S. Goericke-Pesch

**Einfluss verschiedener Konzentrationen von *E. coli*  
var. *haemolytica* und Gentamicin auf selektierte Vital-  
parameter in flüssigkonserviertem Rüdensperma**

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

eingereicht von

**André Sywall**  
Tierarzt aus Sangerhausen

Gießen 2018

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend  
Prof. Dr. S. Goericke-Pesch  
Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 10. Juli 2018

*Meinen Eltern und Großeltern*

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits auf folgenden Kongressen publiziert:

- Sywall A, Wehrend A, Eisenberg T, Goericke-Pesch S. Influence of gentamicin and *Escherichia coli* var. *haemolytica* on the quality of chilled canine semen. Proceedings of the 18th EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Exotics, 2015, 207 [18th EVSSAR (European Veterinary Society for Small Animal Reproduction) Congress, Hannover, Germany, 11.-12.09.2015]
- Sywall A, Wehrend A, Eisenberg T, Goericke-Pesch S. Influence of different concentrations of *E. coli* var. *haemolytica* and gentamicin on selected parameters in chilled canine semen. *Reprod Dom Anim.* 2014, Suppl. 1, 49, 43 [47. Jahrestagung über Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung gleichzeitig 39. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Giessen, 27.-28.02.2014]
- Sywall A, Wehrend A, Eisenberg T, Goericke-Pesch S. Einfluss verschiedener Konzentrationen von *E. coli* var. *haemolytica* und Gentamicin auf selektierte Vitalparameter in flüssigkonserviertem Rüdensperma. *Tierärztl Prax.* 2014, 1, 5-6 [Inn-Lab, Fachgruppe Innere Medizin und klinische Labordiagnostik, 31.01.-01.02.2014, Giessen, Germany]

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>3</b>
2.1	Künstliche Besamung in der Hundezucht .....	3
2.2	Möglichkeiten der Spermaverarbeitung.....	8
2.3	Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma .....	11
2.3.1	Methodik.....	12
2.3.2	Vor- und Nachteile der Flüssigkonservierung .....	17
2.4	Zusammensetzung des Verdünners .....	18
2.5	Bedeutung von Bakterien in nativem und konserviertem Sperma.....	24
2.6	Zusatz von Antibiotika bei der Samenkonservierung .....	28
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1	Versuchsaufbau .....	32
3.2	Experimentelle Kontamination mit <i>ECH</i> .....	34
3.2.1	Auswahl des Keims.....	34
3.2.2	Keimdichtebestimmung der <i>ECH</i> -Suspensionen .....	35
3.2.3	Vorversuch zum Tiefgefrieren einer <i>ECH</i> -Suspension .....	37
3.2.4	Konzentrationseinstellung der <i>ECH</i> -Suspensionen.....	38
3.2.5	Tiefgefrieren der unterschiedlichen <i>ECH</i> -Suspensionen.....	40
3.2.6	Quantitative Kontrolle zugesetzter <i>ECH</i> -Suspensionen.....	41
3.3	Auswahl der Spenderrüden .....	43
3.4	Gewinnung der Rüdenejakulate.....	44
3.5	Beurteilung der Nativejakulate und weitere Aufarbeitung.....	45
3.5.1	Makroskopische Beurteilung.....	45
3.5.2	Vorwärtsbeweglichkeit und Dichtebestimmung .....	45
3.5.3	Poolen und Portionierung.....	46

3.5.4	Zugabe unterschiedlicher Verdüner und Bakterien-Suspensionen.....	46
3.6	Spermauntersuchung.....	47
3.6.1	Untersuchungszeitpunkte und Handhabung.....	47
3.6.2	Mikroskopische Untersuchung.....	47
3.6.3	Computer-assisted sperm analysis (CASA).....	50
3.7	Bakteriologische Untersuchung.....	55
3.7.1	Bakteriologische Analyse des Nativspermas.....	55
3.7.2	Bakteriologische Analyse der Testansätze.....	56
3.8	Statistische Methoden.....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
4.1	Untersuchungsergebnisse der Ejakulate.....	59
4.1.1	Makroskopische Untersuchung.....	59
4.1.2	Bakteriologische Untersuchung.....	59
4.1.3	Dichtebestimmung, Verdünnung und Gentamicin-Endkonzentration.....	60
4.2	Untersuchungsergebnisse der Testansätze zum Zeitpunkt 0.....	61
4.2.1	Mittels CASA erhobene Untersuchungsergebnisse.....	62
4.2.2	Untersuchungsergebnisse des Eosin-Ausstrichs.....	64
4.2.3	Untersuchungsergebnisse der Spermac®-Färbung.....	65
4.2.4	Untersuchungsergebnisse des hypoosmotischen Schwelltests.....	67
4.3	Untersuchungsergebnisse der Testansätze im Zeitverlauf.....	68
4.3.1	Mittels CASA erhobene Untersuchungsergebnisse.....	69
4.3.2	Untersuchungsergebnisse des Eosin-Ausstrichs.....	81
4.3.3	Untersuchungsergebnisse der Spermac®-Färbung.....	83
4.3.4	Untersuchungsergebnisse des Hypoosmotischen Schwelltests.....	87
4.3.5	Bakteriologische Analyse.....	88
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>92</b>
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	92

5.2	Diskussion der Methodik .....	94
5.2.1	Auswahl der Spenderrüden .....	94
5.2.2	Gewinnung der Ejakulate .....	95
5.2.3	Spermatologische Untersuchungsmethoden .....	95
5.2.4	Auswahl und Herstellung der bakteriellen Inokulate.....	99
5.2.5	Bakteriologische Untersuchungen .....	101
5.2.6	Auswahl der Gentamicinkonzentrationen.....	104
5.3	Diskussion der Untersuchung des Nativejakulats.....	105
5.3.1	Makroskopische und mikroskopische Untersuchung.....	105
5.3.2	Bakteriologische Untersuchung .....	105
5.4	Diskussion der Untersuchungsergebnisse der Testansätze.....	106
5.4.1	Mittels CASA erhobene Ergebnisse .....	107
5.4.2	Anteil Lebender/Toter Spermien im Eosin-Ausstrich.....	113
5.4.3	Pathomorphologie und Kappenveränderungen.....	115
5.4.4	Ergebnisse des Hypoosmotischen Schwelltests.....	122
5.4.5	Bakteriologische Analyse .....	124
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>132</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>157</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	157
9.2	Ergebnistabellen.....	160
9.3	Einstellungen des SpermVision™-Systems .....	163
9.4	Chemikalien und Geräte .....	164
9.4.1	Lösungen, Medien und Chemikalien.....	164
9.4.2	Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien .....	165
9.4.3	Herstellungsangaben selbst hergestellter Lösungen .....	166

9.5	Abbildungsverzeichnis.....	167
9.6	Tabellenverzeichnis.....	168
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>170</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>171</b>

# 1 Einleitung und Fragestellung

Die künstliche Besamung (KB) ist eines der ältesten Verfahren der Reproduktionsmedizin. Auch wenn ihre Wurzeln deutlich weiter zurückreichen, so gewann die KB jedoch erst nach dem zweiten Weltkrieg insbesondere zur Bekämpfung von Deckseuchen an Bedeutung. Zusammen mit weiteren Vorteilen, wie der orts- und zeitunabhängigen Verpaarung ausgewählter Zuchttiere, konnten große züchterische Fortschritte erreicht werden, weshalb die KB vor allem bei Nutztieren eine fest in die alltägliche Praxis etablierte Technik darstellt.

In den letzten 30 Jahren gewann die KB auch in der Hundezucht an Bedeutung. Generell kommen Frischsperma, kühl- und kryokonserviertes Sperma (TG-Sperma) zum Einsatz. Frischsperma kommt ohne weitere Bearbeitung aus, ist dadurch allerdings auch in der Lagerfähigkeit stark eingeschränkt, während kryokonserviertes Sperma nahezu unbegrenzt haltbar ist. Kühlkonserviertes Sperma bietet im Vergleich zum TG-Sperma zahlreiche Vorteile, wie einfache Handhabung, Transport und Insemination. Weitere Vorteile dieses Verfahrens sind die sehr guten Konzeptionsraten und die geringe erforderliche Grundausstattung zur Herstellung und Insemination. In der Praxis steigt die Nachfrage nach kühlkonserviertem Sperma stetig an. Der Nachteil der Methode liegt jedoch in der begrenzten Lagerfähigkeit der Spermien. Obgleich Lagerungsdauern von 10 Tagen und länger mit akzeptabler Spermaqualität beschrieben wurden, ist ein Versamen nach zwei bis drei Tagen üblich. Größere Studien, die die Dauer der Befruchtungsfähigkeit des Spermas bei längerer Lagerung darlegen, liegen nicht vor.

Die Samengewinnung beim Rüden ist kein steriles Verfahren, so dass generell ein hohes Risiko einer Kontamination des Spermas mit verschiedenen Bakterien besteht. Des Weiteren konnte bereits beim Menschen und anderen Spezies eine Beeinträchtigung der Samenqualität und der Lagerfähigkeit durch Keime wie *E. coli* nachgewiesen werden. Die Rolle von Bakterien auf die Spermaqualität im Rüdenejakulat konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Um dieses potentielle Risiko einer Qualitätsreduktion zu verringern, werden Flüssigverdünner für die Konservierung von Sperma meist mit einem Antibiotikum versetzt. Ein in kommerziell erhältlichen Verdünnern häufig verwendetes Antibiotikum ist Gentamicin. Genaue Daten über den Einfluss eines Antibiotikums oder von Bakterien auf die Qualität von caninem Sperma stehen jedoch noch aus.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von Gentamicin auf flüssigkonserviertes Rüdensperma sowie bakterielles Wachstum in demselben zu klären. Dabei sollte darauf eingegangen werden, inwiefern Gentamicin auf die Spermien einwirkt und wie effektiv es bakterielles Wachstum, im Speziellen von *E. coli* var. *haem.*, unterbinden kann. Des Weiteren sollte auch der Einfluss von *E. coli* var. *haem.* auf die Samenqualität beim Hund näher geklärt werden.

Um diese Fragestellungen zu beantworten, wurden mittels Splitsample-Verfahren gepoolte Ejakulate mit dem kommerziell erhältlichen CaniPlus Chill® Verdünner (VD) versetzt. Dem VD waren drei verschiedene Konzentrationen an Gentamicin zugesetzt. Als höchste Dosis wurden 200 mg/l Gentamicin (VD 4) festgelegt. Die übrigen VD enthielten 100 mg/l (VD 3) und 20 mg/l (VD 2) Gentamicin. Zudem kam eine Charge ohne Antibiotikum (VD 0) zum Einsatz, die als Negativkontrolle diente. Zu jedem der vier VD wurden zusätzlich noch zwei *E. coli* var. *haem.* Konzentrate (BK 1 und BK 2) inokuliert. Eine Probe ohne Keimzusatz (BK 0) mit den verschiedenen Gentamicinkonzentrationen diente als Negativ-Kontrolle. Die Untersuchung umfasste dabei sowohl eine spermatologische Analyse als auch eine bakteriologische Bewertung der einzelnen Testansätze über die Dauer von vier Tagen bei einer kontinuierlichen Lagerung bei 4 °C. Dies ermöglichte eine Verlaufsbeurteilung von verschiedenen Sperma-Qualitätsparametern sowie die Beurteilung der zugegebenen Keimzahl im Hinblick auf die Gentamicin- und *E. coli* var. *haem.* Konzentration.

## 2 Literatur

### 2.1 Künstliche Besamung in der Hundezucht

Auch wenn die erste KB bei einem Hund bereits 1788 erfolgreich von Lazaro Spalanzani durchgeführt wurde, so gewann diese Methode vorwiegend bei anderen Spezies, wie Rind, Schaf und Schwein an Bedeutung (Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Ein Großteil der Hündinnen in der Zucht wird noch immer durch die Kopulation mit einem Rüden gedeckt (Jeschke, 2008). Jedoch ist das Interesse der Hundezüchter an der KB weltweit stark gewachsen (Thomassen und Farstad, 2009; C. Linde Forsberg, 2010). Die Gründe hierfür liegen zum einen in den mittlerweile sehr guten Erfolgsraten durch ein besseres Verständnis der Reproduktionsphysiologie der Hündin und besserer Technik, zum anderen können durch die Verwendung der KB den Hunden lange, kostspielige Reisen und Quarantäneaufenthalte erspart bleiben. Auch Hunde mit erworbener Deckunfähigkeit (impotentia coeundi) können so noch zur Zucht verwendet werden und das Risiko der Übertragung von Krankheiten und Genitalinfektionen wird minimiert. Durch Kryokonservierung ist eine sehr lange Lagerung der Spermien möglich, was den Aufbau von Samenbanken für besonders gute Zuchttiere und seltene Rassen ermöglicht hat. Des Weiteren können aus einem Ejakulat mehrere Besamungsportionen hergestellt werden. Es besteht die Möglichkeit leicht unterschiedliche Saisonalitäten und verhaltensbedingte Gründe auszugleichen und durch die Untersuchung des Ejakulates ungeeignete Vaterzuchttiere schneller auszuwählen (Pesch et al., 2007; England und Millar, 2008; Thomassen und Farstad, 2009; Linde Forsberg, 2010).

Aktuell liegt die Zahl der Züchter, die die KB zur Zucht bereits eingesetzt haben bei, circa 12 % (Jeschke, 2008). Der tatsächliche, prozentuale Anteil der mittels KB besamten Hunde umfasst entsprechend weniger mit lediglich 0,6 % der Besamungen pro Züchter insgesamt. Speziell in Deutschland ist die Durchführung mit 83 % noch zum Großteil in der Hand des Tierarztes. In den USA ist lediglich die Herstellung und Verwendung von Tiefgefriersperma Tierärzten vorbehalten. In anderen Ländern obliegt die KB ganz dem Veterinärwesen. In Europa liegt der Schwerpunkt mit 50 - 55 % dabei auf der Nutzung von Frischsperma. Tiefgefriersperma kam in 35 - 40 % der Fälle zum Einsatz. Rund 10 % der Hündinnen wurden mit flüssigkonserviertem Sperma besamt (Linde Forsberg, 2010). Nach einer Umfrage dominiert in Deutschland die Verwendung von frisch- bzw.

flüssigkonserviertem Sperma mit fast 91 %. Lediglich 9 % verwenden Tiefgefriersperma (Jeschke, 2008).

Die Erfolgsraten der KB sind von verschiedenen Faktoren abhängig. Eine wichtige Rolle dabei spielt der Status der Hündin. Da die Überlebenszeit der Spermien, insbesondere nach Kryokonservierung, stark herabgesetzt wird - im Durchschnitt auf unter 24 h - ist eine genaue zeitliche Abstimmung wichtig (Pesch et al., 2007; Linde Forsberg, 2010). Zusätzlich steigt die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Trächtigkeit durch Mehrfachbesamung. In der Regel beträgt der Abstand zwischen den KBs einen Tag, seltener wenige Tage (Busch und Waberski, 2007; England und Millar, 2008; Linde Forsberg, 2010). Als Anhaltspunkt für den Besamungszeitpunkt wird häufig neben der Vaginalzytologie die ansteigende LH-Plasmakonzentration oder der etwas ungenauere und täglichen Schwankungen unterliegende Plasma-Progesteronwert herangezogen. Idealerweise sollte die Besamung zwei bis fünf Tage nach der Ovulation und dem Anstieg der LH Konzentration und bei einem Progesteronwert von 10 - 20 ng/ml erfolgen (Wright, 1991; Linde Forsberg, 2010).

Ein weiterer Einflussfaktor ist der Ort der Samendeponierung. Man unterscheidet zwischen intravaginaler, transzervikaler-intrauteriner, tief intrauteriner und chirurgisch intrauteriner Besamung (Pesch et al., 2007) mit steigender Effizienz, desto weiter cranial man die Spermaportion platzieren kann (England und Millar, 2008; Thomassen und Farstad, 2009; Linde Forsberg, 2010). Untersuchungen ergaben deutliche Unterschiede sowohl in der Trächtigkeitsrate, als auch in der Wurfgröße wie in Tab. 1 dargestellt. Durch eine Positionierung der Samenportion im Uterus anstatt intravaginal kann die Konzeptionsrate bei frisch- und flüssigkonserviertem Sperma um 36 % und bei Tiefgefriersperma um 50 % gesteigert werden (Rota et al., 1999a; Linde Forsberg, 2010).

Tabelle 1: Darstellung der Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen bei unterschiedlichen Spermaarten gekoppelt mit unterschiedlichen Ort der Samendeponierung (Linde Forsberg, 2010)

	Trächtigkeitsrate	Wurfgröße [Welpen]
Natürliche Paarung	82,9 %	6,5±0,35
Frischsperma		
Intravaginal	47,7 %	6,5±0,19
Intrauterin	62,0 %	6,4±0,43
Flüssigkonserviertes Sperma		
Intravaginal	45,4 %	6,4±0,31
Intrauterin	65,0 %	6,5±0,71
Tiefgefriersperma		
Intravaginal	36,7 %	2,9±1,09
Intrauterin	55,5 %	5,2±0,32

Die Besamungsdosis hängt neben der Lokalisation der Samendeponierung auch maßgeblich von der Qualität des verwendeten Spermas ab. Empfohlen werden  $150 - 200 \times 10^6$  Spermien pro Besamung (Linde Forsberg, 1995; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Es wurden jedoch auch Trächtigkeiten beschrieben, bei denen lediglich  $20 \times 10^6$  Spermien in die Uterushornspitze verbracht wurden. So scheint bei kryokonserviertem Sperma eine vaginale Insemination zehnmal so viele Spermien für eine gleiche Befruchtungsrates zu benötigen wie eine intrauterine (Tsutsui et al., 1989; Linde Forsberg et al., 1999). Die Gesamtmotilität des zu verarbeitenden Frischspermas sollte einen Richtwert von 70 % nicht unterschreiten. Die primären und sekundären Spermienveränderungen sollten unabhängig von der Konservierungsmethode unter 40 % liegen. Werden diese Werte überschritten, so kann durch eine Erhöhung der Gesamtspermienzahl versucht werden, die Defizite zu kompensieren (Mickelsen et al., 1993; Pesch et al., 2007; Linde Forsberg, 2010). Das empfohlene Besamungsvolumen ist für die einzelnen Rassen unterschiedlich. Genaue Richtwerte wurden zwar noch nicht veröffentlicht, es sollten je-

doch aufgrund des relativ geringen Fassungsvermögens des Uterus 1 - 3 ml bei der intrauterinen und 3 - 5 ml bei der intravaginalen Besamung nicht überschritten werden (Peña et al., 2006; Linde Forsberg, 2010).

Wie oben aufgezählt sind derzeit 4 verschiedene Techniken der Samenübertragung gängig und werden für die KB eingesetzt. Die einfachste Methode ist die intravaginale Besamung, bei der jedoch noch eine relativ hohe Beweglichkeit der Spermien (Rijsselaere und van Soom, 2010), wie bei frisch- oder kühlkonserviertem Sperma i.d.R. vorhanden, vorhanden sein sollte (Rota et al., 1999a; Pesch et al., 2007; Thomassen und Farstad, 2009). Eine Plastikpipette oder Osiris-Pipette wird in die dorsale Vulvakommissur eingeführt und weiter erst craniodorsal, später horizontal bis zum caudalen Ende der Zervix vorgeschoben (Rijsselaere und van Soom, 2010). Der Ballon der Osiris-Pipette wird aufgeblasen und verbleibt circa 10 min in der Vagina, um den Bulbus des Penis zu imitieren und Kontraktionen zu stimulieren. Um ein Zurücklaufen des Spermas zu vermeiden, wird das Ejakulat langsam abgegeben und danach der Hund an der Hinterhand für mehrere Minuten im Winkel von 45 - 60° angehoben (Pesch et al., 2007; Rijsselaere und van Soom, 2010). Eine Studie von Pinto et al. zeigt jedoch keinen Vorteil von einer Anhebedauer länger als einer Minute (Pinto et al., 1998).

Die Durchführung der transzervikalen-intrauterinen Besamung stellt die nächste Stufe der KB dar. Durch die so bereits umgangene Zervixpassage sind bessere Besamungsergebnisse zu erzielen (Andersen, 1975; Nizański, 2005). Allerdings ist die Technik auch schwieriger zu erlernen (Watts et al., 1996). Durch die nicht invasive Technik kann, im Vergleich zur laparotomischen oder laperoskopischen Samenübertragung (Silva et al., 1995), die Hündin hier zumeist ohne Anästhesie verbleiben (Wilson, 2001). Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten die Zervix zu passieren: mittels Metallkatheter (Norwegischer Katheter) oder endoskopisch (Linde Forsberg, 2010). Letztere erfreut sich durch sehr gute Akzeptanz beim Besitzer, geringe Risiken und gute Erfolgsquoten wachsender Beliebtheit, auch wenn die Anschaffungskosten vergleichsweise hoch sind (Wilson, 1992). Das Endoskop wird in die Vagina eingeführt, die Zervix dargestellt, ein Blasenkatheter unter Sichtkontrolle durch den Gebärmutterhals geschoben und dann die Besamungsdosis abgegeben (Wilson, 2003; Rijsselaere und van Soom, 2010). Bei Komplikationen oder Schwierigkeiten, wie schlechte Sicht durch das Vorhandensein von viel Mukus in der Vagina oder Erstlingshündinnen kann auf eine tief intravaginale Besamung

zurückgegriffen werden (Pesch et al., 2007). Die skandinavische Technik, bei der ein dafür entworfener Metallkatheter durch die Zervix geschoben wird, wurde ursprünglich zur KB von Füchsen entwickelt (Andersen, 1975; Thomassen und Farstad, 2009). Zuerst wird die Zervix durch die Bauchwand palpiert und fixiert, der Norwegische Katheter hindurch gefädelt und schließlich das Ejakulat platziert. Die Technik erfordert lange Einarbeitungszeiten, funktioniert dann jedoch meist schnell und gut (Linde Forsberg, 2010). Komplikationen stellen unruhige und adipöse Tiere dar, bei denen die Palpation nur schwer durchzuführen ist (Wilson, 1992).

Für die intrauterine Insemination durch eine Laparotomie muss die Hündin in Narkose gelegt werden. Mit einem kleinen Schnitt von etwa 5cm in der Linea alba wird das Abdomen eröffnet und die Gebärmutter vorgelagert. Die aufgetauten Spermien werden direkt mit einer feinen Injektionsnadel in den Uterus injiziert (Rijsselaere und van Soom, 2010). In Ländern wie den USA, Kanada und Großbritannien sowie auch in der Zucht von Greyhounds, wird dieses Verfahren regelmäßig durchgeführt (Linde Forsberg, 2010; Rijsselaere und van Soom, 2010). Auch wenn diese Technik sehr gute Geburtsraten liefert (bis zu 92 %) (Rijsselaere und van Soom, 2010), ist das Verfahren aufgrund der potentiellen Risiken, die mit einer vollständigen Laparotomie einhergehen (Pesch et al., 2007; Linde Forsberg, 2010), ethisch sehr umstritten und in mehreren Ländern wie Norwegen, Schweden und den Niederlanden gesetzlich verboten. Zudem besteht keine Möglichkeit einer Mehrfachbesamung (Wilson, 2001).

Eine Alternative stellt die laparoskopische intrauterine Besamung dar (Silva et al., 1995). Sie wird jedoch nur selten angewendet (Linde Forsberg, 2010). Diese Methode vermeidet die negativen Nebeneffekte der Laparotomie, wie Infektionsdruck oder längere Erholungsphasen. Eine Narkose ist jedoch dennoch notwendig (Silva et al., 1995).

Die bei der intrauterinen Besamung gewählte Position der Spermien-deposition spielt, zumindest bei der laparoskopischen Insemination, keine Rolle für die Verteilung der Spermien, da diese im Anschluss im gesamten Uterus und damit auch im kontralateralen Horn nachweisbar sind (Fukushima et al., 2010).

## 2.2 Möglichkeiten der Spermaverarbeitung

Für die KB der Hündin gibt es im Wesentlichen drei Möglichkeiten, das gewonnene Ejakulat zu verarbeiten. Neben der Möglichkeit, das Sperma ohne weitere konservierende Maßnahmen und Zusätze als Nativ- oder Frischsperma zu übertragen, sind die Verwendung von kühl- bzw. flüssigkonserviertem Sperma und Kryo- bzw. Tiefgefriersperma gängige Verfahren, Ejakulate für längere Lagerung oder Transporte haltbar zu machen. Die einzelnen Konservierungsverfahren haben unterschiedliche Vor- und Nachteile, die auf das jeweilige Verwendungsziel abgestimmt werden müssen (Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Thomassen und Farstad, 2009) und im Folgenden aufgeführt werden: Nativsperma kann verwendet werden, wenn eine Paarung auf natürlichem Weg nicht möglich ist. Dem können sowohl physische Ursachen, wie erworbene Anomalien des Geschlechtstrakts, als auch verhaltensbedingte Ursachen zugrunde liegen. Nach der manuellen Samenentnahme sollte der Insemination eine Qualitätsuntersuchung des Ejakulates vorausgehen. Bei der Verwendung von frischem Sperma wird für gewöhnlich die gesamte Samenportion mit entsprechenden Mengen Prostatasekret verwendet. Das Volumen sollte je nach Größe der Hündin 2 - 4 ml aufweisen,  $150 \times 10^6$  motile Spermien beinhalten und am äußeren Muttermund instilliert werden (Peña et al., 2006). Eine Lagerung des Spermas bis zu 48 h ist zwar möglich, jedoch verschlechtert sich dabei der Besamungserfolg deutlich. Die durchschnittliche Motilität nimmt ab und der Anteil an morphologischen Veränderungen steigt an. Eine Erhöhung der Besamungsdosis kann den Effekt teilweise kompensieren (Tsutsui et al., 2003). Die Vorteile dieses Verfahrens liegen in der guten Erfolgsrate, auch bei suboptimalen Umständen (Farstad, 1984; Linde Forsberg, 2010) und den geringen Kosten.

Auf die Methodik der Flüssigkonservierung bzw. Kühlkonservierung von Sperma wird im Nachfolgenden, unter Punkt 2.3, ausführlich eingegangen.

Durch die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  ist eine nahezu unbegrenzte Lagerung von Sperma möglich (Busch und Waberski, 2007; England und Millar, 2008). Der Stoffwechsel der Samenzellen geht dabei in eine Anabiose (Hoffmann, 2003). Da die Vitalparameter der Spermien nach dem Auftauen deutlich unter die Ausgangswerte fallen, sind bei diesem Verfahren Ejakulate mit guten Ausgangswerten erforderlich. Richtwerte hierfür sind in der folgenden Tab. 2 wiedergegeben (Hoffmann, 2003; Pesch et al., 2007). Eine schlechte Qualität der Besamungsportion kann auch hier in ge-

wissen Maßen durch Erhöhung der Besamungsmenge ausgeglichen werden. Dies schränkt jedoch die Anzahl der Besamungsdosen und damit die Anzahl der mit einem Ejakulat besamten Hündinnen weiter ein (Farstad, 2009).

Tabelle 2: Qualitätskriterien für Rüdensperma (Pesch et al., 2007)

Kriterium	Referenzwerte
Vorwärtsbewegliche Spermien (%)	≥ 75 %
Morphologisch veränderte Spermien (%)	≤ 20 %
pH-Wert	6,2 – 7,2
Gesamtspermienzahl (×10 <sup>9</sup> )	0,3 – 1,0 <sup>1</sup>
Volumen spermienreiche Fraktion (ml)	0,5 - 2,0
<sup>1</sup> Abhängig von der Körpergröße; z.B. Dackel ≥ 0,3, Dobermann > 1,0	

Nicht jedes Ejakulat weist gleich gute Eigenschaften und Ergebnisse bei der Kryokonservierung auf, was auf individuelle Unterschiede innerhalb der Spezies zurückzuführen ist (Rota et al., 2005; Farstad, 2009). Gründe hierfür können u. a. im Alter der Rüden liegen (Thomassen et al., 2006), in der Fettsäurezusammensetzung der Zellmembran und in Antioxidantien (Farstad, 2009). Als nicht kompensierbarer Faktor spielt zudem die Spermien DNA-Struktur eine Rolle, welche zwar nicht für die Fertilisation, jedoch für die weitere Embryonalentwicklung essentiell ist (Fatehi et al., 2006).

Nach der manuellen Stimulation und fraktionierten Gewinnung des Ejakulates wird häufig eine Zentrifugation angeschlossen. Diese bietet den Vorteil das physiologisch geringer konzentrierte Sperma (Busch und Bader, 2001) zu konzentrieren. Zudem wird Prostatasekret entfernt, wodurch die Auftauergebnisse verbessert werden. Kommt eine Dichtengradientenzentrifugation zum Einsatz, kann die Qualität des Spermias noch weiter verbessert werden. Dabei werden motile, unversehrte Spermien mit intakter DNA von der Gesamtpopulation und dem Seminalplasma mit dem Mikrobiom und dem Detritus getrennt (Morrell, 2006).

Für die Herstellung ist eine Vielzahl verschiedener Protokolle bekannt, die individuell variieren können (Szász et al., 2000; Nizański, 2006; Peña et al., 2006; Pesch et al.,

2007). Die Zusammensetzung der Verdünner ist denen der Flüssigkonservierung sehr ähnlich (Pesch et al., 2007). Sie basieren auf einer TRIS-Lösung mit verschiedenen Zuckern wie Glukose und Fruktose, Zitronensäure, Eigelb und einem Antibiotikum (Szász et al., 2000; Peña et al., 2006). Da durch den Gefrierprozess Eiskristalle entstehen, die starke osmotische Gradienten erzeugen und die Zellmembranen schädigen können (Peña et al., 2006), wird noch ein Kryoprotektivum in Form von 4 - 6 % Glycerin ergänzt (Nizański, 2006; Pesch et al., 2007; Farstad, 2009). Eine Zugabe von Detergenzien wie Equex Paste (Minitüb, 84184 Tiefenbach, Deutschland) oder Orvus Es Paste (OEP, Nova Chemical Sales, Scituate, Inc., MA, USA) verbessert die Überlebenszeit wieder aufgetauter Spermien noch weiter (Rota et al., 1997; Tsutsui et al., 2000; Peña Martínez, 2004; Alhaider und Watson, 2009).

Zu unterscheiden sind ein- und zweiphasige Verdünner (Miß, 2012). Generell wird der Verdünner langsam unter Schwenken zum Samen hinzugegeben (Pesch et al., 2007). Ziel ist dabei, das Sperma auf eine Dichte von  $100 - 200 \times 10^6$  Spermien/ml zu verdünnen (Nizański, 2006; Pesch et al., 2007). Einzelne Portionen von 0,5 ml werden in Pailletten (z.B. Midi-Paillette, Minitüb, 84184 Tiefenbach, Deutschland) abgefüllt und heruntergekühlt (Pesch et al., 2007; Linde Forsberg, 2010). Das Herabkühlen auf 5 °C erfolgt zunächst für eins bis 2 h im Kühlschrank, gefolgt von der Tiefkühlung in flüssigem Stickstoff. Auch hier werden verschiedene Kühlraten und Protokolle angewandt (Szász et al., 2000; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007), wie beispielsweise ein stufenweises Einfrieren durch zehnminütige Lagerung 4 - 12 cm über dem Flüssigkeitsspiegel und darauffolgendes Eintauchen in den flüssigen Stickstoff (-196 °C) (Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Langsameres Einfrieren scheint sich positiv auf die Motilität und auf andere, nach dem Auftauen gemessene Parameter auszuwirken (Rota et al., 2005). Der Einfluss des Kühlregimes kann dabei in gewissen Maßen sogar den Einfluss der unterschiedlichen Verdünner auf einzelne Parameter, wie Akrosomenmembran, übersteigen (Szász et al., 2000).

Eine Erfolgs- und Qualitätskontrolle wird frühestens 12 h nach dem Einfrieren angeraten. Die Spermien sollten durch den Konservierungsprozess nicht mehr als 20 % ihrer Vorwärtsbeweglichkeit verlieren. Zusätzlich kann die Anzahl an tertiären, morphologischen Veränderungen durch die Zunahme von z.B. losen Köpfen bis auf 30 % erhöht sein (Hoffmann, 2003).

Der Auftauprozess wird ebenfalls unterschiedlich gehandhabt. Die Pailletten werden entweder langsam über 20 - 50 Sekunden in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut (Szász et al., 2000; Pesch et al., 2007) oder durch das Verbringen in ein 70 °C warmen Wasserbad für 6-8 Sekunden (Szász et al., 2000; Nizański, 2006; Peña et al., 2006). Generell gilt, dass einem langsamen Einfrieren ein langsames Auftauen und einem schnellen Einfrieren ein schnelles Auftauen folgen sollte (Peña et al., 2006).

Zur Insemination können je nach Qualität eins bis vier 0,5 ml Pailletten verwendet werden, um eine ausreichend hohe Anzahl von min.  $150 \times 10^6$  vorwärtsbeweglichen Spermien sicherzustellen (Pesch et al., 2007). Um zu gewährleisten, dass nach der Besamung auch eine ausreichende Anzahl an Spermien in das ipsilaterale Uterushorn gelangt, werden sogar  $200 \times 10^6$  vorwärtsbeweglichen Spermien empfohlen (Tsutsui et al., 1989).

Die Vorteile der Kryokonservierung liegen, wie bereits erwähnt, in der sehr guten Lagerungsfähigkeit, die z.B. den Aufbau von Samenbanken ermöglichen (Peña et al., 2006; England und Millar, 2008). Allerdings sind insbesondere die Transportkosten, die oft die Tierarztkosten überschreiten, die Herstellungskosten und die schlechteren Fertilisationseigenschaften klare Nachteile gegenüber den anderen Verfahren (Nizański, 2006; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Thomassen und Farstad, 2009; Linde Forsberg, 2010).

### **2.3 Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma**

Die Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma bietet viele Vorteile für die Hundezucht (England und Ponzio, 1996; Peña et al., 2006) und obwohl bereits 1954 erste Versuche durchgeführt wurden (Harrop, 1954), so etablierte sich diese Methode erst in den letzten 20 Jahren (Bouchard et al., 1990; Linde Forsberg, 1991; Rota et al., 1995; England und Ponzio, 1996; Tsutsui et al., 2003). Die Intention besteht darin, eine möglichst lange Erhaltung der Befruchtungsfähigkeit der Spermien während der Lagerung bei 4 °C zu erzielen (Hoffmann, 2003). Mit dem Herabkühlen des Spermias tritt jedoch eine Problematik auf, die als Kälteschock bezeichnet wird. Die damit verbundenen Phänomene sind noch nicht vollends verstanden. Spermien-Motilität und -Metabolismus werden vermindert und es treten Veränderungen der Membranpermeabilität auf, was einen gestörten zellulären Austausch zur Folge hat (Rota et al., 1995; Rota et al., 1997; Bencharif et al., 2013). Obgleich Hundesperma eine gewisse Eigenresistenz gegen Kühlschäden

besitzt (Bouchard et al., 1990; Hoffmann, 2003), muss die Beeinträchtigung der Spermien durch die Zugabe von geeigneten Verdünnern und Zusatzstoffen, die die Zellmembran und das Akrosom stabilisieren, weiter minimiert werden (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Busch und Waberski, 2007; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Kasimanickam et al., 2012; Bencharif et al., 2013). Ein zu starkes Absinken der Temperatur, das zum Einfrieren des Ejakulates und damit zu Gefrierschäden führt, sollte dennoch vermieden werden (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Lopes et al., 2008). Der Verdünner dient zudem der Energieversorgung der Spermien während der Lagerung, dem Konstanthalten des pH-Wertes und dem Einstellen der Osmolarität (Silva et al., 2002; Ponglowhapan et al., 2004; Bencharif et al., 2008; Witte et al., 2009). Die Haltbarkeit liegt zwischen 1 und 14 Tagen (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Tsutsui et al., 2003; Linde Forsberg, 2010). Die Herstellung und KB sind allerdings im Vergleich zum Tiefgefriersperma deutlich weniger aufwendig (Peña et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007).

### **2.3.1 Methodik**

Bei der Herstellung von flüssigkonserviertem Sperma wird das Sperma gewöhnlich durch manuelle Stimulation gewonnen und fraktioniert in vorgewärmten Gefäßen aufgefangen. Verwendet wird vorzugsweise die zweite, spermienreiche Fraktion. Die Anwesenheit einer läufigen Hündin kann den Erfolg und die Ausbeute der Absamung noch verbessern (Linde Forsberg, 1991, 1995; Peña et al., 2006). Nach der Samengewinnung werden das Volumen, die Farbe und gegebenenfalls der pH-Wert der Fraktionen ermittelt (Freshman, 2002). Mikroskopisch werden zudem noch die Motilität, die unmittelbar nach der Entnahme beurteilt werden sollte (Freshman, 2002), die Dichte bzw. Gesamtspermienzahl, der Anteil lebender Spermien und die pathomorphologischen Veränderungen der Spermien routinemäßig vor der Konservierung kontrolliert (Busch und Bader, 2001; Busch und Waberski, 2007).

Je nach Protokoll wird das Seminalplasma belassen oder mittels Zentrifugation entfernt; es werden verschiedene positive Eigenschaften als auch negative Effekte des Seminalplasmas diskutiert. Für das Belassen des Seminalplasmas sprechen immunmodulatorische Effekte und Stimulation des Spermientransports im weiblichen Genitaltrakt und die Versorgung, Regulation und der Schutz der Spermien durch z.B. Antioxidantien (Busch und Waberski, 2007; De Souza et al., 2007; Farstad, 2009; Koderle et al., 2009). Das Ab-

zentrifugieren, wie insbesondere bei der Kryokonservierung noch üblich (Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006), entfernt jedoch potentielle Schadstoffe wie zellulären Detritus, reaktive Sauerstoffspezies und bestimmte Pathogene (England und Allen, 1992; Rota et al., 1995; Rijsselaere et al., 2002; Morrell, 2006; Strzeżek und Fraser, 2009). Sirivaidyapong et al. (2000) konnte weder einen positiven noch einen negativen Einfluss von Seminalplasma auf flüssigkonservierte Samen feststellen (Sirivaidyapong et al., 2000b). Eine Beschädigung der Spermien durch die Zentrifugation kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden (Rijsselaere et al., 2002; Koderle et al., 2009). Studien an flüssigkonservierten Hengst ejakulaten zeigten sogar unterschiedliche Ergebnisse zwischen verschiedenen Eignungsgruppen und partieller Abtrennung des Seminalplasmas (Brinsko et al., 2000).

Die Abtrennung, insofern gewünscht, kann nach verschiedenen Zentrifugationsprotokollen erfolgen (Rota et al., 1995; Sirivaidyapong et al., 2000b; Rijsselaere et al., 2002; Tsutsui et al., 2003; Busch und Waberski, 2007; Pesch et al., 2007; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; De Los Reyes et al., 2009; Michael et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). In einer Studie von Rijsselaere et al. (2002) wurde gezeigt, dass zu hohe Zentrifugationsbeschleunigung von  $1620 \times g$  oder mehr zu einer Beschädigung der Spermien führten. Wird die Zentrifugalbeschleunigung auf unter  $720 \times g$  oder  $180 \times g$  reduziert, steigt hingegen der Verlust an Spermien, die mit dem Überstand abpipettiert werden (Rijsselaere et al., 2002). Als optimal wird eine Zentrifugation bei  $720 \times g$  für 5 Minuten diskutiert (Rijsselaere et al., 2002). Jedoch zeigte sich auch hier, zumindest bei der Kryokonservierung, eine Beeinträchtigung der Beweglichkeit, der Morphologie der Spermien als auch ein Anstieg Chromatindenaturierung, weshalb eine Zentrifugation nicht uneingeschränkt empfohlen werden kann (Koderle et al., 2009).

Als nächstes wird der Verdünner bei Raumtemperatur (Peña et al., 2006; Kmenta et al., 2011; Kasimanickam et al., 2012) oder  $35 \text{ °C} - 37 \text{ °C}$  (Linde Forsberg, 1995; Nishiyama et al., 1999; Bencharif et al., 2013) langsam und unter leichtem Schwenken an den Rand des Gefäßes zu den Spermien hinzu pipettiert (Pesch et al., 2007). Die Menge des Verdünners, die den Spermien hinzugegeben wird und der damit einhergehende Verdünnungsgrad, hängt von der Konzentration des Ausgangsejakulates und den Verwendungsbestimmungen (z.B. Größe und Anzahl der Hündinnen) ab (Peña et al., 2006). Das Mengen-Verhältnis zwischen Ejakulat und Verdünner variiert meist zwischen 1:3 bis 1:6 (England und Ponzio, 1996; Nishiyama et al., 1999; Iguer-ouada und Verstegen, 2001b;

Peña et al., 2006; Busch und Waberski, 2007; Pesch et al., 2007; Kmenta et al., 2011). Für eine erfolgreiche Besamung sollte eine Verdünnung des Ejakulats auf  $100 - 300 \times 10^6$  Spermien/ml nicht unterschritten werden (Nishiyama et al., 1999; Tsutsui et al., 2003; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Kasimanickam et al., 2012).

Die für die Konservierung gebräuchliche Lagertemperatur liegt üblicherweise bei  $4\text{ °C} - 5\text{ °C}$  (Bouchard et al., 1990; Linde Forsberg, 1995; Rota et al., 1995; England und Ponzio, 1996; Versteegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Kmenta et al., 2011). Höhere Lagerungstemperaturen, wie  $22\text{ °C}$  oder  $35\text{ °C}$ , erwiesen sich dagegen als weniger geeignet (Bouchard et al., 1990). Das Herabkühlen sollte dabei, um einen Kälteschock zu vermeiden, nicht zu schnell erfolgen. Gut geeignet ist ein Wasserbad, in das die fertig aufbereiteten Ejakulate gebracht werden. Dieses wird anschließend in den Kühlschrank gestellt. Außerdem können so Temperaturschwankungen während der Lagerung minimiert werden (England und Ponzio, 1996; Rijsselaere et al., 2002; Versteegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Kmenta et al., 2011). Alternativ kann auch eine Styroporbox (Pesch et al., 2007) oder ein programmierbares Niedrigtemperatur-Wasserbad (z.B. UH-JF, Chino Ltd., Japan) verwendet werden (Tsutsui et al., 2003). Eine Kühlrate von  $0,3 - 1\text{ K/min}$  scheint in Anbetracht verschiedener Motilitätsparameter ideal zu sein (Bouchard et al., 1990). Das fertig bearbeitete Ejakulat sollte anschließend im Dunkeln aufbewahrt werden (Peña et al., 2006).

Zum Versenden empfehlen sich sterile, gut verschließbare  $5 - 12\text{ ml}$  Plastikröhrchen, da diese beim Transport nicht zerbrechen. Soll der Samen zudem für mehrere Besamungen genutzt werden, ist dieser vor der Lagerung bzw. dem Versand in einzelne Behältnisse abzufüllen, um Unterbrechungen der Kühlkette zu verhindern (Linde Forsberg). Die genauen Kennzeichnungs- und Registrierungsbedingungen sind bei der jeweiligen Behörde und dem Zuchtverband zu erfragen. Generell wird empfohlen, den Samen mit Name, Rasse, Alter, Chipnummer des Hundes und dem Datum der Entnahme sowie Details zum Ejakulat und dem verwendeten Verdünnungsmittel zu kennzeichnen (Linde Forsberg; Peña et al., 2006).

Für den Transport der Ejakulate wurden verschiedene Methoden getestet. Auch wenn dabei kommerzielle Systeme bessere *in vitro* Resultate zeigten (Lopes et al., 2009), sind bei kurzer Transportdauer auch andere Varianten praktikabel. So kann die Samenportion z.B. in einer vorgekühlten Thermoskanne verschickt werden. Um den Samen werden entweder feuchte Wattebällchen gelegt oder ein Tuch als Frostschutz gewickelt und

„crushed ice“ hinzugegeben (Peña et al., 2006; Lopes et al., 2009). Bei einer Lagerung von mehr als 24 h können speziell für den Zweck entwickelte Styroporboxen (Minitüb Neopor, Ref. No. 17229/0001, /0002, /0005; Lane Semen Transport System, Lane Manufacturing Inc., Denver, CO), wie sie auch beim Versand von flüssigkonserviertem Hengstsperma zum Einsatz kommen, eine bessere Spermienqualität erzielen (Pinto et al., 1999; Lopes et al., 2009; Linde Forsberg, 2010). Diese Boxen werden mit zwei Kühl-Akkus bestückt, die zuvor bei -20 °C eingefroren wurden. Diese können die Temperatur bis zu 45 h halten (www.minitüb.de). Bei einer Lagerung von mehr als 48 h wiesen Ejakulate, welche in einem für Hengstsamen entwickelten Equitainer® (Minitüb, 84184 Tiefenbach, Deutschland) aufbewahrt wurden, im Vergleich zu der Styropor-Box und der Thermoskanne, die besten Konservierungseigenschaften auf (Linde Forsberg, 2014; Lopes et al., 2009). Bei Verwendung des Equitainer wird eine Kühlrate von -0,3 K/min erreicht und die Endtemperatur von 4 °C - 6 °C kann für mindestens 36 h gehalten werden (Douglas-Hamilton et al., 1984).

Um mit dem flüssigkonservierten Ejakulat optimale Besamungserfolge zu erzielen, sollten Lagerungs- und Transportdauer so kurz wie möglich gehalten werden (England und Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004). So wird generell zum Versamen innerhalb von 3 Tagen nach Herstellung geraten. Damit ist auch ein internationaler Transport gewährleistet (Rota et al., 1995; Tsutsui et al., 2003; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007).

Betrachtet man verschiedene Vitalparameter, die sich für die Beurteilung der Qualität von Spermien etabliert haben (Freshman, 2002; Peña Martínez, 2004), sind in vitro sogar noch deutlich längere Lagerungen möglich. Ausgehend von Ejakulaten sehr hoher Qualität konnten in einem TRIS-Glukose Eigelb Verdünner noch gute Motilitätsraten von mehr als 50 % nach 13 ±1 Tagen (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b) oder sogar über 70 % nach 14 Tagen (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007) festgestellt werden. Eine Aufbewahrung der konservierten Spermien über 10 Tage mit Erhalt der Fertilität ist damit denkbar (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b), bedarf jedoch weiterer „in vivo“ Studien (Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007).

In einer Veröffentlichung von 2005 dokumentierten Verstegen et al. akzeptable Trächtigkeitsraten von über 9 ±1,8 Tagen gekühlten Spermien und zweimaliger intravaginaler Besamung (Verstegen et al., 2005). Bei einer Trächtigkeitsrate von 70 % wurden durchschnittlich 4,6 ±2,8 Welpen geworfen. Durch Zentrifugieren des verdünnten Samens und

Ersetzen des Überstandes durch neuen Verdünner konnte die Motilität bis zum Tag 21 bzw. 27 Tag erhalten werden. Darüber hinaus konnte keine weitere Steigerung erreicht werden. Die Kontrollprobe ohne Substratwechsel wies bereits nach 16 Tagen keine Beweglichkeit mehr auf (Verstegen et al., 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus beruht wahrscheinlich auf einer Erneuerung der Energieversorgung durch frische Glukose, neuem Eigelb als Phospholipid-Lieferant und dem Entfernen schädlicher Metabolite, die z.B. den pH-Wert verändern können. Inwieweit sich die verlängerte Konservierung auch auf die Fertilität des Ejakulates übertragen lässt, konnte nicht geklärt werden (Verstegen et al., 2005).

Eine Korrelation verschiedener Vitalparameter mit der Befruchtungsfähigkeit der Spermien ist nur bedingt gegeben (Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Eine indirekte und damit zeit- und kostengünstige Methode, um die Fertilisationskapazität der Spermien *in vitro* zu testen, ist der Zona pellucida (ZP) Bindungstest. Er untersucht die Fähigkeit der Spermien mit einer Oozyte zu binden (Holst et al., 2000; Ström Holst et al., 2000; Hermansson et al., 2006; De Los Reyes et al., 2009). Jedoch ist die Variabilität der Ergebnisse innerhalb eines Versuches sehr hoch, was die Beurteilbarkeit stark erschwert (Ström Holst et al., 2000). Zudem ist auch der Reifegrad der Oozyten ein wichtiger Einflussfaktor (Waberski und Petrunkina, 2007).

In Versuchen zeichnete sich eine fallende Tendenz der ZP Bindungsfähigkeit sowohl durch die Konservierung selbst als auch durch die Dauer der Lagerung ab. So binden bei Frischsperma im Vergleich mehr Spermien an die Oozyten als bei flüssigkonserviertem Sperma (Hermansson et al., 2006; De Los Reyes et al., 2009). Eine zeitliche Analyse der Coinkubation von Spermien und Oocyten zeigte allerdings, dass innerhalb der ersten Stunde mehr flüssigkonservierte Spermien in die Oozyten durchdringen als frische Spermien (De Los Reyes et al., 2009). Durch das Herabkühlen können Kapazitationsvorgänge ausgelöst werden. Diese sind aber von den Physiologischen auf molekularer und struktureller Ebene zu unterscheiden (Watson, 1995; Busch und Waberski, 2007) und beruhen wahrscheinlich auf einer temperaturabhängigen, enzymalen Regulation der Kalziumkonzentration in den Spermien (Burgess et al., 2000; Watson, 2000). Eine Verlängerung der Aufbewahrung von ein auf zwei (Hermansson et al., 2006) bzw. vier Tage (Ström Holst et al., 2000) hatte ebenfalls eine Reduktion der ZP-Bindungsfähigkeit zur Folge.

Vor dem Versamen wird flüssigkonserviertes Sperma über 10 – 30 Minuten auf 37 °C erwärmt (Minitüb GmbH; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; De Los Reyes et al., 2009; Kasimanickam et al., 2012). Hier kann den Spermien zusätzlich noch ein auf TRIS-Basis hergestellter „Enhancer“ zugegeben werden (z.B. Minitüb „CaniPlus Enhance“, Ref Nr. 13700/0030), der die Motilität und Viabilität der Spermien nach dem Erwärmen nochmals verbessern soll. Das Prinzip hierbei ist wahrscheinlich dem der Versuche von Verstegen et al., 2005 ähnlich (Kmenta et al., 2011).

Um den Besamungserfolg zu maximieren und die Wurfgröße eventuell noch zu steigern, kann eine Mehrfachbesamung an aufeinander folgenden Tagen und /oder eine intrauterine anstatt einer tiefen vaginalen Samendeponierung durchgeführt werden (Linde Forsberg et al., 1999; Ponglowhapan et al., 2004).

Neben der unmittelbaren Verwendung und dem Versamen, besteht nach 1 – 2 Tagen noch die Möglichkeit, das flüssigkonservierte Sperma für die Herstellung von Tiefgefriersperma zu verwenden. So können Ejakulate z.B. in für Tiefgefriersperma spezialisierten Samenbanken geschickt und dort entsprechend verarbeitet werden (Hermanson und Linde Forsberg, 2006).

### **2.3.2 Vor- und Nachteile der Flüssigkonservierung**

Wenn mehrere Verfahren für eine bestimmte Problematik zur Verfügung stehen, so sind diese oft durch Vor- und Nachteile gekennzeichnet. In Hinblick auf die Flüssigkonservierung ist insbesondere die stark eingeschränkte Lagerungsfähigkeit der Samenportionen (England und Ponzio, 1996; Ponglowhapan et al., 2004; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007) als größter Kritikpunkt zu nennen. Deshalb ist bei Verwendung dieser Methode ein genaues Planungs- und Zeitmanagement notwendig, um den idealen Besamungszeitpunkt mit Rüdenbesitzer, Hündinnenbesitzer, Tierärzten für Samenentnahme und Besamung als auch den Transportzeiten zu koordinieren (Linde Forsberg, 1991). Im Gegenzug sind die erreichbaren Resultate als gut bis sehr gut einzuschätzen und bis zu einer gewissen Lagerungsdauer von 4,9 Tagen (England und Ponzio, 1996), denen des Tiefgefrierspermas überlegen. Das gilt sowohl für die Trächtigkeitsrate als auch für die Wurfgröße (Rota et al., 1995; Rota et al., 1997; Pinto et al., 1999; Ponglowhapan et al., 2004; Linde Forsberg, 2010). Die Gründe hierfür können eine bessere Beweglichkeit der Spermien, die üblich höhere Besamungsdosis, eine längere Überlebensfähigkeit der

versamten Spermien und eine bessere Penetration durch die Zona pellucida der Oozyte sein (England und Ponzio, 1996; Pesch et al., 2007; De Los Reyes et al., 2009; Linde Forsberg, 2010). Auch in der Durchführung bietet das Verfahren der Flüssigkonservierung klare Vorteile. Um gute Erfolge zu erzielen, reicht es oft, die Spermien tief intravaginal zu deponieren, was die schwierigere endoskopische transzervikale oder gar chirurgische intrauterine Besamung erspart (Ponglowhapan et al., 2004; Peña et al., 2006; Kasimanickam et al., 2012). Durch die Verwendung von günstigen Transportmedien wie Styroporkisten, die zudem ohne flüssigen Stickstoff auskommen, sind Einschränkungen des Versands durch Restriktionen oder das Zurücksenden des Containers, welches oftmals den eigentlichen Preis der Besamung übersteigt, nicht notwendig (Linde Forsberg; Peña et al., 2006). Somit stellt die Flüssigkonservierung eine einfache, praktikable und preiswerte Alternative für den kurzfristigen Versand von Rüdensamen dar (Linde Forsberg; Ponglowhapan et al., 2004; Lopes et al., 2009; Michael et al., 2009).

## **2.4 Zusammensetzung des Verdünners**

Die Zugabe eines Verdünners ist für die Haltbarmachung von Spermien über einen längeren Zeitraum essentiell (Hoffmann, 2003). Man unterscheidet Verdünner für die Herstellung von Tiefgefriersperma und von flüssigkonserviertem Sperma (Linde Forsberg, 1995; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007; Linde Forsberg, 2010). Deren Zusammensetzung ist vom Prinzip sehr ähnlich. Der Unterschied besteht im Zusatz eines Kryoprotektivum: meist Glycerin (Thirumala et al., 2003; Okano et al., 2004; Peña et al., 2006) und zumeist einer SDS (Sodium Duodecyl Sulfat) -haltigen Paste, welche beim Tiefgefrieren zum Einsatz kommen (Rota et al., 1997; Alhaider und Watson, 2009; Farstad, 2009). In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Verdünner getestet, wie z.B. Tomatensaft, Kokosnussmilch, Magermilch oder homogenisierte und pasteurisierte 12 % fetthaltige Milch/Sahne (Linde Forsberg, 1991; Ponglowhapan et al., 2004). Der derzeit meistgenutzte Verdünner beinhaltet einen TRIS-Zitrat-Puffer mit Glukose oder Fruktose und Eigelb (Peña et al., 2006).

Für eine erfolgreiche Konservierung muss ein Verdünner verschiedene Voraussetzungen erfüllen und Aufgaben übernehmen. Neben der Volumenvergrößerung reguliert er durch die spezielle Zusammensetzung den pH-Wert, den osmotischen Druck, die Nähr-

stoffversorgung, das bakterielle Wachstum und schützt sowohl die Spermienmembran als auch das Akrosom vor Veränderungen, wie z.B. dem Kältschock (Busch und Bader, 2001; Hoffmann, 2003; Busch und Waberski, 2007).

Eine Hauptaufgabe des Verdünners ist die Pufferfunktion. Diese ist notwendig, um eine Schädigung der Samenzellen durch eine Akkumulation von Wasserstoffionen zu vermeiden. Diese entstehen zwangsläufig durch den zelleigenen Metabolismus (Carr, 1985). Gewünscht ist eine ausreichende Pufferkapazität bei einem pH von 6,0 - 7,0. In alkalischem Medium ( $\text{pH} > 7$ ) steigt der Stoffwechsel der Samenzellen, wodurch die Energiereserven und die Kurzzeitkonservierung beeinträchtigt werden. In einem sauren Milieu ( $\text{pH} < 5,2$ ) ist mit Motilitätseinbußen zu rechnen (Hoffmann, 2003).

Als Puffersubstanzen können verschiedene organische und anorganische Substanzen eingesetzt werden. Ein häufig verwendetes Medium ist TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), obgleich die Pufferkapazität bei pH 7 nur gering ist. Die pH-Wert-Einstellung erfolgt durch den Zusatz von z.B. Zitrat, Salzsäure oder TES (Busch und Bader, 2001; Peña et al., 2006). Neben der Verwendung von TRIS besteht alternativ die Möglichkeit, andere organische Puffer wie TES, HEPES, MES oder Tricine einzusetzen (Busch und Bader, 2001; Busch und Waberski, 2007).

Die Einstellung der Osmolarität erfolgt ebenfalls durch die Verwendung solcher Zwitterionen-Puffer. Zudem kommen noch Aminosäuren,  $\alpha$ -Ketosäuren, diverse Salze und verschiedene Zuckerzusätze, wie Glukose, Fruktose, Mannose und Arabinose in Frage (Busch und Bader, 2001; Busch und Waberski, 2007).

Neben dieser osmoregulatorischen Aufgabe dienen Zucker vor allem auch als Energielieferanten für die Spermien (White et al., 1954; Watson, 1979; Mann und Lutwak-Mann, 1981). Eine gewisse kryoprotektive Wirkung in Form eines erhöhten Intaktbleibens des Akrosoms und die bessere Lebend/Tot Bilanz, konnten, zumindest bei der Kryokonservierung, für bestimmte Kohlenhydrate nachgewiesen werden (Yildiz et al., 2000; Busch und Bader, 2001; Busch und Waberski, 2007). Generell ist eine Lagerung der Spermien ohne Zusatz von Sacchariden der Lagerung mit Sacchariden in Anbetracht der Motilität unterlegen (Yildiz et al., 2000; Rigau et al., 2001; Ponglowhapan et al., 2004). Auch wenn weder Glukose noch Fruktose physiologischerweise im Seminalplasma von Rüdnen vorhanden sind, so sind die Samenzellen, genauso wie die anderer Säugetiere, dazu befähigt, diese Zucker zu metabolisieren (Nagai et al., 1982; Ponglowhapan et al., 2004). Der

Stoffwechselweg, mit dem Glukose umgewandelt wird, unterscheidet sich jedoch von dem der Fruktose (Rigau et al., 2001; Ponglowhapan et al., 2004). Diese unterschiedliche Bereitstellung von Energie wirkt sich auch auf verschiedene Motilitätsparameter aus. Durch die Zugabe von Fruktose werden schnellere, lineare Spermienbewegungen gefördert. Die von Spermien bevorzugt verstoffwechselte Glukose begünstigt hingegen eine oszillatorische Bewegung (Ponglowhapan et al., 2004) und konnte in einer Untersuchung die Motilität der Samenzellen länger aufrechterhalten als ein vergleichbarer, fruktosehaltiger Verdünner (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b). Die verwendeten Konzentrationen bei der Flüssigkonservierung schwanken zwischen 5 – 120 mM (Ponglowhapan et al., 2004). Das Optimum lag hierbei bei 70 mM Glukose oder Fruktose. Niedrigere Konzentrationen waren dieser unterlegen. In der Untersuchung konnte eine Gesamtmotilität > 70 % bis zu 8 Tagen beobachtet werden. Zudem förderte diese Konzentration die Spermengeschwindigkeit (VAP, VSL VCL) (Ponglowhapan et al., 2004).

Wie bei verschiedenen anderen Tierarten nachgewiesen, (Watson und Martin, 1975, Shannon und Curson, 1983a, 1983b) zeigte die Zugabe von Eigelb zu den Verdünnern auch bei der Konservierung von Rüdensperma eine protektive Wirkung auf die Samenzellen (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Peña et al., 2006; Witte et al., 2009). Durch den Zusatz von Eigelb konnte in einer Studie (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b), neben einer signifikanten Verbesserung verschiedener Bewegungsparameter, ein deutlicher Schutz vor spontaner Akrosomreaktion (AR) gegenüber homologer Verdünner ohne Eigelb nachgewiesen werden. Der Mechanismus hierfür ist jedoch noch nicht vollends geklärt. Diskutiert wird eine Membranstabilisierung durch Aufrechterhaltung des kolloidalen Drucks des äußeren Medium, dem Schutz vor positiv geladenen Peptiden und dem engen Verbund von Eigelb-Phospholipiden mit den Gameten (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Bencharif et al., 2008). Ein protektiver Effekt vor Schwankungen des pH-Wertes, des osmotischen Drucks und der Ansammlung von schädlichen Substanzen, wie z.B. reaktiven Sauerstoffspezies, wird ebenfalls postuliert. Die Aufnahme von Substanzen in die Spermienmembran wird jedoch nicht vermutet (Manjunath, 2002; Silva et al., 2002; Aboagla und Terada, 2004; Bergeron et al., 2004; Kmenta et al., 2011).

Heutzutage ist Eidotter ein wesentlicher Bestandteil vieler Verdüner. Die empfohlene und meist verwendete Konzentration von Eigelb zu Verdünner beträgt dabei 20 % (Lin-

de Forsberg, 1995; Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Silva et al., 2002; Peña et al., 2006; Bencharif et al., 2013).

Trotz der genannten Vorteile birgt die Verwendung von Eigelb auch einige Nachteile und Risiken. Als tierisches Produkt unterliegt es natürlichen Schwankungen. Dabei wird die Zusammensetzung auch durch das Hühnerfutter beeinflusst, was sich wiederum negativ auf die Spermien auswirken kann. Die Eigenschaften als ausgezeichnetes mikrobielles Nährmedium erhöhen das Risiko auf eine uterine Infektion. Zudem können insbesondere die computergestützte Analyse und biochemische Untersuchungen durch Eipartikel erschwert oder verfälscht werden (Bousseau et al., 1998; Wall und Foote, 1999; Bencharif et al., 2008; Kmenta et al., 2011; Bencharif et al., 2013).

Einen Lösungsansatz stellt die Verwendung von LDL (Low Density Lipoprotein; Lipoprotein niedriger Dichte) dar, welches ohnehin einen großen Teil der Dotterbestandteile niedriger Dichte bildet (Bencharif et al., 2008; Witte et al., 2009). Verschiedene Autoren führen die Kälteschockresistenz und die verbesserte Motilität nach der Zugabe von Eigelb hauptsächlich auf diesen Bestandteil zurück (Pace und Graham, 1974; Moussa et al., 2002). Es ist denkbar, dass die LDL-Fraktion mit einigen Hauptproteinen des Seminalplasmas interagiert, den Efflux von Cholesterol und Phospholipiden vermindert und so eine verfrühte Kapazitation und AR verhindert (Manjunath, 2002; Bergeron et al., 2004). Im direkten Vergleich zeigten einige Studien sogar, dass der Gebrauch eines 6 % LDL-Mediums einen besseren Schutz der Rüdenspermien und bessere Motilitätsparameter bietet, als ein Medium welches ausschließlich Eigelb beinhaltet (Bencharif et al., 2008; Bencharif et al., 2013).

Alternativ zu Eidotter und LDL konnte der Gebrauch von Lecithin aus Sojabohnen gute Konservierungseigenschaften zeigen (Amirat et al., 2005; Aurich et al., 2007; Muiño et al., 2007; Forouzanfar et al., 2010), was auch für Hundesperma bestätigt wurde (Beccaglia et al., 2009b; Beccaglia et al., 2009a; Kmenta et al., 2011). Beccaglia et al. benutzen dabei einen TRIS Verdünner mit 0,04 % Lecithin und Katalase als Antioxidanz (Beccaglia et al., 2009a). Kmenta et al. bestätigte diese Ergebnisse, verwendete aber einen 0,8 % Lecithin Verdünner (Minitüb GmbH, Tiefenbach), um die üblichen 20 % Eigelb adäquat zu ersetzen (Kmenta et al., 2011; Palacios und Wang, 2005). In Hinblick auf einige Konservierungskriterien stellte sich der Lecithin-Katalase-haltige Verdünner während der achttägigen Untersuchung dem konventionellen, eidotterhaltigen Verdünner sogar als überlegen dar. Eine weitere Studie erbrachte ähnliche Resultate, indem sie ei-

nen Verdünner mit Eigelb einem Verdünner mit 0,04 % und einem mit 0,4 % Soja Lecithin gegenüber stellte. Der 0,4 % lecithinhaltige Verdünner zeigte bei der 10-tägigen Flüssigkonservierung die besten Ergebnisse (Kasimanickam et al., 2012).

Milch übt ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Spermienmembran aus (Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995; Bergeron und Manjunath, 2006; Bergeron et al., 2007). Durch die Zugabe von Milch konnte, ähnlich wie durch LDL, die Bindung von Seminalplasma-proteinen an die Samenzellen und ein Lipidverlust vermindert werden (Bergeron und Manjunath, 2006; Bergeron et al., 2007). Die tragende Rolle spielen dabei vermutlich Caseine, weshalb auch Magermilch geeignet erscheint. Einen zusätzlichen Schutz scheint der Milchzucker (Laktose) zu bieten. Bei der Kryokonservierung von Ziegen und Mäuseejakulat ist Magermilch derzeit sogar vorherrschend (Nakagata, 2000; Dorado et al., 2007). Der Einsatz in der Hundezucht wird noch kontrovers diskutiert (Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995; Abe et al., 2008), auch wenn neuere Untersuchungen zur Kryokonservierung mit Magermilch und Trehalose oder Raffinose vielversprechende Ergebnisse liefern (Asano et al., 2010).

Da Milch ebenfalls ein Naturprodukt ist, ergibt sich aber auch hier die Gefahr einer Kontamination oder schwankender Zusammensetzung der Inhaltsstoffe (Bergeron und Manjunath, 2006).

Eine weitere Komponente des Verdünners stellen Antioxidantien dar. Die Plasmamembran von Samenzellen hat einen hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Damit ist sie sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress und der Lipidperoxidation (Aitken, 1989; Beccaglia et al., 2009a; Michael et al., 2009, 2010). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen dabei eine wichtige Rolle (Griveau und Le Lannou, 1997; Calamera et al., 2001; Medeiros et al., 2002; Neild et al., 2003). ROS werden zum einen von den Samenzellen selbst gebildet, entstehen aber auch durch die Infiltration von Leukozyten (Griveau und Le Lannou, 1997). Der Prozess der Kryokonservierung verstärkt die ROS-Bildung noch weiter (Watson, 2000). Die Schäden beeinflussen die Motilität der Spermien, Proteine sowie Nukleinsäuren werden verändert, was wiederum die Apoptose der Zellen zur Folge haben kann, die enzymatische Abwehr wird gehemmt und Membranlipide werden oxidiert (Aitken, 1989; Alvarez und Storey, 1992; Aitken, 1998; Moustafa, 2004; Agarwal et al., 2006). Ist die Plasmamembran einmal zerstört, sind die

Spermien nicht in der Lage, diese neu zu synthetisieren (Aitken, 1989; Henkel, 2005). Diese Schäden können durch eine exogene Zufuhr von oxidativen Verbindungen reproduziert werden (Hammerstedt, 1993).

Zwar spielen oxidative Reaktionen auch bei der physiologischen Zellfunktion eine Rolle (De Lamirande et al, 1997; Bennetts und Aitken, 2005) und geringe Mengen ROS agieren als Signalmediatoren (Griveau und Le Lannou, 1997; Saleh und Agarwal, 2002; Aitken et al., 2004; Agarwal et al., 2006), in höherer Konzentration sind sie jedoch toxisch für die Spermien (Michael et al., 2009).

Als Schutzmechanismus gegen ROS sind im Ejakulat drei Enzymsysteme aktiv: Superoxiddismutase, Katalase und das Glutathionperoxidase/Reduktase- System (Alvarez et al., 1987; Jeulin et al., 1989; Alvarez und Storey, 1992; Griveau et al., 1995; Farstad, 2009). Sie werden bei den verschiedenen Spezies in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet und mit dem Sperma abgegeben (Gavella et al., 1996; Chen et al., 2002). Die genaue Situation beim Hund ist noch nicht geklärt (Hatamoto et al., 2006; Kawakami et al., 2007; Beccaglia et al., 2009a). Durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung werden die Enzyme größtenteils entfernt und der oxidative Stress sogar noch verstärkt (Beccaglia et al., 2009a; Farstad, 2009). Befindet sich Eigelb im Verdünner mindern darin enthaltene Antioxidantien wie Vitamin C, E und Phosvitin eventuelle Schäden (Farstad, 2009). Alternativ kann durch die Zugabe antioxidativer Stoffe die Qualität von Spermaportion noch weiter verbessert werden (Hammerstedt, 1993; Maxwell und Stojanov, 1996; Medeiros et al., 2002; Hatamoto et al., 2006; Michael et al., 2007; Michael et al., 2009). Die beste antioxidative Wirkung korreliert dabei mit dem niedrigsten tROS (Gesamtzahl reaktiver Sauerstoffspezies) Wert. Die Auswahl an möglichen Agentien ist groß (Watson, 2000). Die Dosierungen und Kombination verschiedener Stoffe werden aber noch kontrovers diskutiert (Beccaglia et al., 2009a).

Bei einem Vergleich von flüssigkonserviertem Sperma ohne und mit Antioxidantien (Vitamin C, N-Acetyl-L-Cysteine, Taurin, Katalase, Vitamin E und B16) zeigte die Gruppe ohne Zusatz einen höheren Gehalt an tROS und gleichzeitig die niedrigsten Werte der Spermienqualitätsparameter (Michael et al., 2007; Michael et al., 2009). Von den bisher getesteten Stoffen wiesen Vitamin E und B 16 hinsichtlich der Spermaqualität die besten Ergebnisse auf. Vitamin B 16 konnte dabei die Konzentration von tROS signifikant reduzieren (Michael et al., 2009). Zu klären bleibt, ob den Spermien die Antioxidantiensupp-

mentation im weiblichen Reproduktionstrakt zugutekommt (Farstad, 2009; Michael et al., 2009).

## 2.5 Bedeutung von Bakterien in nativem und konserviertem Sperma

Die bakteriologische Untersuchung des Ejakulates gehört bei der Samenverarbeitung in der Hundezucht noch nicht zur Routinekontrolle. Jedoch wird der Drang hierhin immer größer, um sicher zu stellen, dass keine Krankheiten mit dem Sperma übertragen werden (Ling et al., 1983; Johnston, 1991; Pesch et al., 2007; Goericke-Pesch et al., 2012). Die Samengewinnung mittels manueller Stimulation ist keine sterile Technik (Kustritz et al., 2005). Eine gewisse bakterielle Kontamination bis zu  $10^4$  oder  $10^5$  KBE/ml (einzelne Kolonien: bis 500 KBE/ml, niedriger Bewuchs: bis  $5 \times 10^3$  KBE/ml mäßiger Bewuchs: bis  $2 \times 10^4$  KBE/ml, hoher Bewuchs  $2 \times 10^4$  KBE/ml (Pesch et al., 2007; Goericke-Pesch et al., 2012) wird als physiologisch erachtet und auch bei gesunden Hunden ohne Beeinflussung der Fertilität des Rüden oder der Hündin nachgewiesen (Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Kustritz et al., 2005; Schaefer-Somi et al., 2009). So konnte ein mikrobielles Wachstum bei 30 % bis 80 % der klinisch unauffälligen Hunde beobachtet werden (Schaefer-Somi et al., 2009). Im Hinblick auf die unterschiedlichen Fraktionen enthielt das Vorsekret die höchste Keimbelastung, während die 3. Fraktion oft keimfrei war (Goericke-Pesch et al., 2011). Um die Kontamination so gering wie möglich zu halten, sollten einige Hygienefaktoren beachtet werden: Der Kontakt mit Präputialflüssigkeit, fraktioniertes Auffangen, keine oder dreckige Handschuhe, langes Präputialhaar, alte Tiere und längere Ejakulationsdauer können den Grad der Kontamination steigern (Becher et al., 2013; Goldberg et al., 2013). Häufig isolierte Keime sind z.B. *E. coli*, *Staph. aureus*, *Klebsiella* spp., *Mycoplasma canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Strep. spp.*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium* spp. und *Moraxella* spp. (Ling und Ruby, 1978; Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et al., 2006). Sie besiedeln zumeist als Kommensalen Penis, Präputium und distale Urethra (Schaefer-Somi et al., 2009). Auch die Anzahl bakteriologisch positiver Ejakulate und die identifizierten Keimspezies sind zwischen gesunden Hunden mit Normospermie und Hunden mit klinisch andrologischer Symptomatik, Teratozoospermie und Azoospermie gleich groß.

Bisher konnte lediglich für *Brucella canis* ein direkter, pathologischer Einfluss nachgewiesen werden (Wanke, 2004; Hollett, 2006). Potentiell pathogene Bakterien, wie  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken und *E. coli* var. *haem.* sind zwar an verschiedenen urogenitalen Erkrankungen wie Pyometra oder Prostatitis beteiligt (Johnston et al., 2000; Verstegen et al., 2008), ein Einfluss auf die Samenqualität konnte beim Hund jedoch nicht sicher herausgestellt werden (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Goerick-Pesch et al., 2011). Es zeigte sich lediglich die Tendenz zu einem vermehrten Gesamtkeimwachstum bei Rüden mit klinisch-andrologischer Symptomatik und verändertem Ejakulat (Pesch et al., 2006). Dabei war in Anwesenheit von  $\beta$ - und  $\alpha$ -hämolyisierenden Streptokokken eine relativ höhere Anzahl an Hunden mit abweichenden Spermparametern bis hin zu Präputialkatarrh zu verzeichnen. Rüden mit *E. coli* var. *haem.* wiesen signifikant häufiger Präputialkatarrh auf (Pesch et al., 2006). Dies kann auf eine Infektion hinweisen (Johnston, 1991) und sollte abgeklärt und gegebenenfalls behandelt werden (Smith, 2008; Schaefer-Somi et al., 2009). Die Relevanz von Mykoplasmen und Ureaplasmen lässt sich aufgrund schwieriger quantitativer Analyse und dem Vorkommen bei sowohl gesunden Hunden als auch bei Hunden mit Erkrankungen des Reproduktionstrakts nur schwer abschätzen (Doig et al., 1981; Kustritz et al., 2005).

Die bei der Konservierung von Samen genutzten Verdünner und Eigelb sind ein gutes Anreicherungsmedium für Bakterien. Nach der Adaptation an die neuen Umweltbedingungen erfolgt eine Phase des exponentiellen bakteriellen Wachstums. Nach dieser Vermehrung folgt eine stationäre oder Plateau-Phase. Werden nun keine Änderungen vorgenommen, beginnt die Absterbephase (Althouse und Lu, 2005).

Auch die Lagertemperatur beeinflusst das Wachstum der Bakterien. Bei niedriger Temperatur ändern sich die Plasmamembran-Fluidität und der Metabolismus der Zellen wird herunter gefahren. Bakterien besitzen jedoch die Fähigkeit, sich an die geänderten Umweltbedingungen zu adaptieren und so weiter zu gedeihen (Althouse und Lu, 2005). Die resultierende, gesteigerte Vermehrung könnte einen negativen Effekt auf das Sperma ausüben (Appell und Evans, 1978; Rideout et al., 1982). Viele Bakterien sind zur Fermentation von Glukose befähigt und stehen so in Nahrungskonkurrenz mit den Samenzellen, verändern durch die Endprodukte den pH-Wert und die Osmolarität und sind zum Teil für eine Säure- und Gasproduktion verantwortlich (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Berktaş et al., 2008).

Bei humanen Spermatozoa scheinen morphologische Veränderungen spezifisch für pathogene bakterielle Spezies und Stämme zu sein (Huwe et al., 1998). Darunter sind unter anderem: *E. coli*, Mycoplasmen, *Ureaplasma urealyticum*, *Staph. aureus* und Chlamydien (Erbengi, 1993; Wolff et al., 1993; Nunez-Calonge et al., 1998; Sanocka-Maciejewska et al., 2005). Diemer et al. (1996 / 2000) zeigte eine signifikante Veränderung der Motilität innerhalb von 4 - 6 h nach Inkubation mit *E. coli* (Diemer et al., 1996; Diemer et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen wurden zuvor bereits auch von einigen anderen Autoren beschrieben (Del Porto, George B. et al., 1975; Dahlberg, 1976; Wolff et al., 1993). Als entscheidend für den Grad der Verschlechterung der Spermaqualität wird die *E. coli*-Konzentration angesehen. Als Grenzwert wird ein Spermien/Bakterienverhältnis von 1:1 angenommen (Diemer et al., 1996). Eine Übertragung und Persistenz im weiblichen Geschlechtstrakt konnte nicht ausgeschlossen werden (Stone et al., 1986; Diemer et al., 1996). Der zugrundeliegende Pathomechanismus, der für den Qualitätsverlust verantwortlich zu sein scheint, basiert auf mehreren, zum Teil tiefgreifenden, ultrastrukturellen Schäden der Spermien durch eine Anlagerung der Bakterien über mannosebindende Strukturen (Wolff et al., 1993; Diemer et al., 2000). Toxische Agentien, wie die von bestimmten *E. coli* gebildeten Hämolytine oder Shiga-like Toxine und Lipopolysaccharide, werden als ursächlich mitdiskutiert (Diemer et al., 2000; Schulz et al., 2010). Betroffen sind oberflächliche Strukturen der Spermien, wie die Plasmamembran vom Mittelstück und Hals, als auch die äußere Akrosomenmembran (Diemer et al., 2000). Die Zugabe von Chloramphenicol verhinderte das mikrobielle Wachstum und die damit verbundene Immobilisation der Samenzellen (Diemer et al., 1996). Eine antimikrobielle Therapie scheint damit sowohl für symptomatische als auch für stille Infektionen angezeigt zu sein (Diemer et al., 2000).

Auch Berktaş et al. (2008) konnte einen nachteiligen Einfluss verschiedener Keime (*Enterobacter aerogenes*, *Staph. epidermidis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und *E. coli*) auf die Spermaqualität zeigen. Die Effekte waren stark Konzentrationsabhängig, erst ab bestimmten Schwellenwerten sichtbar und nicht auf einzelne Mikroorganismen zurückzuführen. Das deutete damit eher auf eine Milieuänderung durch die Bakterien hin, als auf eine direkte Interaktion bestimmter Keime (Berktaş et al., 2008).

Versuche anderer Autoren führen die Schädigung der Spermatozoa auf eine Interaktion mit verschiedenen Erregern (*Bacteroides ureolyticus*, *Staph. haemolyticus* und *E. coli*) zurück. Der durch die Keime und deren Toxine ausgelöste oxidative Stress verursacht peroxidativen Schaden an der Plasmamembran und der DNA. Anschließend kommt es zu apoptoseartigen Ereignissen (Fraczek et al., 2007; Fraczek et al., 2012).

Auch beim Eber kann ein großes Spektrum an unterschiedlichen Keimen bis zu einer Konzentration von  $10^9$  KBE/ml nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Faktor ist die Konzentration, da die meisten Keime als nicht primär pathogen gelten. Damit im Zusammenhang stehen auch die Zeit und die Umweltbedingungen, denen das Ejakulat und damit auch die Erreger ausgesetzt sind (Althouse und Lu, 2005). Für einige Erreger wird zudem ein direkter, spermizider Effekt vermutet (Althouse et al., 2000). Die Rolle von *E. coli* ist vergleichbar mit der Situation beim Mann. Allerdings wird eine Beeinflussung der Spermien erst nach 36 - 48 h deutlich (Althouse et al., 2000).

Beim Schafbock wurde die Situation von Yaniz et al. (2010) überprüft. Die Experimente ergaben einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von verminderter Spermaqualität und dem Auftreten von Enterobakteriazeen (Yániz et al., 2010). Die höchste Einflussnahme zeigte *E. coli*, gefolgt von *Enterobacter cloacae* und weniger stark ausgeprägt *Proteus mirabilis*. Das verwendete Spermien/Bakterien Verhältnis betrug anfangs 8:1, die Aufbewahrungstemperatur lag bei 15 °C. Eine Änderung des Verhältnisses zugunsten der Bakterien ist deshalb anzunehmen. Die Abnahme der progressiven Beweglichkeit erfolgte unmittelbar. Andere Parameter zeigten erst bei der nächsten Analyse nach 24 h eine Varianz. Gram-positive Keime, wie *Staph. epidermidis* und *Staph. aureus* verursachten keine eindeutige Abnahme der Samenqualität (Yániz et al., 2010).

Aurich und Spergser (2007) untersuchten den Einfluss verschiedener Bakterien auf die Vitalparameter von Hengstsperma. Die Ergebnisse weisen auf schädlichen Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* und *Strep. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* hin. Die Zugabe von *Staph. aureus*, *Strep. equi* subsp. *equi* und *Strep. equi* subsp. *zooepidemicus* zeigte keinen Effekt. Andere Keime wurden nicht untersucht (Aurich und Spergser, 2007).

Die Bedeutung von Entzündungszellen ist noch nicht abschließend geklärt. Ein inflammatorischer Prozess des Geschlechtstrakts kann die Anzahl an morphologisch unverän-

derden Spermien und deren Motilität senken (Johnston, 1991). Dabei sprechen Stockner und Bardwick (1991) ab einer Konzentration von mehr als 2000 weißen Blutzellen/ $\mu\text{l}$  im Ejakulat von einer Infektion (Stockner und Bardwick, 1991). Und auch wenn die Anwesenheit von inflammatorischen Zellen häufig mit einem klinisch bedeutsamen bakteriellen Bewuchs assoziiert ist, konnte bei vielen Hunden (44 %) trotz hohem bakteriellen Wachstum kein entzündliches Zellbild gefunden werden (Kustritz et al., 2005).

Eine Schlussfolgerung auf die Fertilität des Rüden ist durch den qualitativen Nachweis verschiedener Keime alleine anscheinend nicht möglich. Eine starke bakterielle Belastung des Ejakulates kann jedoch die Spermaqualität mindern (Johnston, 1991; Kustritz et al., 2005; Goericke-Pesch et al., 2011). Liegt eine urogenitale Infektion vor, kann diese eine Infertilität zur Folge haben (L'Abée-Lund et al., 2003). Dafür können die Bakterien selbst verantwortlich sein. Aber auch eine immunologische Antwort oder eine verminderte antioxidative Kapazität kommen hierfür in Frage (Sanocka-Maciejewska et al., 2005). Ein zeitlicher Einfluss wird ebenso mitdiskutiert (Schaefer-Somi et al., 2009).

Obgleich weder eine Infektion noch Infertilität der Hündin durch kontaminiertes Sperma beschrieben wurde (Bjurström und Linde Forsberg, 1992), sollte vor der Verpaarung eine Behandlung des Rüden erfolgen. Insbesondere im Fall einer vorangegangenen Infertilität, eines Aborts oder urogenitaler Infektionen nach einer Paarung mit demselben Rüden (Schaefer-Somi et al., 2009).

## **2.6 Zusatz von Antibiotika bei der Samenkonservierung**

Verdünner wurden speziell zur Optimierung der Umwelteinflüsse und zur Konservierung von Samenzellen entworfen. Davon profitieren jedoch auch bakterielle Kontaminanten (Althouse und Lu, 2005). Der Einfluss von Bakterien auf die Spermien ist allerdings noch nicht vollends geklärt (siehe oben). Deshalb geht allgemein der Rat zu einem Antibiotikumzusatz im Verdünner, insbesondere bei der Flüssigkonservierung. (Linde Forsberg). Bei der Tiefgefrierkonservierung ist hingegen mit keinem weiteren Keimwachstum zu rechnen. Hier kann wahrscheinlich auf einen antimikrobiellen Zusatz verzichtet werden (Hoffmann, 2003).

Antibiotika greifen in verschiedene biochemische Reaktionen ein und blockieren damit den Lebenszyklus der Bakterien. Dafür muss jedoch eine ausreichend große Menge aktiven Substrats des Antibiotikums vorhanden sein, welches in die Bakterien eindringen und dort lange genug wirken kann. Ist das nicht der Fall, können neben der unvollständigen Eliminierung der Keime, Resistenzen entstehen. Um eine optimale Wirkung zu erzielen, sollten die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Antibiotikums beachtet werden (Althouse und Lu, 2005). Da Antibiotika im Allgemeinen bei einer Temperatur von über 15 °C aktiv sind, ist ihre Wirkung in flüssigkonservierten Samen auf die Zeitdauer des Herabkühlens beschränkt. Je nach Kühlrate sind das 3 bis 6 h. Danach ist mit keiner weiteren Wirksamkeit zu rechnen (Kayser et al., 1992; Aurich und Spergser, 2007). Desweiteren spielt der pH-Wert des Verdünners eine große Rolle. Gentamicin-Sulfat liegt z.B. bei einem pH von 6.8 nur zu 3,9 % ionisiert und damit aktiv vor (Althouse und Lu, 2005). Um eine entsprechende Wirksamkeit zu erzielen, muss eine höhere Antibiotikakonzentration verwendet werden. Verwendet man ein  $\beta$ -Lactam Antibiotikum, kann dieses durch  $\beta$ -Lactamasen von resistenten Bakterien in kurzer Zeit eliminiert werden und somit auch sensible Organismen nicht weiter hemmen (Korpimäki et al., 2003). Auch die Kombination bestimmter  $\beta$ -Lactam-Antibiotika mit Aminoglykosiden kann zur gegenseitigen Inaktivierung führen (Farchione, 1981). Selbst durch die Aufbewahrung in Kunststoffgefäßen scheint Gentamicin an Potenz zu verlieren (Mitrzyk et al., 1996).

In den meisten kommerziellen und nicht kommerziellen Verdünnern kommen unterschiedlichste Antibiotika zum Einsatz (Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Witte et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). Über deren Einfluss auf die caninen Spermien ist allerdings wenig bekannt (Wales und White, 1962; Becher et al., 2013). Die Studie von Wales et al. (1962) untersuchte verschiedene Konzentrationen von Penicillin, Streptomycin, Sulphanilamid, Chloromycetin, Tetracyclinen und Sulphamezathin. Während Penicillin, Streptomycin und Sulphonamid gut von den Hunde-Spermatozoen vertragen wurden, stellten sich Chloromycetin und einige Tetracyclin-Derivate hingegen als spermizid heraus. Die besten Resultate in Hinblick auf die Überlebensfähigkeit der Spermien erbrachten Sulphamezathine und Tetracyclin.

Eine ähnliche Problematik zeichnet sich in der Pferdezucht ab. Die Präputial- und Penis-schleimhaut beherbergt verschiedenste Bakterien. Dieses normale Mikrobiom verursacht bei gesunden Stuten gewöhnlich keine Probleme. Eine Störung des bakteriellen Gleichgewichts kann jedoch zu einer Überwucherung mit z.B. *Klebsiella pneumoniae* oder *Pseudomonas aeruginosa* führen (Aurich und Spergser, 2007; Dietz et al., 2007). Um potentiell pathogenes, mikrobielles Wachstum zu kontrollieren, werden deshalb verschiedene Antibiotika den Flüssigverdünnern zugesetzt (Jasko et al., 1993; Dietz et al., 2007). Dabei handelt es sich um Breitspektrumantibiotika, wie die Aminoglycoside Gentamicin und Amikacin, auch wenn diese effektiver gegen Gram-negative aerobe Organismen wirken (Parlevliet et al., 2011). Alternativ ist eine Kombination mehrerer Antibiotika möglich. Beispielsweise werden Penicilline, wie Penicillin oder Ticacillin, vorzugsweise gegen Gram-positive Erreger eingesetzt. Polymyxin B Sulfat wirkt hingegen auf die Gram-negativen Keime (Jasko et al., 1993).

Die Bedeutung dieser Stoffe und ihr Einfluss auf die Qualität der Samenportionen werden kontrovers diskutiert (Dean et al., 2012). Einige Antibiotika scheinen die Motilität der Spermien zu verringern. Insbesondere Gentamicin zeigte in einigen Studien ab einer Konzentration von mehr als 1000 mg/l eine gewisse Toxizität. Auch ein Zusatz von Polymyxin B-Sulfat in Konzentrationen von mehr als 1000 IU/ml sollte vermieden werden (Jasko et al., 1993; Varner et al., 1998; Aurich und Spergser, 2007). Der für die nachteilige Wirkung verantwortliche Mechanismus ist jedoch unbekannt (Jasko et al., 1993). Andere Autoren konnten diese Beobachtungen in ihren Studien nicht nachvollziehen (Squires et al., 1981). Für Amikacin (2 mg/l, 1 mg/l, 1 mg/l) (Arriola und Foote, 1982; Jasko et al., 1993; Varner et al., 1998), Penicillin (1000 IE/ml) (Varner et al., 1998) und Ticarcillin (2 mg/l, 1 mg/l) (Jasko et al., 1993; Varner et al., 1998) wurde in den verwendeten Konzentrationen keine Beeinträchtigung festgestellt.

Im Gegensatz dazu wird beschrieben, dass auch bei Verdünnern ohne Antibiotikum im Vergleich zu Verdünnern mit antimikrobieller Komponente innerhalb von 48 bzw. 96 h keine Verschlechterung der Samenqualität zu verzeichnen war. Eine Pauschalisierung ist an dieser Stelle nicht möglich (Jasko et al., 1993; Price et al., 2008). Wird der verdünnte Samen jedoch bei höheren Temperaturen als 4 - 5 °C aufbewahrt, erwies sich ein Antibiotika-Zusatz als vorteilhaft (Vaillancourt et al., 1993; Price et al., 2008). Ferner wird nicht immer eine vollständige Eliminierung des bakteriellen Wachstums erreicht (Varner et al., 1998; Dean et al., 2012). Aurich et al. (2007) konnten auch nach 48 h noch

schädliche Effekte durch inokulierte *Pseudomonas aeruginosa* feststellen. Als Ursache diskutierten die Autoren bakterielle Toxine. Eine ideale Dosis zwischen wirksamer und schädlicher Gentamicinkonzentration konnte nicht ermittelt werden (Aurich und Sperger, 2007).

Am effektivsten als Monotherapie stellten sich Gentamicin und Amikacin heraus. Durch die Kombination von Amikain und Penicillin konnte die antimikrobielle Wirkung mit guter Spermienmotilität sogar noch weiter verbessert werden (Varner et al., 1998; Dietz et al., 2007). Der Einsatz von Cephalosporinen, wie Cefquinom, mit breiterem Wirkungsspektrum zeigte in einer Studie von 2011 gute Erfolge (Parlevliet et al., 2011).

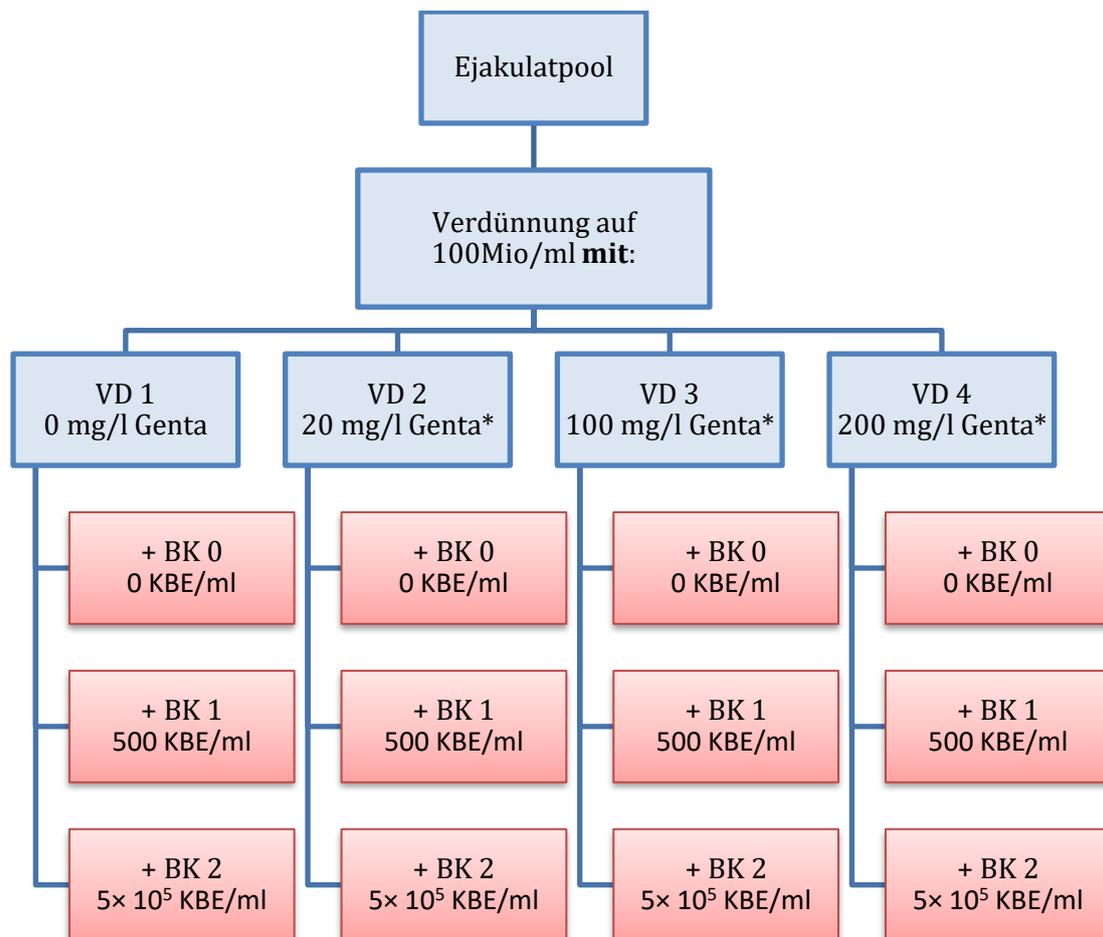
Auch beim Eber und Schafbock ist eine bakterielle Kontamination während des Absamens nicht vermeidbar (Althouse et al., 2000; Althouse und Lu, 2005; Yániz et al., 2010). Antimikrobielle Zusatzstoffe gelten deshalb als essentiell für flüssigkonservierten Samen. Während früher hauptsächlich eine Kombination aus Penicillin und Streptomycin zum Einsatz kam, ist heutzutage Gentamicin als Breispektrumantibiotikum der meistverwendete Zusatz (Althouse et al., 2000; Salamon und Maxwell, 2000). Beim Schaf zeigten Konzentrationen bis 500 mg/ml Gentamicin eine ausreichend gute antimikrobielle Wirksamkeit (Akhter et al., 2008), ohne die Samenqualität zu beeinträchtigen (Yániz et al., 2010). Bei einer Studie beim Schwein an der University of Pennsylvania von 2003 konnte jedoch bei circa einem Drittel der gentamicinhaltigen, flüssigkonservierten Ejakulate noch bakterielles Wachstum gefunden werden. Die Mehrheit der isolierten Keime waren resistent gegen Gentamicin (Althouse und Lu, 2005).

Eine neuere Studie von Becher et al. (2013) untersuchte ebenfalls die Wirkung verschiedener Antibiotika in flüssigkonserviertem Rüdensperma. Die hier verwendete Mischung aus bis zu 1,0 g/l Gentamicin, 0,2 g/l Tylosin, 0,6 g/l Lincomycin und 1,2 g/l Spectinomycin (GLTS) konnte die Mycoplasmen und Ureaplasmen-Kontamination im Schnitt besser verringern als eine Kombination aus 0,6 g/l Penicillin und 1,0 g/l Streptomycin. Eine Keimfreiheit konnte aber nicht erreicht werden. Ein negativer Einfluss auf die Spermienmotilität war nicht zu beobachten. Es zeigte sich für den GTLS-Verdünner im Vergleich zur Kontrollgruppe allerdings ein leichter Abfall der Gesamtmotilität. Weiterhin konnte für die Versuchsgruppen mit den höheren Antibiotikakonzentrationen ein schwacher Anstieg der membran-defekten Spermien nachvollzogen werden. Von einem routinemäßigen Einsatz solch hoher Antibiotikakonzentrationen wird daher abgeraten (Becher et al., 2013).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchsaufbau

In der folgenden Abbildung Abb.1 soll das Vorgehen bei der experimentellen Versuchsdurchführung schematisch dargestellt werden.



\* Tatsächliche Gentamicin-Endkonzentration durch die Verdünnung niedriger

Abbildung 1: Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der 12 Testansätze. Dabei enthalten die Verdüner die genannten Gentamicinkonzentrationen. Durch Zugabe von BK 1 und BK 2 bzw ohne weitere Inokulation (BK 0) wurden die Testansätze auf die aufgeführter *ECH*-Konzentration eingestellt.

Die kurz hintereinander gewonnenen Spermaportionen von jeweils zwei bis drei Rüden wurden gepoolt, um eine Gesamtspermienzahl von mindestens 1,2 Mrd. Spermien zu erhalten. Nach einer Entnahme von 1 - 2 ml für die mikrobiologische Untersuchung des

nativen Keimspektrums, wurde das Ejakulat in insgesamt 12 Testansätze aufgeteilt. Diese setzen sich aus einer Matrix von vier gleichartigen VD (CaniPlus Chill®) mit darin enthaltenen verschiedenen Gentamicinkonzentrationen (0, 20, 100 und 200 mg/l  $\hat{=}$  VD 1- VD 4) zusammen. Die tatsächliche Gentamicin-Endkonzentration der Testansätze lag durch das Vermischen von Verdünner und Sperma unter diesen Werten (siehe 3.5.4). Hinzu kamen drei unterschiedliche *Escherichia coli variatio haemolytica* Konzentrationen (ECH) (0, 500 und  $5 \times 10^5$  KBE/ml). Jede Verdünnervariante wurde mit jeder Keimkonzentration versetzt. Um über die Versuche eine möglichst konstante Bakterienkonzentration (BK) zu verwenden, wurden die vorbereiteten und tiefgefrorenen Bakterien dabei bis zur Zugabe permanent auf Eis gelagert. Die Spermien, VD und Gegenstände, die mit den frischen Ejakulat in Kontakt kamen, wurden auf Heizplatten bei 37 °C warmgehalten, um einen eventuellen Kälteschock der Spermien und ein dadurch bedingtes vermehrtes Absterben zu verhindern. Die Gefäße und Verbrauchsgegenstände, die während der Versuche genutzt wurden, wurden zuvor eingeschweißt und sterilisiert. Hierdurch sollte eine verfälschte und vermehrte Keimbelastung ausgeschlossen werden.

Die 12 entstandenen Testansätze wurden direkt nach ihrer Vermischung (Zeitpunkt 0) auf Viabilitätsparameter der enthaltenen Spermien untersucht, um den Referenzwert für die Probe festzustellen. Dabei kamen neben der Computer-assistierte Spermienanalyse (CASA) auch ein hypoosmotischer Schwelltest (HOS-Test), eine auf Eosin basierende Lebend-Tot-Färbung (Eosin-Ausstrich), und die Spermac®-Färbung zur Beurteilung der Morphologie zum Einsatz. Anschließend wurden die Testansätze bei 4 °C in einer Isolierbox im Kühlschrank gelagert, um ein langsames Abkühlen zu gewährleisten. Weitere Untersuchungen fanden nach 24 h, 48 h und 72 h statt.

Die bakteriologische Untersuchung setzte sich aus der qualitativen Bestimmung des nativen Mikrobioms der Ejakulate vor der Weiterverarbeitung, einer quantitativen Bestimmung der zugegebenen BK zum Zeitpunkt 0 und der Verlaufskontrolle zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten zusammen. Um eine Weitervermehrung der Bakterien zu verhindern, wurden die Proben nach Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (LHL) kontinuierlich auf Eis gelagert.

Für die Nativkontrolle wurde die frisch gewonnene Probe mittels Bakterientupfer sowohl auf Gassner- als auch auf Blut-Agar ausgestrichen und nach 24 h und 48 h auf

Keimwachstum kontrolliert. Zudem fand eine 24-stündige Anreicherung in BHI (Hirn-Herz-Bouillon; 10 ml) statt, von welcher ebenfalls eine Öse auf Blut- und Gassner-Agar ausgestrichen wurde. Gefundene, phänotypisch unterschiedliche Keime wurden isoliert, auf neuen Agarplatten ausgestrichen und über 24 h bei 37 °C weiter bebrütet. Die endgültigen Identifizierung der Kolonien fand mithilfe eines MALDI-TOF-Biotypers (Massenspektrometrie) statt.

Um Varianzen in den Phiolen der zwei vorbereiteten BK auszuschließen, wurden diese ebenfalls quantitativ untersucht. Nach Zugabe zu den einzelnen Testansätzen wurden die Reste aus den Phiolen auf jeweils 5 Blut-Agarplatten mit Hilfe des Agargussverfahrens ausgestrichen. Nach 24 h Bebrütung bei 37 °C erfolgte die quantitative Auswertung.

Um die Wirksamkeit der einzelnen Gentamicinkonzentrationen der VD 1 – VD 4 zu überprüfen, wurde zu jedem folgenden Untersuchungszeitpunkt (24, 48, 72 h) eine 200 µl-Probe der Testansätze abgefüllt, auf Eis zwischengelagert und später im Agargussverfahren zu je 100 µl in Gassner- und Blut-Agar eingegossen. Eine quantitative Auswertung erfolgte nach 24 h Bebrütung bei 37 °C.

## **3.2 Experimentelle Kontamination mit *ECH***

### **3.2.1 Auswahl des Keims**

Bei mikrobiologischen Untersuchungen von Rüdensperma (Pesch et al., 2006) konnte eine hohe Inzidenz von verschiedenen Gram-positiven Keimen, insbesondere Staphylokokken und Streptokokken, und Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, festgestellt werden. Das alleinige Vorkommen dieser Erreger stellt jedoch kein Pathogenitätsanzeichen dar. Der verwendete *Escherichia coli* var. *haem.* (*ECH*)- Stamm wurde vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen bereitgestellt. Er entstammt der Stammsammlung (Nr. 18290, Tgb Nr. P5716/11) und wurde aus einem Vaginaltupfer einer Hündin isoliert. Dieser Stamm wurde gewählt, da er aufgrund seiner Herkunft realistisch die Situation in vivo repräsentiert und potentiell pathogen sein könnte, wodurch eine sichere Elimination wünschenswert ist. Da Gram-negative Keime

wie *E. coli* sowohl auf Blut- als auch auf Gassner-Agar angezüchtet werden können, ergibt sich die Möglichkeit, bei der quantitativen Analyse die iatrogen zugesetzten Bakterien von eventuellen Gram-positiver Begleitkeimen zu unterscheiden. Zudem ist eine phänotypische Unterscheidung von anderen Erregern bedingt möglich. Nicht zuletzt stellt auch das anspruchsarme und schnelle Wachstum einen Vorteil in der Anzucht und Konservierung des Keims dar. Eine Stabilität gegen Umwelteinflüsse, wie das etwaige Einfrieren, und kurze Teilungsintervalle sind weitere Eigenschaften, die für die Verwendung von *E. coli* sprechen.

### **3.2.2 Keimdichtebestimmung der *ECH*-Suspensionen**

Zur Keimdichtebestimmung wurden in dieser Arbeit zwei Methoden angewandt: Das Agargussverfahren und das Oberflächenverfahren mittels Spiralplattierer.

Mit dem Oberflächenverfahren mittels Spiralplattierers (EasySpiral® Dilute, Interscience) wurde die *ECH*-Konzentration bei der Herstellung der einzelnen BK 1 und BK 2 untersucht. Durch das selbstständige und automatisierte Anlegen einer Verdünnungsreihe konnte schnell und einfach bei einer unbekanntem *ECH*-Suspension die genaue Keimzahl bestimmt werden (Gilchrist et al., 1973). Nach dem ausplattieren auf die Agarplatten erfolgte eine Bebrütung im Wärmeschrank bei 37°C über 24 Stunde.

Die quantitative Auswertung erfolgte mithilfe der dem Gerät beigelegten Zähl-Schablone. Diese bestand aus einem kreisförmigen Plastikring mit aufgedruckten, zentripetal kleiner werdenden Kreisen (Sektoren), wobei der äußerste die Größe einer 90 mm Agarplatte aufwies. Zwei weitere, durch den Mittelpunkt laufende Linien, viertelten die Kreise (Abb. 2).

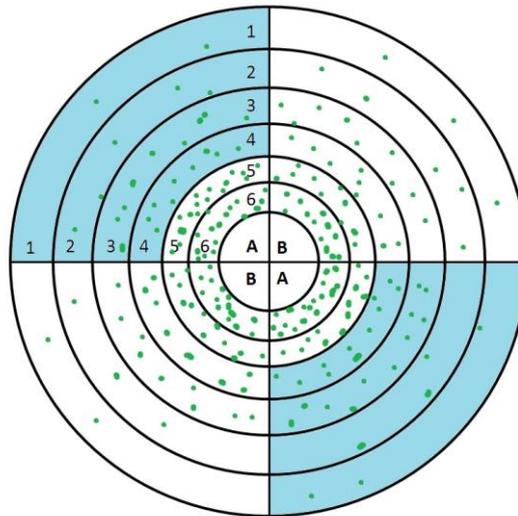


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zählvorlage des Spiralplattierers (Easy-Spiral® Dilute, Interscience)

Zum Auszählen legt man die Vorlage auf die Agarplatte und zählt die Kolonien in jeweils gegenüberliegenden Vierteln aus. Es müssen pro Viertel mindestens 20 Kolonien gezählt werden. Sind weniger Kolonien vorhanden, ist die Anzahl der Kolonien auf der gesamten Agarplatte auszuzählen. Berechnet wird nun die Keimdichte in Koloniebildenden-Einheit je Milliliter Ausgangssuspension mit der folgenden Formel:

$$\text{KBE/ml} = [(A_1 + A_2) / V_{\text{sektor}} \times 1000] \times V_v$$

Die Variablen sind dabei wie folgt definiert:  $A_{1/2}$  ist die Anzahl ausgezählter Kolonien je Viertel,  $V_{\text{sektor}}$  ist eine Konstante, die den Einfluss des Sektors beachtet und  $V_v$  ist der Grad der Verdünnung der Bakterien-Suspension durch den Spiralplattierer, die der Agarplatte zugrunde liegt.

Für die Keimzahlbestimmung in den einzelnen Testansätzen und der quantitativen Kontrolle der zugesetzten ECH-Konzentrationen wurde das Agargussverfahren angewandt. Der Spiralplattierer konnte aufgrund des notwendigen Mindestvolumens von 1 ml nicht verwendet werden. Im Agargussverfahren wurden die ECH-Proben bzw. die Testansätze, nativ oder nach einer Verdünnungsreihe, in eine leere Petrischale pipettiert und mit 12 ml flüssigem Agar übergossen. Dieser wurde kurz zuvor angefertigt und, um nicht zu erstarren, auf 48 °C gehalten. Unter stetigem Schwenken kühlte der Agar bis zum Erstarren ab. Die Bebrütung fand bei 37 ° für 24 h im Inkubator statt. Anschließend wurden

die gewachsenen Kolonien auf einer Agarplatte ausgezählt und entsprechend des eingesetzten Volumens der Proben und der Verdünnung die Keimdichte (KBE/ml) in dieser bestimmt (Grainger und Hurst, 2016).

### **3.2.3 Vorversuch zum Tiefgefrieren einer *ECH*-Suspension**

Um in den Hauptversuchen auf homogene *ECH*-Suspensionen zurückgreifen zu können, diese in den Vorversuchen zunächst konserviert. Hierfür stand Tiefgefrieren mit oder ohne anschließender Lyophilisation zu Verfügung.

Zwar bietet das Lyophilisieren insbesondere durch sehr lange Lagerung bei Kühlschrank- oder Raumtemperatur und schonende Konservierung große Vorteile, ist jedoch mit einem hohen Mehraufwand an Zeit, Material und Technik verbunden. Da sich zudem in diesem Vorversuche zeigte, dass einfaches Einfrieren bei -80 °C ebenso gute Erfolge ermöglichte, wurde auf diesen Schritt verzichtet.

Beim Einfrieren stellt die Eisbildung das größte Schädigungspotential für Zellen dar (Mazur et al., 1972). Um diese Schäden zu minimieren, wurden die Bakterien in ein Gefrierschutzmittel überführt. Dabei erwies sich eine nach dem Vorbild eines Gefriertrocknungsschutzmittels hergestellte Lösung am effizientesten (Martin Senz, 2012). Die Lösung wurde speziell für den Versuch im LHL angefertigt. In 158 ml destilliertem Wasser wurden 8 g Laktose, 8 g Saccharose 8 g Maltose und 18 g Magermilch gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung erfolgte eine eintägige Lagerung im Kühlschrank bis zur Verwendung. Zur Überprüfung der Schutzlösung wurde ein Vorversuch durchgeführt. In einem Anreicherungs-schritt, ähnlich dem des Hauptversuchs wurde eine *ECH*-Suspension hergestellt, welche anschließend in zwei Etappen (1:50 und 1:100) mithilfe des hergestellten Gefrierschutzmediums verdünnt wurde. Unmittelbar vor dem Einfrieren von je 1 ml dieser hergestellten *ECH*-Suspension in Injektionsflaschen (2R) und nach einem Verbleib von 48 h bei -80 °C, erfolgte eine quantitative Analyse. Hierfür wurde mit dem Spiralplattierer (siehe 3.2.2) nach einer 1:10 Verdünnung je 100 µl auf 4 Blut-Agarplatten ausplattieren. Die Auswertung ergab folgende Ergebnisse:

Tabelle 3: Mittelwerte der Versuchsergebnisse zum Einfluss des Tieffrierens auf eine mit Gefrierschutzmedium versetzte *ECH*-Suspension; je 4 Stichproben vor und nach dem Gefrierprozess, Auplattierung und Verdünnung mittels Spiralplattierer (EasySpiral® Dilute)

Untersuchungszeitpunkt	Durchschnittliche* Anzahl an <i>ECH</i> -Kolonien in 100 µl Probe, Verdünnt 1 : 10; Durchschnittswerte aus Vierfachansätzen			
Vor der Tiefkühlung	1,9× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	1,9× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	2,0× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	2,1× 10 <sup>4</sup> KBE/ml
Nach 48 h Tiefkühlung	1,7× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	2,0× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	1,8× 10 <sup>4</sup> KBE/ml	1,1× 10 <sup>4</sup> KBE/ml

\* Berechnung mit Hilfe der in 3.2.3 erläuterten Schablone und Formel

Die durchschnittliche Sterberate betrug damit circa 17 %. Das Einfrieren geschah ohne weiteren Zwischenschritt, wobei die mit 1 ml *ECH*-Suspension gefüllten Glasphiolen von nahezu Kühlschranktemperatur direkt auf -80 °C herabgekühlt wurden.

### 3.2.4 Konzentrationseinstellung der *ECH*-Suspensionen

Der genannte *ECH*-Stamm, der in den Versuchen zum Einsatz kam, wurde als Ausstrich auf Blut-Agar vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere kultiviert und für die weitere Aufarbeitung an den LHL in Gießen übergeben. Zunächst erfolgte die erneute Subkultivierung mittels Dreiösenausstrich (Grainger und Hurst, 2016) auf Blut-Agar, um eine möglichst frische Kultur zur weiteren Anzucht zur Verfügung zu haben. Diese wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert und danach abgeerntet. Dabei wurden mithilfe einer sterilen Einmalöse drei morphologisch gut ausgeprägte und abgegrenzte Kolonien von der Blutplatte entnommen und in kommerziell angefertigte 10 ml BHI suspendiert. Nach sechsstündiger Bebrütung wurde eine 4 ml-Probe der Anreicherungsbouillon entnommen und die restliche Suspension im Kühlschrank gelagert, um eine Weitervermehrung der Bakterien zu verhindern. Mit einem Spiralplattierer erfolgte nun eine quantitative Bestimmung der *ECH*-Keimzahl. Automatisiert wurde von dem Gerät eine Verdünnungsreihe (Medium: 0,85 % NaCl-Lösung) angelegt (10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-9</sup>). Um Material zu sparen, wurden lediglich die Verdünnungsstufen 10<sup>-6</sup> bis 10<sup>-9</sup> auf vier entspre-

chende Blutplatten ausplattiert. Die Inkubation wurde über Nacht bei gleichen Bedingungen wie zuvor vorgenommen.

Die Ergebnisse dieses Anreicherungs-schritts sind in der folgenden Tab. 4 aufgeführt. Die Verdünnungen  $10^{-6}$  und  $10^{-9}$  wurden dabei aufgrund zu hoher bzw. zu niedriger Keimzahlen nicht weiter ausgewertet.

Tabelle 4: Anzahl der *ECH*-Keimdichte in der BHI nach Anreicherung; Verdünnung und Ausplattieren auf Blut-Agar mittels Spiralplattierer (EasySpiral® Dilute)

Ausgezählte Verdünnungsreihe	arithmetischer Mittelwert	Gezählte und hochgerechnete* <i>ECH</i> -Konzentration, Vierfachansatz
$1 \times 10^{-7}$	$\bar{\varnothing} = 1,2 \times 10^9$ KBE/ml	$9 \times 10^8, 1,4 \times 10^9, 1,1 \times 10^9, 1,3 \times 10^9$ KBE/ml
$1 \times 10^{-8}$	$\bar{\varnothing} = 1,5 \times 10^9$ KBE/ml	$2 \times 10^9, 1,8 \times 10^9, 9 \times 10^8, 1,2 \times 10^9$ KBE/ml

\*Berechnung mit Hilfe oben erläuteter Schablone und Formel

Als nächstes erfolgte ein Aufteilen der *ECH*-Suspension in zwei unterschiedliche Gefäße: für eine höher- als auch niedriger-konzentrierte Suspension. Um die angestrebte höhere Endkonzentration von  $5 \times 10^5$  KBE/ml in den jeweiligen Testansätzen zu erreichen und ohne größere Volumina hinzugeben zu müssen, sollten die dafür vorgesehenen Phiolen eine Bakteriendichte von  $1 \times 10^7$  KBE/ml aufweisen. Dies entspricht 50 µl Bakterien-Suspension auf 950 µl mit VD versetztem Sperma. Analog wurden für die niedriger konzentrierte Bakterien-Suspension (500 KBE/ml) Phiolen mit der Dichte von  $1 \times 10^4$  KBE/ml angestrebt. Hiervon können ebenfalls 50 µl auf 950 µl mit VD versetzten Sperma pipettiert werden.

Um dem durch das Einfrieren verursachten Absterben der Bakterien entgegenzuwirken, wurde bei der Weiterverarbeitung eine Absterberate von ~20 % einkalkuliert. Diese wurde in Vorversuchen ermittelt (siehe 3.2.3)

Für die einzelnen Verdünnungsschritte von der Anreicherung bis zur endgültigen Konzentration wurde eine magermilchhaltige-Lösung (siehe 3.2.3) verwendet, die später auch die Bakterien beim Einfrieren schützen sollte. Für die Herstellung der höheren *ECH*-Konzentration BK 2 ( $5 \times 10^5$  KBE/ml) wurde zunächst 1 ml Bakterien-Suspension aus der Anreicherung in 9 ml magermilchhaltige-Lösung und anschließend hiervon 5 ml

in weitere 45 ml magermilchhaltige-Lösung pipettiert ( $\sim 1 \times 10^7$  KBE/ml). Zum Einstellen der niedrigeren *ECH*-Konzentration BK 1 (500 KBE/ml) erfolgte zuvor noch eine 1:1000 Verdünnung. Dazu wurde 1 ml Bakterien-Suspension in 9 ml Peptonwasser pipettiert und aus dem 10 ml Mix 1 ml heraus pipettiert und mit 9 ml magermilchhaltiger Lösung versetzt. Der letzte Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt ( $\sim 1 \times 10^4$  KBE/ml).

Vor und nach jedem Pipettierschritt wurden die Reagenzgläser mittels Reagenzglasmixers aufgeschüttelt, um eine möglichst homogene Verteilung der Bakterien in den Suspensionen zu erhalten.

### **3.2.5 Tiefgefrieren der unterschiedlichen *ECH*-Suspensionen**

Nach Herstellung von *ECH*-Suspensionen mit der jeweiligen Bakterienkonzentration zu je 50 ml wurden diese zu je 1 ml in Lyophilisier-Phiolen umgefüllt und bei  $-80$  °C eingefroren.

Nach dem Einfrieren wurden zur *ECH*-Vitalitätskontrolle stichprobenartig einzelne Phiolen auftauiet und ausgestrichen. Zur besseren Auswertbarkeit und aus praktischen Gründen wurden die einzelnen *ECH*-Suspensionen zuvor noch verdünnt (1 : 40 bzw.  $1 : 2 \times 10^4$ ): Der niedrigen *ECH*-Konzentration wurden zuerst 3 ml 0,85 % Natriumchlorid Lösung beigemischt und anschließend eine 1:10 Verdünnung vorgenommen. Der hohen *ECH*-Konzentration wurde 1 ml 0,85 % Natriumchlorid Lösung zugegeben und danach  $1:10^4$  verdünnt. Für die Auswertung wurden 100  $\mu$ l in Blut-Agar im Agargussverfahren gegossen. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der gewachsenen Kolonien sind in der folgenden Tab. 5 dargestellt.

Tabelle 5: Anzahl der Kolonien der stichprobenartigen Auftaukontrolle der angefertigten *ECH*-Suspensionen (BK 1 und BK 2); jeweils 4 Phiole zu vier verschiedenen Zeitpunkten: 1, 3, 7 und 14 Tage.

Lagerungsdauer bei -80 °C (Tage)	Anzahl an Kolonien in 100 µl der beiden <i>ECH</i> -Suspensionen*	
	Suspension (BK 1) niedrige Keimdichte 1 : 40 verdünnt	Suspension (BK 2) hohe Keimdichte 1 : 2 × 10 <sup>4</sup> verdünnt
1	201, 200, 192, 254	85,80, 83, 91
3	195, 215, 180, 191	75, 85, 85, 75
7	209, 241, 191, 216	60, 61, 76, 69
14	182, 209, 228, 207	67, 76, 75, 80

\*ermittelt im Oberflächenverfahren auf Blut-Agarplatten (Vierfach-Ansätze)

In diesen vorbereiteten und eingefrorenen *ECH*-Suspensionen konnte über einen Untersuchungszeitraum 14 Tagen eine konstante Anzahl an KBE/ml nachgewiesen werden. Die durchschnittliche *ECH*-Konzentration lag bei  $8 \times 10^4$  KBE/ml bzw.  $1,5 \times 10^7$  KBE/ml und damit höher als berechnet ( $1 \times 10^7$  KBE/ml bzw.  $1 \times 10^4$  KBE/ml).

Zum Erreichen der gewünschten Endkonzentrationen in den einzelnen Testansätzen war folglich eine Verdünnung notwendig. Zu 1 ml der niedrig-konzentrierten *ECH*-Suspension wurden nach dem Auftauen vor den einzelnen Versuchsdurchläufen 3,5 ml VD 0, welcher auch zum Verdünnen des Ejakulates verwendet wurde, hinzugegeben. Anschließend wurden hiervon 25 µl in die dazugehörigen, Testansätzen von 975 µl pipettiert. Zu 1 ml der hochkonzentrierten *ECH*-Suspension wurden 0,5 ml VD 0 einpipettiert und ein Volumen von 50 µl bei den entsprechenden Testansätzen mit 950 µl verwendet.

### 3.2.6 Quantitative Kontrolle zugesetzter *ECH*-Suspensionen

Zur Bestimmung der tatsächlich zugegebenen *ECH*-Konzentration zu den einzelnen Testansätzen und dem Ausschluss großer Inhomogenität wurden die Keimdichten der ver-

wendeten *ECH*-Suspensionen (BK 1 und BK 2) ebenfalls bei jedem Versuchsdurchläufen kontrolliert. Dafür wurden nach Entnahme der für die Testansätze benötigten Volumina die übrig gebliebenen Mengen aus den einzelnen Phiolen im Eiswasser gelagert um eine weitere Keimvermehrung zu verhindern und später auf Agarplatten angezüchtet. Um Zählbarkeit und Versuchsnähe zu gewährleisten, wurde von der niedrigen mit 3,5 ml VD versetzten Konzentration ( $8 \times 10^4$  KBE/ml), welche für die Testansätze mit 500 KBE/ml verwendet wurde, eine 1:10 Verdünnung angefertigt und anschließend je 25 µl in acht leere Petrischalen pipettiert. Die hohe Konzentration ( $1,5 \times 10^7$  KBE/ml) wurde zuerst auf 1:1000 verdünnt, anschließend wurden je 50 µl in ebenfalls 8 Petrischalen überführt. Die Verdünnung erfolgte in Zehnerschritten durch das Vermengen von 1 ml Bakterien-Suspension mit 9 ml gepufferten Peptonwasser. Wie bei der Analyse der Testansätze wurde auch hier das Gussagarverfahren angewandt. Je 5 Schalen der niedrigen und 5 Schalen der hohen Konzentration wurden mit Agar gefüllt.

Tabelle 6: Zählergebnisse und errechneter Mittelwert der in den Versuchsdurchläufen 1 - 5 verwendeten *ECH*-Suspensionen (BK 1 und BK 2) zur Überprüfung der eingesetzten Keimdichte in den Versuchsdurchläufen

Versuchsdurchlauf	Anzahl an Kolonien (KBE)			
	In den beiden <i>ECH</i> -Suspensionen*			
	25 µl der 1 : 10 verdünnten Suspension (BK 1)	Ø	50 µl der 1 : $2 \times 10^4$ verdünnten Suspension (BK 2)	Ø
1	30, 38, 37, 21, 47	Ø34,6	18, 36, 31, 22, 24	Ø26,2
2	32, 37, 37, 20, 30	Ø31,2	33, 37, 44, 42, 26	Ø36,4
3	41, 30, 34, 38, 34	Ø35,4	35, 51, 27, 28, 34	Ø35,0
4	52, 30, 41, 25, 31	Ø36,4	36, 42, 53, 61, 31	Ø44,6
5	28, 44, 26, 31, 35	Ø32,8	38, 49, 58, 49, 42	Ø47,2

\*ermittelt im Agargussverfahren mit Blut-Agarplatten (Fünffach-Ansätze)

Die so ermittelte und auch für die einzelnen Testansätze angenommene *ECH*-Konzentration liegt damit zwar zumeist unter den Erwartungen jedoch in einem akzeptierten Rahmen.

### 3.3 Auswahl der Spenderrüden

Die für die Versuche genutzten Ejakulate wurde im Zeitraum von Juli bis September 2013 in der Klinik für Geburtshilfe Gynäkologie und Andrologie der JLU-Gießen im Rahmen der andrologischen Untersuchung gewonnen. Es kamen 11 gesunde Rüden aus privater Haltung zum Einsatz. Aufgrund des hohen Spermabedarfs von mindestens 1,2 Milliarden Spermien pro Versuchszyklus, wurden vier mal zwei Ejakulate und einmal drei Ejakulate gepoolt. Eine wiederholte Nutzung eines Rüden fand nicht statt. Die Rassenverteilung ist in folgender Tab. 7 dargestellt. Das Alter der Rüden wurde nicht dokumentiert.

Tabelle 7: Auflistung der im Versuch abgesamten Rüden

Hunde Nr.	Rasse	Versuchsdurchlauf	Zuchtnutzung
1	Bernhardiner	1	Ja
2	Beagle	1	Nein
3	Gordon Setter	2	Ja
4	English Setter	2	Nein
5	Mops	2	Nein
6	Bernhardiner	3	Nein
7	Mops	3	Nein
8	Bull-Mastiff	4	Nein
9	Australian Shepherd	4	Nein
10	Golden Retriever	5	Ja
11	Golden Retriever	5	Ja

Die Hunde befanden sich in einem guten bis sehr guten Pflege- und Ernährungszustand und wiesen keine Anzeichen einer Erkrankung auf. Die durchgeführte Adspektion und Palpation der Geschlechtsorgane blieb ebenfalls ohne besonderen Befund. Keiner der Hunde erhielt zum Zeitpunkt der Absamung oder zuvor Antibiotika oder zeigte bei der

Absamung Blutbeimengungen in den einzelnen Fraktionen des Ejakulats, was ein Hinweis auf Prostataveränderungen sein und damit einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann.

### **3.4 Gewinnung der Rüdenejakulate**

Die Ejakulate der Rüden wurden jeweils montagsmorgens in der Kleintierabteilung der Klinik für Geburtshilfe Gynäkologie und Andrologie der JLU-Gießen in einem ruhigen, störungsfreien Raum gewonnen. Zur Stimulation war entweder eine Hündin in Standhitze anwesend oder dem Rüdten wurden Tupfer einer läufigen Hündin vorgehalten. Durch manuelle Masturbation, wie von Pesch et al. (2007) beschrieben, wurde der Samen fraktioniert in drei sterile, vorgewärmte Tulpengläser gewonnen. Um eine Kontamination des Samens mit Keimen des Präputiums zu vermeiden, wurden bei der Entnahme sterile Einmalhandschuhe getragen und der Kontakt des Penis mit dem Auffanggefäß vermieden. Das Absamen der Rüden erfolgte stets von der linken Seite.

Der in der Präputialhöhle liegende Bulbusschwellkörper wurde durch Massieren solange stimuliert, bis es zu einer Teilerektion kam. Bei den nun folgenden Friktionsbewegungen begann der Rüdte die Glans Penis auszuschachten, wobei es zum Abspritzen von Vorsekret kam. Danach wurde mit linkem Zeigefinger und Daumen das Präputium über den sich „aufknotenden“ Bulbus zurückgestreift und dieser dahinter ringförmig umschlossen. Die Abgabe der spermienreichen Fraktion erfolgte unter weiter andauernder pulsatiler Massage bei vollständiger Erektion. Dem Umsteigen durch eine Drehung des Rüdten um 180 ° wurde mit einem Drehen des Penis nach caudoventral entgegengerkommen. Der nun zwischen den Hinterbeinen nach caudal zeigende Penis wurde weiter unter leichtem Zug mit der Hand fixiert, um das „Hängen“ nach dem Deckakt zu imitieren, während das Prostatasekret in einem dritten Tulpenglas aufgefangen wurde. Sobald der Penis erschlaffte und die Erektion zum Erliegen kam, wurde der Penis losgelassen und ein reibungsloses Zurückverlagern des Penis in die Präputialhöhle kontrolliert (Busch und Bader, 2001).

Bei allen Rüden konnte ein vollständiger Ablauf der Reflexkette beobachtet werden. Ein fraktioniertes Auffangen des Ejakulates in Vorsekret (klare, erste Fraktion), spermienreiche Fraktion (milchig trübe zweite Fraktion) und Prostatasekret (klare, wässrige dritte Fraktion) war möglich. Die Absamung aller zwei bis drei Rüden eines Versuchsdurch-

laufs erfolgte unmittelbar nacheinander. Bis zur Weiterverarbeitung und während der zweite beziehungsweise dritte Rüte für den Versuchsdurchlauf abgesamt wurde, lagerten die gewonnenen Ejakulate im Labor auf 37 °C warmen Heizplatten, wo auch die Weiterverarbeitung erfolgte.

## **3.5 Beurteilung der Nativejakulate und weitere Aufarbeitung**

### **3.5.1 Makroskopische Beurteilung**

Die grobsinnliche Prüfung des Ejakulates umfasste insbesondere die Parameter Aussehen, Konsistenz, Geruch und Volumen. Das Volumen wurde für die einzelnen Fraktionen separat ermittelt. Das Aussehen des Ejakulates, bestimmt durch Farbe und Konsistenz, steht im engen Zusammenhang mit der Spermienzahl pro Mikroliter (Dichte) der Probe. Etwaige Beimengungen, wie Blut oder Eiter, verändern das Aussehen ebenfalls. Als Normalbefund wurde eine milchig bis molkige Konsistenz und eine weiße bis elfenbeinweiße Farbe gewertet. Der Geruch sollte tierartsspezifisch bis geruchslos sein. Abweichungen können durch Beimengungen von Urin oder anderen Verunreinigungen zustande kommen und hätten wie andere Abweichungen vom Normbefund zum Ausschluss der Probe geführt (Busch und Bader, 2001; Hoffmann, 2003).

### **3.5.2 Vorwärtsbeweglichkeit und Dichtebestimmung**

Um die Tauglichkeit der Probe für die Versuche festzustellen, wurden die Ejakulate mikroskopisch auf ihre Vorwärtsbeweglichkeit untersucht. Sperma ohne oder mit verminderter Beweglichkeit wurde von den Versuchen ausgeschlossen.

Zur Dichtebestimmung wurde nur die spermienreiche Fraktion des Ejakulates herangezogen, da dieses auch später weiter verwendet werden sollte. Die Fraktion 1 und 3 wurden auf das Vorhandensein von Spermien kontrolliert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, welche nach Überprüfung der korrekten Positionierung des Deckgläschens mit Ausbildung des Newton-Lichtinterferenzmusters, mit einer 1:200 Verdünnung (5 µl Sperma in 995 µl Wasser) befüllt wurde. Anschließend wurden unter dem Mikroskop mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung in fünf „mittleren“ Quadraten (entsprechend 80 Kleinstquadraten) Spermienköpfe ausgezählt. Gewertet

wurden Köpfe innerhalb sowie auf den linken und unteren Begrenzungslinien befindlicher Spermien (Busch und Bader, 2001; Hoffmann, 2003). Die Dichte konnte dann mit folgender Formel ausgerechnet werden: Die Variable  $G_{\text{Sperm}}$  definiert die Gesamtzahl der ausgezählten Spermien in 80 Kleinstquadraten, die Variable  $V_{(200)}$  die Verdünnung, welche in diesem Fall den Wert 200 hat.

$$\text{Dichte (Anzahl}/\mu\text{l}) = G_{\text{Sperm}} \div 80 \times V_{(200)} \times 4000$$

Die errechnete Dichte wurde nun mit dem Volumen der spermienreichen Fraktion des Ejakulates multipliziert, um die Gesamtzahl der Spermien in dieser Fraktion zu erhalten.

### **3.5.3 Poolen und Portionierung**

Um eine, für die einzelnen Versuchsdurchläufe ausreichend hohe Gesamtspermienzahl von 1,2 Mrd. Spermien zu erhalten, war es nötig, die Ejakulate von mindestens zwei Ründen zu poolen. Nach der Bestimmung der Dichte und der Spermiengesamtzahl wurden von den kurz nacheinander gewonnenen Ejakulaten entsprechende Volumina zusammenpipettiert. Der so entstandene Ejakulatpool wies eine ausreichend hohe Dichte und Menge auf, um weiter portioniert zu werden. Jeder Testansatz sollte nach Zugabe des VD eine Enddichte von 100 Mio. Spermien/ml beinhalten.

### **3.5.4 Zugabe unterschiedlicher Verdüner und Bakterien-Suspensionen**

Zuerst erfolgte die Zugabe der auf 37 °C erwärmten Verdüner VD 1 bis VD 4. Die Mengen wurden so berechnet, dass alle vier Reagenzgläser mit einer Konzentration von circa 100 Mio. Spermien/ml und mindestens 3 ml Gesamtvolumen gefüllt werden konnten. Das Sperma:Verdüner-Verhältnis sollte dabei 1:2 nicht überschreiten, sodass mindestens so viel VD wie Sperma vorhanden war. Anschließend wurden aus jedem der 4 Reagenzgläser je einmal 1000  $\mu\text{l}$  (1), einmal 975  $\mu\text{l}$  (2) und einmal 950  $\mu\text{l}$  (3) in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Dem wurde nun zuletzt noch die entsprechende Menge *ECH*-Suspension hinzugegeben, wobei in die Eppendorf-Reaktionsgefäße (1) keine weiteren Zusätze hinzukamen, sodass diese nicht mit *ECH* angereichert wurden. In die Eppendorf-Reaktionsgefäße (2) wurden 25  $\mu\text{l}$  aufgetaute und verdünnte *ECH*-Suspension (siehe

3.2.3) von der niedrigen Konzentration pipettiert, in die Reaktionsgefäße (3) 50 µl der aufbereiteten hohen *ECH*-Suspension. Die damit entstandenen 12 Testansätze wurden fortan immer denselben Bedingungen ausgesetzt.

## **3.6 Spermauntersuchung**

### **3.6.1 Untersuchungszeitpunkte und Handhabung**

Zur Untersuchung der Vitalparameter und bakteriologischen Analyse wurden 4 Zeitpunkte gewählt, wobei der erste als Nativkontrolle zum Zeitpunkt 0, direkt nach Herstellung der Testansätze, diente. Folgeuntersuchungen fanden nach 24, 48 und 72 h statt. Die Lagerung erfolgte kontinuierlich bei 4 °C im Kühlschrank in einer mit Kühlakkus bestückten Box um Temperaturschwankungen zu minimieren. Für die Probenentnahme verblieben die Testansätze im Kühlschrank. Zum Zeitpunkt 0 wurden 33 µl Testansatz entnommen und folgenden Tests unterzogen: Lebend-Tot-Färbung, Spermac®-Färbung, HOS-Test und eine CASA. Nach Lagerung im Kühlschrank erfolgten vor der Untersuchung eine Erwärmung der Testansätze sowie ein Anwärmen der Objektträger für die Motilitätsuntersuchung auf 37 °C. Um eine bessere Revitalisierung der Spermien zu erreichen, wurden die Testansätze zudem nach Empfehlung von Minitüb 1:1 mit CaniPuls Enhance versetzt. Dafür wurden vor Durchführung der oben genannten Tests 50 µl des Testansatzes mit 50 µl vorgewärmten CaniPuls Enhance gemischt.

Neben diesen Tests wurden noch zusätzlich 200 µl des Testansatzes entnommen, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur quantitativen bakteriologischen Untersuchung in Eiswasser gelagert.

### **3.6.2 Mikroskopische Untersuchung**

Die mikroskopische Untersuchung umfasste zwei Phasen. Zum einen die Untersuchung der Nativproben vor Weiterverarbeitung (Dichtebestimmung, Schätzung der Vorwärtsbeweglichkeit) und zum anderen Untersuchungen, die als Verlaufskontrollen über den Zustand der Spermien Auskunft geben sollten. Hierzu zählten das Auswerten eines Lebend-Tot Ausstriches, einer Spermac®-Färbung zur Beurteilung morphologischer Veränderungen der Spermien und der HOS-Test zur Kontrolle der Membranintegrität.

Zur Anwendung kamen dabei zwei Phasenkontrastmikroskope (Hund H 500; Leica CM E) und als elektronische Zählhilfe ein Assistent Counter AC-15.

### **3.6.2.1 Eosin-Ausstrich**

Zur Beurteilung des Anteils lebender bzw. toter Spermien wurde ein 10 µl großer Tropfen Testansatz auf einen entfetteten, sauberen und 37 °C warmen Objektträger pipettiert und anschließend 20 µl Eosin-Färbelösung dazugegeben. Durch wiederholtes, behutsames Schwenken wurden die Tropfen vermischt, mit der Kante eines weiteren Objektträgers aufgenommen, in einem Zug nach Art eines Blutausstrichs ausgestrichen und trocknen gelassen. Die Färbezeit betrug maximal 25 Sekunden. Pro Ausstrich wurden 200 Spermien ausgezählt. Ungefärbte Spermien galten als Lebende, durch eine permeable Plasmamembran mit Eosin rot gefärbte Spermien hingegen als tote Spermien. (Busch und Waberski, 2007; Busch, 2009)

### **3.6.2.2 Pathomorphologie und Kappenveränderungen (Spermac®-Färbung)**

Zur Beurteilung der Morphologie der Spermien wurde ein Spermac®-Spermaaustriech angefertigt. Zwar kann die Morphologie auch im Eosin-Ausstrich beurteilt werden, zur Anfärbung und Beurteilung der akrosomalen Integrität bedarf es jedoch einer anderen Färbelösung, z. B. der Spermac®-Färbung. Bei dieser kommerziell erhältlichen Färbung handelt es sich um einen Kit bestehend aus einer Fixierlösung, einer hellroten Lösung zur Färbung des Mittelstücks, einer hellgrünen Lösung zur Anfärbung des Kopfs und einer dunkelgrünen Lösung zur Darstellung des Akrosoms. Die genaue Zusammensetzung ist jedoch unbekannt.

Auf einen angewärmten Objektträger wurde ein 10 µl großer Tropfen Testansatz pipettiert, welcher mit einem weiteren Objektträger ausgestrichen und anschließend trocknen gelassen wurde. Danach wurde der Objektträger 10 Minuten in die Fixierlösung des Färbekits gestellt und fixiert, in einem Wasserbad durch wiederholtes Eintauchen und Herausnehmen gewaschen und für zwei Minuten in die rote Färbelösung (A) verbracht. Nach erneutem Waschen in frischem Wasser wurde der Objektträger in die hellgrüne Färbelösung (B) überführt. Hier wurde der Objektträger eine Minute belassen, erneut gründlich gespült und schließlich für eine Minute in die dunkelgrüne Lösung (C) gegeben. Nach einem letzten Waschvorgang wurden der Objektträger zum Trocknen aufgestellt. Das Wasser wurde vor jedem Waschgang ausgetauscht und durch vorsichtiges

Abtupfen der schmalen Kante des Objektträgers versucht, ein Verunreinigen der einzelnen Lösungen zu minimieren. Zur Beurteilung wurde das Präparat unter dem Mikroskop bei 1000× Vergrößerung und Ölimmersion mit negativem Phasenkontrast durch Auszählen von 200 Spermien analysiert. Durch die Färbung stellten sich die verschiedenen Spermienanteile in unterschiedlicher Farbe dar: Akrosomen, Mittelstück und Geißel grün, das äquatoriale Band hellgrün und Zellkerne rot.

Morphologische Veränderungen können nach verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Die Auswertung erfolgte nach der Lokalisation der Veränderung, wie auch in Tab. 8 dargestellt (Busch und Waberski, 2007; Busch, 2009).

Tabelle 8: Befundungsprotokoll für die Erhebung der Spermienmorphologie (Busch und Waberski, 2007), modifiziert. Graue Unterpunkte wurden nicht einzeln klassifiziert.

<ol style="list-style-type: none"><li>1. Kopfkappenveränderungen<ol style="list-style-type: none"><li>a. Abgelöstes Akrosom</li><li>b. Akrosom in Auflösung oder deformiert</li><li>c. Akrosom schief</li></ol></li><li>2. Kopfveränderungen<ol style="list-style-type: none"><li>a. Rund</li><li>b. Schmal</li><li>c. Zwerg</li><li>d. Riesen</li></ol></li><li>3. Halsveränderungen<ol style="list-style-type: none"><li>a. Halsbruch</li><li>b. Lose Köpfe</li></ol></li></ol>
---

### 3.6.2.3 Hypoosmotischer Schwelltest (HOS)

Bei diesem Belastungstest wurden Spermien in ein hypotones Medium verbracht, dort 30 Minuten belassen und danach unter dem Phasenkontrastmikroskop der Funktionszustand der Plasmamembran beurteilt (Goericke-Pesch und Failing 2013). Das Medium

wurde nach dem im Anhang (9.4.3) beschriebenen Rezept im Voraus hergestellt, zu je 100 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäß abgefüllt und bei -21 °C gelagert. So konnten für alle HOS-Versuche gleiche Bedingungen geschaffen werden. Für die Versuche wurde zu 100 µl erwärmten HOS-Medium 10 µl Testansatz hinzu pipettiert und eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein 10 µl großer Tropfen entnommen, auf einen Objektträger verbracht, mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach einer Absenkezeit von fünf Minuten erfolgte bei 400× Vergrößerung die Auswertung von je 200 Spermien. Durch die durch Wasseraufnahme bedingte Schwellung kam es bei membranintakten Spermien zu einem graduell unterschiedlichen Aufrollen der Schwänze (curled tail), wobei schon leichtes Aufrollen als intakt gezählt wurde. Membrandefekte, nicht gerollte oder komplett um den Kopf geschlungene Schwänze, zeigten dieses Phänomen nicht (not curled) (Hoffmann, 2003).

### **3.6.3 Computer-assisted sperm analysis (CASA)**

Zusätzlich zu diesen subjektiven Analysemethoden wurde auch noch eine CASA zur Motilitätsanalyse mit Hilfe des Spermvision™ (Minitüb GmbH, Tiefenbach) vorgenommen.

#### **3.6.3.1 Spermvision™-Motilitätsuntersuchung**

Das verwendete computergestützte Motilitätsanalyzesystem Spermvision™ bestand aus folgenden Komponenten: Als Mikroskop diente ein Olympus BX41 (Okular 10 x) mit motorisiertem Heiz-Objekttisch (38 °C) und negativem Phasenkontrastobjektiv (UPlanFINH 20×/0.50 Ph1). Der Objekttisch wurde computergesteuert an die richtige Position gefahren, konnte jedoch auch manuell mit Hilfe eines Joysticks gesteuert werden. Am Okular angeschlossen war eine XM10 Schwarz/Weiß Digitalkamera mit der die Bilder digitalisiert und an den PC (Pentium® 4 Prozessor (2,26 GHz, 1 GB RAM, HDD: 40 GB und 19 Zoll Flachbildschirm) weiter geschickt wurden. Als Betriebssystem wurde ein Microsoft Windows XP Professional genutzt. Die Version der genutzten Spermvision-Software (3.5.6.2) stammt von 2009. Für die Messungen wurden standardisierte Zählkammern (Leja) verwendet, in die pro Objektträger 4 einzelne Kammern (A-D) mit einer Tiefe von 20 µm eingearbeitet waren. Nach vollständigem Füllen einer Kammer mit einer Probe wurde sofort mit der Analyse begonnen. Der Objektträger wurde dabei so ausgerichtet, dass das Objektiv mittig über der zu messenden Kammer positioniert war, so dass keine Randbereiche zur Analyse herangezogen wurden. Pro Testansatz wurden 8 Gesichtsfel-

der nach eingestellten Kriterien bewertet. Die genauen Einstellungen zur Identifizierung der Spermien, die den Messungen zu Grunde liegen, sind Tab. 9 zu entnehmen. Die Auswertung der Beweglichkeit, Vorwärtsbeweglichkeit sowie der übrigen Messergebnisse wurden im Anschluss numerisch als Mittelwert der 8 Gesichtsfelder dargestellt. Eine Speicherung der Daten erfolgte nach jeder Messung automatisch.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der für die SpermVision® Motilitätsanalyse verwendeten Einstellungen und Richtwerte (Goericke-Pesch et al. 2012).

Parameter	Einstellung	Parameter	Einstellung
Messkammer	Leja 2,5 µm	Unbewegliche Spermien	AOC < 9,5°
Messtemperatur	37 °C	Gesamtbeweglichkeit	Summe aus lokal und vorwärtsbeweglichen Spermien
Lichtintensität	80 bis 110	Lokalbeweglichkeit	DSL < 6,0 µm
Tiefe des Blickfeldes	20 µm	Vorwärtsbeweglichkeit	Gesamtbeweglichkeit abzüglich der Lokalbeweglichkeit
Pixel/µm Verhältnis	168 zu 100	Lineare Bewegung	STR > 0,9 und LIN > 0,5
Spermienidentifikation	20 bis 60 µm	Kurvilineare Bewegung	DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5
Zählvoraussetzung	8 Felder oder 4000 Zellen	Framerate	60 Frames/s
Punkte der Spermienbewegung	11		

### **3.6.3.2 Vorbereitung der Testansätze und Befüllung der Zählkammern**

Die auf dem beheizten Objektträgertisch auf 38 °C (Verstegen et al., 2002) erwärmten Messkammern wurden mit 3 µl eines Testansatzes befüllt (Schäfer-Somi und Aurich, 2007, Goericke-Pesch et al. 2012). Dabei wurde dieser zuvor erwärmte, durch Schwenken homogenisiert, mit einer Pipette das abgemessene Volumen entnommen und dicht vor der Kammer langsam, aber kontinuierlich wieder abgegeben, sodass sich die Messkammer ohne Lufteinschlüsse gleichmäßig und komplett durch die Sogwirkung des kapillaren Spalts füllte. Die Füllung der Kammer wurde anschließend überprüft. Bei inhomogener Füllung wurde sie verworfen und eine neue verwendet. Für ein optimales Erkennen der Spermien durch die Spermvision-Software wurde vor jeder Messung die Helligkeit der Lichtquelle des Mikroskops mittels integrierter Lichtsensoren justiert. Der optimale Wert lag dabei zwischen 95 und 100.

### **3.6.3.3 Motilitätsanalyse**

Die Motilitätsanalyse durch eine CASA geschieht nahezu vollautomatisch, wodurch subjektive, durch den Beobachter beeinflusste Messungen, minimiert werden. Durch die graphische Darstellung der unter 200× Vergrößerung aufgenommenen kurzen Sequenzen, die für die Analyse herangezogen wurden, war es möglich, jede Messung durch eine Schätzung einer Plausibilitätskontrolle zu unterziehen. Bei Abweichungen konnte die Messung erneut durchgeführt werden. Spermienagglutinate wurden bei der Messung nicht berücksichtigt, Kontaminationen wurden durch die Software von Spermien durch definierte Rahmenbedingungen wie Größe, Fläche und Geißel unterschieden. Die Köpfe der Spermien wurden in unterschiedlichen Farben markiert, was die Unterscheidung zwischen unbeweglichen, lokalbeweglichen oder vorwärtsbeweglichen Spermien vereinfachte (Level 1-Klassifizierung siehe Anhang 9.3). Die unterschiedliche Färbung der Bewegungslinien der einzelnen Spermien pro Gesichtsfeld wurde durch die Level 2-Klassifizierung (siehe Anhang 9.3) festgelegt und gab die Bewegungsmerkmale, wie Linearität der vorwärtsbeweglichen Spermien, an. Im Anschluss an die Messungen der 8 Gesichtsfelder wurde auf dem Monitor ein Auszug der erfassten Parameter angezeigt und anschließend automatisch gespeichert.

Neben den Hauptparametern Gesamtbeweglichkeit, Vorwärtsbeweglichkeit, Lokalbeweglichkeit und unbewegliche Spermien konnten durch die Spermvision-Software noch

eine Reihe weiterer Analysen zur genaueren Auswertung der Bewegung der Spermien ermittelt werden. Zur Erklärung dieser Werte soll folgende Auflistung dienen (Iguerouada und Versteegen, 2001c; Minitüb GmbH, 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Die Unterteilung in „primäre“ und sekundäre Parameter“ dient der Unterscheidung zwischen gemessenen und errechneten Werten

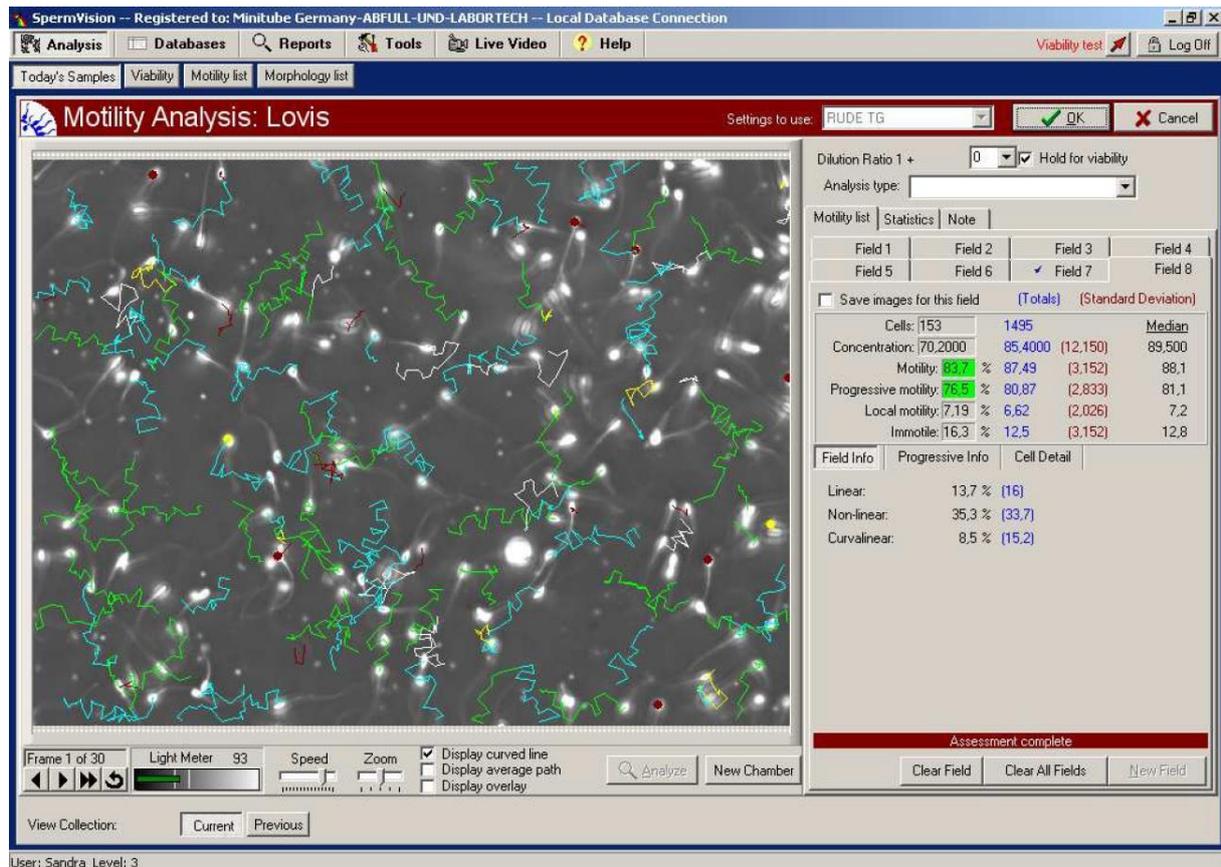


Abbildung 3: Beispiel eines Monitorbildes nach der Motilitätsanalyse; links die grafische Darstellung, rechts Anzeige der Messergebnisse

Primäre Parameter:

- Motility: Anteil der beweglichen Spermien von der Gesamtspermienzahl in der Probe [%]
- Progressive motility: Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien von der Gesamtspermienzahl in der Probe [%]
- Local motility: Anteil der ortsbeweglichen Spermien von der Gesamtspermienzahl in der Probe [%]

- Immotile: Anteil der unbeweglichen Spermien von der Gesamtspermienzahl in der Probe [%]
- DCL (Distance Curved Line [ $\mu\text{m}$ ]): die tatsächliche, durchschnittliche Distanz, die die Spermien während der Analysenperiode zurückgelegt haben
- DAP (Distance Average Path [ $\mu\text{m}$ ]) die an einer geglätteten Linie gemessene, durchschnittliche Distanz, die die Spermien während der Analysenperiode zurückgelegt haben
- DSL (Distance Straight Line [ $\mu\text{m}$ ]): die gerade, zwischen Start und Endpunkt zurückgelegte, durchschnittliche Strecke der Spermien während der Analysenperiode
- VAP (Velocity Average Path [ $\mu\text{m} / \text{sec}$ ]): die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien über die zurückgelegte, geglättete Strecke
- VCL (Velocity Curved Line [ $\mu\text{m} / \text{sec}$ ]): die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien über die komplette, zurückgelegte Strecke
- VSL (Velocity Straight Line [ $\mu\text{m} / \text{sec}$ ]): die durchschnittliche Geschwindigkeit der Spermien über die gerade Strecke
- ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement [ $\mu\text{m}$ ]): die durchschnittliche Auslenkung der Spermienköpfe während der Messperiode
- BCF (Beat Cross Frequency [in Hertz]): die durchschnittliche Frequenz der seitlichen, oszillatorischen Bewegungen der Spermienköpfe um die mittlere Bahn während der Messperiode

#### Sekundäre Parameter:

- LIN (Linearity (=VSL/VCL)[%]): Linearität, das Verhältnis der geraden Strecke zur tatsächlich zurückgelegten Strecke
- WOB (Wobble (=VAP/VCL) [%]): Auslenkung der Spermien auf der tatsächlichen Strecke um die geglättete Strecke
- STR (Straightness (=VSL/VAP) [%]): Geradlinigkeit der geglätteten Strecke
-

## 3.7 Bakteriologische Untersuchung

Alle bakteriologischen Untersuchungen fanden in den Laborräumen des LHL, Abteilung Veterinärmedizin, in Gießen statt.

Die bakteriologische Untersuchung fand in zwei Etappen statt. Zum einen wurde das native Mikrobiom der Ejakulate untersucht und typisiert, um so nochmals einen Überblick über die Verteilung unterschiedlicher Keime im Sperma zu erhalten. Zum anderen wurden die Testansätze zu drei verschiedenen Zeitpunkten quantitativ ausgewertet. So konnte der Anteil der zugegebenen *ECH*, welche in den einzelnen Testansätzen zu finden war, zu einem Verlauf zusammengestellt werden. Um überprüfen zu können, ob die zugegebenen Keimzahlen jedes Versuchsdurchlaufs annähernd identisch waren, erfolgte zudem noch eine quantitative bakteriologische Untersuchung der den Testansätzen zugegebenen *ECH*-Suspensionen (siehe 3.2.4).

### 3.7.1 Bakteriologische Analyse des Nativspermas

Da das Präputium des Hundes nie keimfrei ist, wurde bei der Entnahme darauf geachtet, den Kontakt zwischen dem Auffanggefäß und dem Penis zu vermeiden. Kurz nach Entnahme und Vermischen der Ejakulate für die Versuche, wurde 1 ml des Spermas in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung in Eiswasser aufbewahrt. Die Anzuchtung erfolgte sowohl auf Gassner- als auch auf Blut-Agar unter aeroben Bedingungen. Mit je einem sterilen Abstrichtupfer wurde Probenmaterial aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß genommen und mäanderförmig auf eine Platte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte über 24 h bei 37 °C in einem Brutschrank. Ein dritter, mit Sperma getränkter Tupfer, wurde für einen Anreicherungs-schritt 24 h bei 37 °C in BHI (10 ml) aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurden die beiden Agarplatten auf Bakterienwachstum beurteilt, Subkulturen von phänotypisch unterschiedlichen, gut abgrenzbaren Kolonien mit einer sterilen Einmalöse auf Blut- und Gassner-Agar im Drei-Ösen-Ausstrich ausgestrichen und diese mit den bereits bebrüteten Platten für weitere 24 h und bei 37 °C inkubiert. Die Anreicherungsbouillon wurde gut aufgeschüttelt und anschließend ebenfalls im Drei-Ösen-Ausstrich auf beide Agartypen geimpft und mit den anderen Platten inkubiert.

Am Tag 2 wurden zuerst die Platten von Tag 0 nach 48 h auf das Wachstum neuer, noch nicht subkultivierter Kolonieförmungen untersucht und diese dann gegebenenfalls angelegt. Danach wurde das Ergebnis der Anreicherung auf das Vorkommen neuer Kolonieförmungen geprüft und im positiven Fall eine Isolierung dieser Keime vorgenommen. Zuletzt wurden die am Vortag angelegten Subkulturen auf Reinheit geprüft und anschließend mittels Massenspektrometer identifiziert: Auf sogenannte „target-plates“ wurden geringe Mengen der zu identifizierenden Kolonie (mindestens jedoch  $10^5$  Zellen) auf vordefinierte Felder geschmiert und anschließend mit  $2\ \mu\text{l}$  einer Alpha-Zyano-4-Hydroxymzimtsäure Matrixlösung (50 % Acetonitril, 2,5 % Trifluoressigsäure) beträufelt und trocknen gelassen. Zur Kontrolle wurden pro Probe immer zwei Felder zur Analyse herangezogen. In die dazugehörige PC-Software wurden die Daten der zu untersuchenden Felder auf der „target-plate“ eingegeben und anschließend die Analysesoftware (MALDI-TOF MS Application Note) gestartet. Das Ergebnis wurde anschließend auf dem Monitor angezeigt und ausgedruckt. Sowohl das wahrscheinlichste Ergebnis als auch das zweitwahrscheinlichste Ergebnis wurden automatisch ermittelt und mit Wahrscheinlichkeitszahlen versehen, wobei Ergebnisse mit einem Wert  $\geq 2$  und identischer Doppelprobe als sehr sicher angesehen wurden.

Am Tag 3 erfolgte lediglich noch eine Untersuchung, wenn zuvor noch neue Kolonien identifiziert und subkultiviert wurden. Das Vorgehen war dabei das gleiche wie am Tag 2, mit einer Kontrolle auf Reinheit und anschließender Identifizierung durch Massenspektrometrie.

### **3.7.2 Bakteriologische Analyse der Testansätze**

Die quantitative bakteriologische Untersuchung der Testansätze fand an drei Zeitpunkten statt: nach 24, 48 und 72 h. An diesen Untersuchungstagen wurden vor der spermatischen Untersuchung jedem der 12 Testansätze nach vorherigem vorsichtigem Aufschütteln (um die Homogenität der Probe zu gewährleisten) 0,2 ml entnommen. Diese wurden in sterile, vorbeschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung in Eiswasser gelagert. Den Testansätzen mit der hohen BK ( $5 \times 10^5$  KBE/ml) und VD 0 wurde aus praktischen Gründen zur besseren Zählbarkeit vor dem Ausplattieren noch ein Verdünnungsschritt von 1:1000 vorangestellt. Um eine hohe Genauigkeit zu gewährleisten, wurde dieser Schritt in drei Etappen (Ver-

dünnung von 1:10) durchgeführt: Zuerst wurden 200 µl des Testansatzes zu 1,8 ml verbrauchsfertigem, gepuffertem Peptonwasser (9 ml) hinzugegeben und anschließend gut gemischt. Hiervon wurde nun 1 ml des verdünnten Testansatzes in weitere 9 ml gepuffertes Peptonwasser pipettiert und erneut gut vermischt. Der letzte Schritt erfolgte analog zu dem Vorherigen: 1 ml wurde in ein neues Reagenzglas mit 9 ml Peptonwasser gefüllt und so die erstrebte 1:1000 Verdünnung hergestellt. Die übrigen Testansätze wurden ohne weitere Verdünnung verwendet.

Als nächstes wurden 100 µl aus den Eppendorf-Reaktionsgefäß bzw. aus dem Reagenzglas in vorbeschriftete, sterile und leere Petrischalen gegeben, sodass zum Schluss von jedem Testansatz (n = 12) je eine Schale mit 100 µl bestückt war. Um eine gleichmäßige Verteilung so geringer Volumina im Agar zu erreichen, erfolgte die Anzucht im Agargussverfahren, wobei der Agar flüssig zu den Testansätzen in die Petrischale gegeben und durch Schwenken in Achtertouren eine homogene Verteilung erreicht wurde. Der Blut-Agar wurde nach Anleitung für 200 ml (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 2010) aus Granulat hergestellt, autoklaviert und bis zur Verwendung bei 48 °C im Wasserbad aufbewahrt. Das Schafblut (8 %) wurde dem Agar erst kurz vor der Verwendung zugesetzt. Jede Petrischale wurde mit 11 – 12 ml Agar gefüllt und bis zum Erstarren geschwenkt. Danach konnten die restlichen 100 µl-Testansatz aus den Eppendorf-Reaktionsgefäß bzw. Reagenzglas in weitere 12 Petrischalen gegeben und auf homologe Weise in Gassner-Agar angezüchtet werden. Nach vollständigem Erstarren wurden die gegossenen Petrischalen für 24 h bei 37 ° inkubiert.

Die Auswertung der Platten erfolgte manuell, wobei jede morphologisch einer *ECH* entsprechenden Kolonie als Zählhilfe mit Folienstift auf der Petrischale markiert und anschließend das Ergebnis notiert wurde. Bei sehr dicht bewachsenen Agarplatten mit mehr als 300 Kolonien wurde nur ein repräsentativer Anteil ausgewertet und auf die gesamte Agarplatte hochgerechnet.

Die Verwendung von zwei Typen Agar fand nur beim ersten Versuchsdurchlauf statt. Dabei stellte sich heraus, dass die Keimzahlen auf dem Blut-Agar stets höher waren als auf dem adäquaten Gassner-Agar. Die quantitative, bakteriologische Untersuchung ab Versuchsdurchlauf 2 wurde auf gleiche Weise jedoch nur auf zwei Blut-Agar-Platten durchgeführt.

### 3.8 Statistische Methoden

Für die Erstellung und Verwaltung der Ergebnisse wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel 2010 verwendet. Diese Software wurde auch zur Berechnung der Mittelwerte und Erstellung der Säulen- und Liniendiagramme genutzt.

Die statistische Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Biomathematik und Datenverarbeitung der JLU-Gießen des Fachbereichs Veterinärmedizin.

Technisch wurden die Berechnungen durch die Statistik-Programme BMDP2V 8.1 zur Analyse der Varianz und Kovarianz bei wiederholten Messungen (Statistical Solutions Ltd. 1993) und dem Statistik-Programm R 3.0.2 (2013, Free Software Foundation's GNU project, R-package MASS, R-Funktion glmmPQL) zur Berechnung einer multiplen Poisson-Regression (mixed model-estimated) mit Wald-Test unterstützt.

Bewertet wurden der Einfluss des VD, der BK und des Untersuchungszeitraums. Die Parameter mit normalverteilten Merkmalen, wie Beweglichkeit und Vorwärtsbeweglichkeit als auch die übrigen CASA-Werte und der Anteil im Eosin-Ausstrich lebender Spermien wurden durch die BMDP-Software (BMDP1D1) hinsichtlich der Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Minima (min.), Maxima (max.) und des Stichprobenumfangs (n) berechnet. Anschließend kam eine dreifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung mit dem Programm BMDP2V zum Einsatz, um die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede zu überprüfen.

Bei den morphologischen Untersuchungskriterien (Veränderung der Spermienschwänze, Hälse, Kopfablösung, Kopfkappendeformation/Verlust und Plasmotropfen) lag eine rechtsschiefe Verteilung der Daten vor. Für diese Zählergebnisse erfolgte ebenfalls eine einfache Datenbeschreibung hinsichtlich der arithmetischen Mittelwerte, der Standardabweichungen, der Minima und Maxima und des Stichprobenumfangs. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Poisson-Regression für gemischte hierarchische Modelle mit anschließendem Wald-Test durch das Statistik-Programm R 3.0.2

Der Richtwert für die statistische Signifikanz wurde bei einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  angesetzt. Damit gelten Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Untersuchungsergebnisse der Ejakulate**

Die Ergebnisse der Ejakulatpools wurden in den Versuchsdurchläufen vor dem Vermischen mit Verdünner und der Portionierung erhoben. Für die folgenden Untersuchungen wurde ausschließlich die spermareiche Fraktion herangezogen.

#### **4.1.1 Makroskopische Untersuchung**

Das Volumen der untersuchten Ejakulate lag im arithmetischen Mittelwert ( $\pm$ SD) bei  $2,02 \pm 1,4$  ml ( $n = 11$ ). Die Spermafarbe wurde in allen Fällen (100 %) als weiß beurteilt. Der Geruch war ohne besonderen Befund und konnte in allen Fällen (100 %) als tierartspezifisch beschrieben werden. Die Viskosität variierte zwischen milchiger (10/11) bis sahniger (1/11) Konsistenz. Alle Ejakulate (100 %) waren frei von Beimengungen oder Verunreinigungen.

#### **4.1.2 Bakteriologische Untersuchung**

Die bakteriologische Untersuchung erfolgte an den Ejakulatpools.

Hier konnten in allen Ejakulaten ( $n = 5$ ) Bakterienbeimengungen festgestellt werden. Die genaue Verteilung ist in der nachfolgenden Tab. 10 dargestellt. Sieben dieser Keime weisen ein Gram-positives Färbeverhalten auf, sechs ein Gram-negatives. Die genaue Keimspezies wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie ermittelt. Die Bewertungszahl beschreibt die Sicherheit der Identifizierung. Werte von 3 bis 2.3 geben eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifikation an. Ein Ergebnis von 2.3 bis 2 beschreibt eine sichere Gattungsidentifikation und eine wahrscheinliche Speziesidentifikation. Liegt die Bewertungszahl zwischen 2 und 1.7, ist zumindest die Gattung höchstwahrscheinlich korrekt ermittelt. Werte unterhalb von 1.7 erlauben keine zuverlässige Identifikation.

Tabelle 10: Ergebnisse der qualitativen bakteriologischen Untersuchung der gepoolten spermareichen Fraktion

Versuchsdurchlauf	Bakterium	Gram-Verhalten	Bewertungszahl
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	neg	2,15
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	pos	2,3
	<i>Providencia rettgeri</i>	neg	2,43
2	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pos	2,15
	<i>Bacillus licheniformis</i>	pos	2,08
	<i>Moraxella canis</i>	neg	1,79
3	<i>Streptococcus canis</i>	pos	2,15
	<i>Pasteurella canis</i>	neg	2,25
4	<i>Escherichia coli</i>	neg	2,4
	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	pos	2,04
	<i>Staphylococcus warneri</i>	pos	1,72
	<i>Micrococcus luteus</i>	pos	2,06
5	<i>Escherichia coli</i>	neg	2,35

#### 4.1.3 Dichtebestimmung, Verdünnung und Gentamicin-Endkonzentration

Die Dichte der spermienreichen Fraktion lag im arithmetischen Mittelwert bei  $486 \pm 140$  Mio. Spermien/ml (min.: 360 Mio/ml max.: 875 Mio/ml; n = 11). Bei der mikroskopischen Untersuchung des Vor- und des Nachsekrets konnten motile Spermien nachgewiesen werden.

Durch die unterschiedlichen Dichten der Ejakulate ergaben sich ein für jeden Versuchsdurchlauf angepasstes Mischungsverhältnis von Ejakulat zu VD und eine entsprechende Gentamicin-Endkonzentration in den Testansätzen.

Tabelle 11: Darstellung des Verdünnungsverhältnisse von Spermien : Verdünner in den einzelnen Versuchsdurchläufen

Untersuchungs-Parameter	Versuchsdurchlauf				
	1	2	3	4	5
Spermiendichte (in Spermien/ $\mu$ l)	550.000	575.000	420.000	400.000	440.000
VD1 - 4 / Versuchsdurchlauf (in ml)	2,9	2,85	2,4	2,7	2,4
Ejakulat-Menge/VD (in ml)	0,65	0,6	0,75	0,9	0,7
Verdünner:Ejakulat Verhältnis	1 : 5,5	1 : 5,6	1 : 4,2	1 : 4,3	1 : 4,4

Tabelle 12: Gentamicin-Endkonzentration in den einzelnen Testansätzen in den unterschiedlichen Versuchsdurchläufen

Testansätze mit den Verdünnern	Gentamicin-Endkonzentration in den Versuchsdurchläufen (in mg/l)				
	1	2	3	4	5
VD 1	0	0	0	0	0
VD 2	16,3	16,5	15,2	15,0	15,5
VD 3	81,7	82,6	76,2	75,0	77,4
VD 4	162,4	165,2	152,4	150,0	154,8

## 4.2 Untersuchungsergebnisse der Testansätze zum Zeitpunkt 0

Die Ergebnisse beruhen auf den Messungen, die unmittelbar nach dem Vermischen der Komponenten erhoben wurden: *ECH*-Suspension, VD 1 – VD 4 und Spermien aus der spermareichen Fraktion. Im Anschluss erfolgte die Kühlung und Lagerung bei 4 °C im Kühlschrank.

## 4.2.1 Mittels CASA erhobene Untersuchungsergebnisse

### 4.2.1.1 Motilität

Die gemessene und damit als Referenzwert angenommenen durchschnittliche Motilität der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen zum Zeitpunkt 0 lag im Durchschnitt bei  $81 \pm 2,4 \%$  ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe). Die Einzelwerte für die durchschnittliche CASA-ermittelte Motilität für die unterschiedlichen BK und VD 1- VD 4 sind in nachfolgender Tab. 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Prozentsatz der CASA-gemessenen Gesamtmotilität (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung aus einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) am Tag 0; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene ECH

Testansatz	Mittelwert ( $\bar{x}$ in %)	Standardabweichung (SD %)
VD 1 BK 0	78,6	13,8
VD 2 BK 0	83,0	4,4
VD 3 BK 0	81,9	5,3
VD 4 BK 0	78,0	11,1
VD 1 BK 1	83,7	5,6
VD 2 BK 1	79,3	10,7
VD 3 BK 1	83,2	7,8
VD 4 BK 1	80,5	5,8
VD 1 BK 2	80,8	8,8
VD 2 BK 2	80,2	8,6
VD 3 BK 2	83,0	8,3
VD 4 BK 2	76,2	13,4

#### 4.2.1.2 Vorwärtsbeweglichkeit

Die durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in den 12 Testansätzen bei den 5 Versuchsdurchläufen, die zum Zeitpunkt 0 ermittelt wurde, lag bei  $73,2 \pm 2,6 \%$  ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe). Die arithmetischen Mittelwerte für die durchschnittliche, CASA-ermittelte Vorwärtsbeweglichkeit für die unterschiedlichen BK und VD 1 – VD 4 können der Tab. 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Prozentsatz der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung aus einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

Testansatz	Mittelwert ( $\bar{x}$ in %)	Standardabweichung (SD %)
VD 1 BK 0	72,2	15,3
VD 2 BK 0	76,4	6,2
VD 3 BK 0	75,0	6,4
VD 4 BK 0	71,7	10,0
VD 1 BK 1	76,3	8,0
VD 2 BK 1	71,5	11,3
VD 3 BK 1	75,6	8,8
VD 4 BK 1	70,1	9,0
VD 1 BK 2	74,6	9,7
VD 2 BK 2	72,9	10,1
VD 3 BK 2	74,3	11,4
VD 4 BK 2	68,2	13,4

### **4.2.1.3 Andere CASA-ermittelte Parameter**

Im Folgenden werden die arithmetischen Mittelwerte der übrigen CASA-ermittelten Motilitätsparameter der Spermien in 12 Testansätzen bei den 5 Versuchsdurchläufen zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Die ausführliche Tab. 16 aller Daten (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN und WOB) pro Testansatz ist im Anhang 9.2 zu finden.

Für die Werte der Streckenparameter konnten im arithmetischen Mittel ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe) folgende Werte gemessen werden: DAP:  $42,1 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ; DCL:  $67,46 \pm 1,3 \mu\text{m}$  und DSL  $34,62 \pm 2,26 \mu\text{m}$ . Die Berechnung der arithmetischen Mittelwerte der Geschwindigkeitsparameter ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe) ergab für VAP  $99,04 \pm 5,44 \mu\text{m/s}$ ; für VCL:  $158,12 \pm 3,42 \mu\text{m/s}$  und für VSL  $81,64 \pm 5,56 \mu\text{m/s}$ . Die übrigen Parameter stellten sich wie folgt dar: STR  $0,82 \pm 0,01$ ; LIN  $0,51 \pm 0,03$ ; WOB  $0,62 \pm 0,03$ ; ALH  $56,37 \pm 1,43 \mu\text{m}$  und BCF  $24,26 \pm 0,51 \text{ Hz}$  ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe).

### **4.2.2 Untersuchungsergebnisse des Eosin-Ausstrichs**

Die Anzahl der weißen und damit als lebend gezählten Spermien in 12 Testansätzen bei 5 Versuchsdurchläufen, die zum Zeitpunkt 0 in dem Eosin-Ausstrich ausgezählt wurden, lag im arithmetischen Mittel über alle Testansätze ( $n = 60$ , Einfachmessungen) bei  $75,1 \pm 3,2 \%$ . Die Einzelwerte für die durchschnittlichen, als lebend gezählten Spermien aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen BK und VD 1 – VD 4 können der Tab. 15 entnommen werden.

Tabelle 15: Prozentsatz an im Eosin-Ausstrich als lebend gezählte Spermien (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe, n = 5, Einfachmessung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

Testansatz	Mittelwert ( $\bar{x}$ in %)	Standardabweichung (SD %)
VD 1 BK 0	78,7	14,1
VD 2 BK 0	78,8	10,2
VD 3 BK 0	75,5	12,2
VD 4 BK 0	71,5	12,7
VD 1 BK 1	73,0	18,3
VD 2 BK 1	75,4	9,3
VD 3 BK 1	69,9	13,1
VD 4 BK 1	75,7	13,9
VD 1 BK 2	71,9	14,9
VD 2 BK 2	75,7	15,9
VD 3 BK 2	80,5	10,8
VD 4 BK 2	74,9	16,1

#### 4.2.3 Untersuchungsergebnisse der Spermac®-Färbung

Für die Untersuchung der Spermien in den Testansätzen auf morphologische Veränderungen der Zellen selbst oder deren Kappen wurde unmittelbar nach dem Herstellen der einzelnen Testansätze jeweils ein Objektträger mit Spermac® gefärbt. Das Ergebnis dient als Referenz zum Zeitpunkt 0.

#### 4.2.3.1 Pathomorphologie und Kappenveränderungen

Bei der Analyse der Objektträger wurde der Fokus auf folgende Veränderungen gelegt: Abgelöste Kopfkappen, schiefe Kopfkappen, deformierte Kopfkappen, Spermienhalsveränderungen, Geißelveränderungen, abgelöste Köpfe und Plasmotropfen.

Die folgenden Diagramme (Abb. 4) zeigen die mittleren Werte der genannten Parameter, bezogen auf die unterschiedlichen VD beziehungsweise BK.

Die genauen Werte und deren Standardabweichung sind in Tabelle. 14 im Anhang 9.2 zusammengefasst.

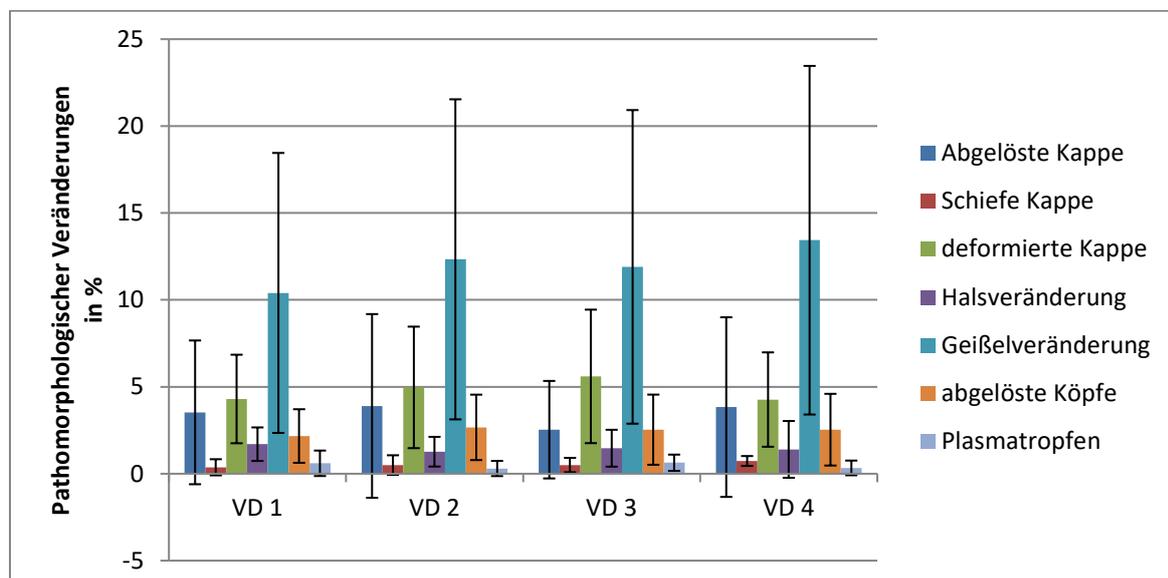


Abbildung 4: Prozentsatz pathomorphologischer Veränderungen (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK,  $n = 15$ , Einfachmessung einer Probe) in der Spermac® Färbung bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0. Dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

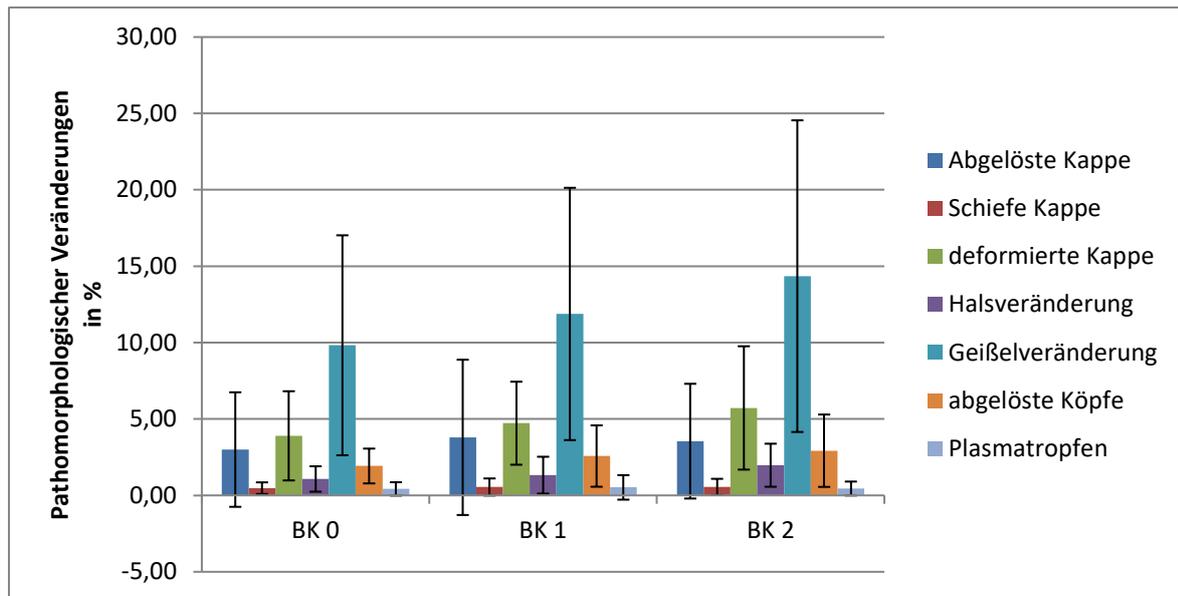


Abbildung 5: Prozentsatz pathomorphologischer Veränderungen (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 VD,  $n = 20$ , Einfachmessung einer Probe) in der Spermac® Färbung bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0. Dabei enthält BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene ECH.

#### 4.2.4 Untersuchungsergebnisse des hypoosmotischen Schwelltests

Die Ergebnisse des HOS-Tests, welche ebenfalls direkt nach der Herstellung der Testansätze zum Zeitpunkt 0 erhoben wurden, sind im nachfolgenden Diagramm dargestellt. Hier ist eine relativ hohe Standardabweichung aufgrund der unterschiedlichen Ausgangsqualität der Ejakulate zu festzustellen.

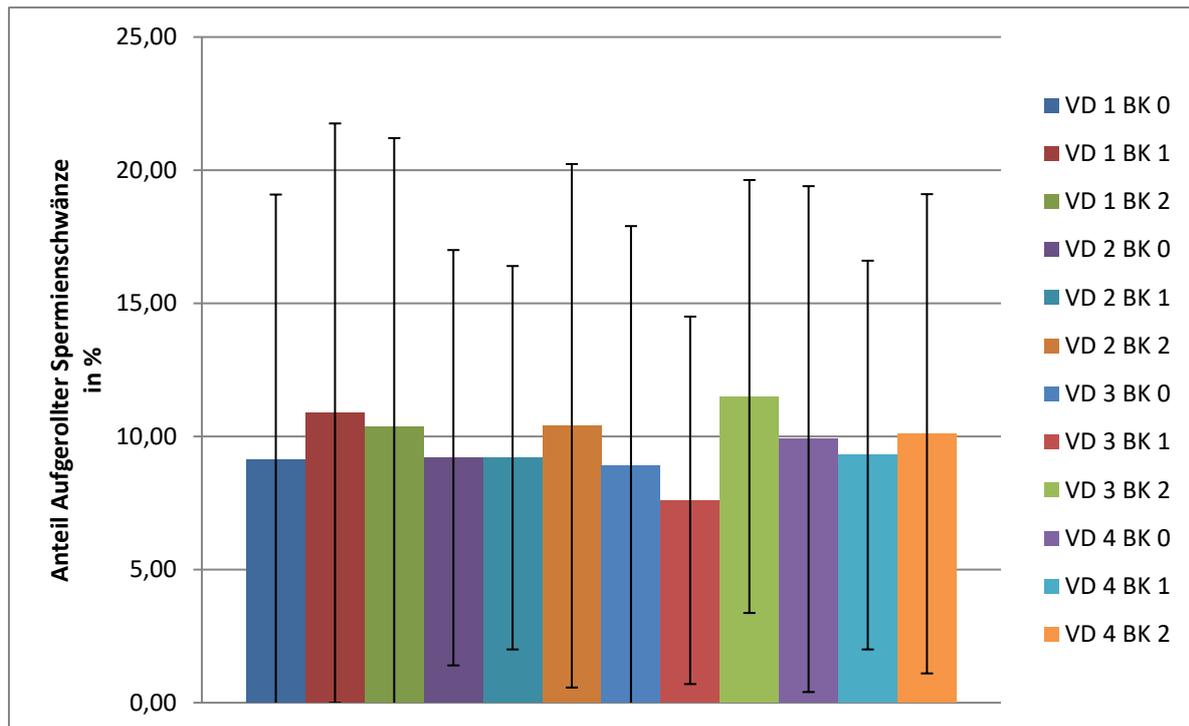


Abbildung 6: Prozentsatz nicht aufgerollter Spermischwänze im HOS-Test (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe, n = 5, Einfachmessung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene ECH.

### 4.3 Untersuchungsergebnisse der Testansätze im Zeitverlauf

In diesem Kapitel werden die über drei Tage erhobenen Untersuchungsergebnisse der Testansätze aus Spermien, ECH-Suspension (0, 500 oder  $5 \times 10^5$  KBE/ml) und Verdünner (VD1 bis VD4) dargestellt. Es wurden nach 24, 48 und 72 h dieselben Parameter bei gleicher Vorgehensweise untersucht, wie für den Zeitpunkt 0.

### 4.3.1 Mittels CASA erhobene Untersuchungsergebnisse

#### 4.3.1.1 Motilität

In der Abbildung 7 wird der vom CASA gemessene Prozentsatz motiler Spermien (Gesamtmotilität) im Zeitverlauf über drei Tage graphisch verdeutlicht. Berücksichtigt werden sowohl die verschiedenen VD als auch die unterschiedlichen *ECH*-Konzentrationen.

Am Tag 0 konnte kein Unterschied in der Motilität festgestellt werden. Wie im Liniendiagramm erkennbar ist, zeigten die Spermien in allen Testansätzen über die Zeit eine signifikante Abnahme der Gesamtbeweglichkeit ( $p_{\text{Tag}} < 0,0001$ ). Die durchschnittliche Motilität der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen betrug am Tag 0:  $81 \pm 2,4 \%$  und sank bis auf  $47,0 \pm 23,4 \%$  ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe) am Tag 3. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die durchschnittliche Motilität der mit dem VD 4 versetzten Testansätze schon ab Tag 1 der Untersuchung deutlich unter den arithmetischen Mittelwerten der übrigen VD lag. An Tag 2 und 3 vergrößerte sich der Niveauunterschied zwischen den einzelnen VD weiter, sodass die mit VD 4 versetzten Testansätze am Tag 3 nur noch eine Gesamtmotilität von  $8,0 \pm 9,7 \%$  bei BK 0,  $7,4 \pm 9,6 \%$  bei BK 1 und  $12,9 \pm 9,6 \%$  bei hoher BK 2 ( $n = 5$ , 8-fach Messung aus einer Probe) erreichten. Der Durchschnitt der übrigen Testansätze (VD 1 – 3, BK 0 – 2) lag in den 5 Versuchsdurchläufen hingegen bei  $59,5 \pm 6,7 \%$  ( $n = 45$ , 8-fach Messung aus einer Probe) Gesamtmotilität.

Neben dem erwähnten Zeiteffekt konnte damit auch ein VD-Effekt nachgewiesen werden ( $p_{\text{VD}} = 0,0004$ ). Die Beweglichkeit fällt im VD 4 deutlich schneller ab als in den übrigen VD. Ein signifikanter Unterschied in den Zeitverläufen ( $p_{\text{TV}} < 0,0001$ ) bestätigt diese Beobachtung.

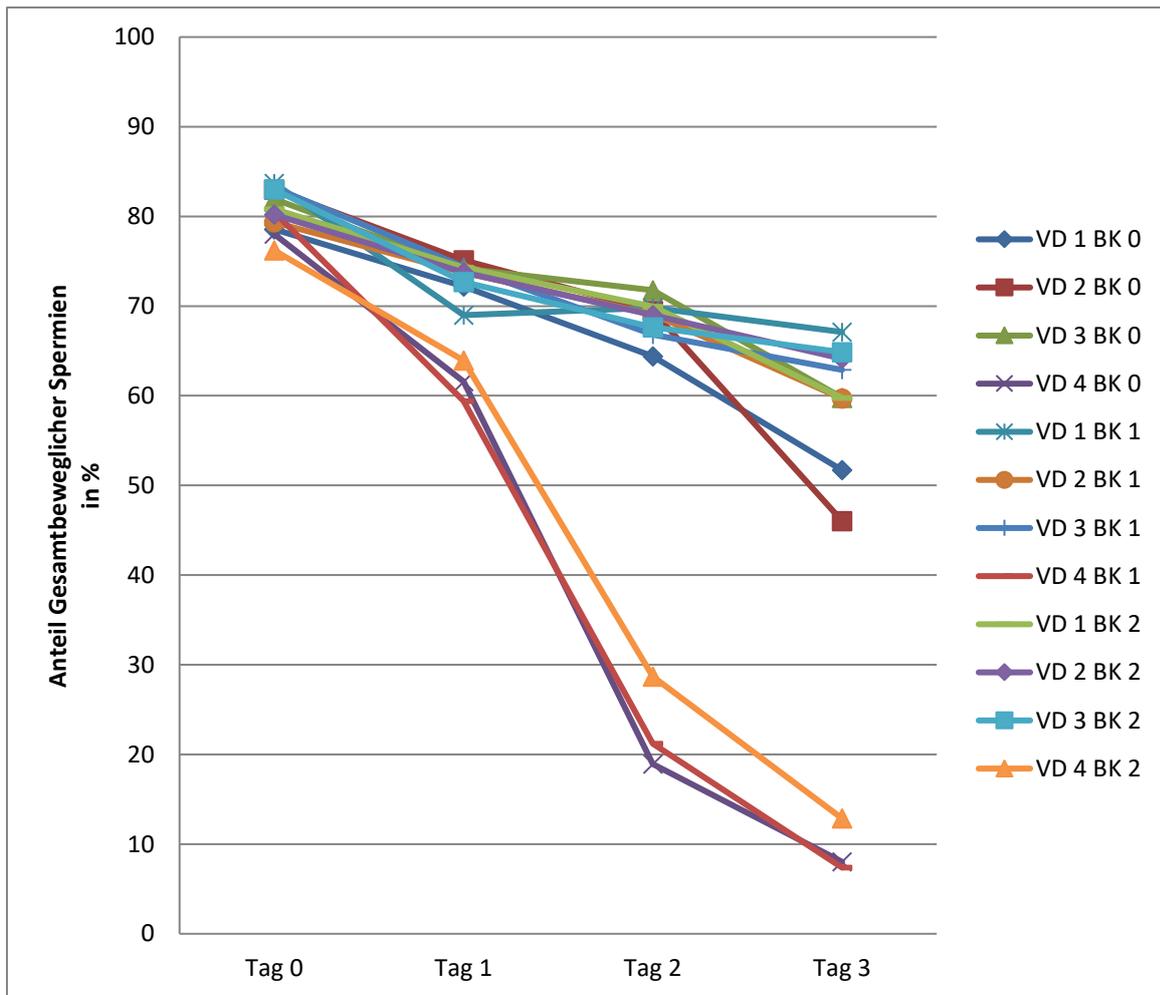


Abbildung 7: Ergebnisse der CASA-gemessenen Gesamtmotilität (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

Ein Effekt der unterschiedlichen BK konnte, wie auch im Graphen der Abbildung 8 zu sehen ist, nicht nachgewiesen werden. Ebenso zeigten die Varianzanalysen der Faktoren Tag und BK, als auch die Kombination VD und BK keinen signifikanten Einfluss.

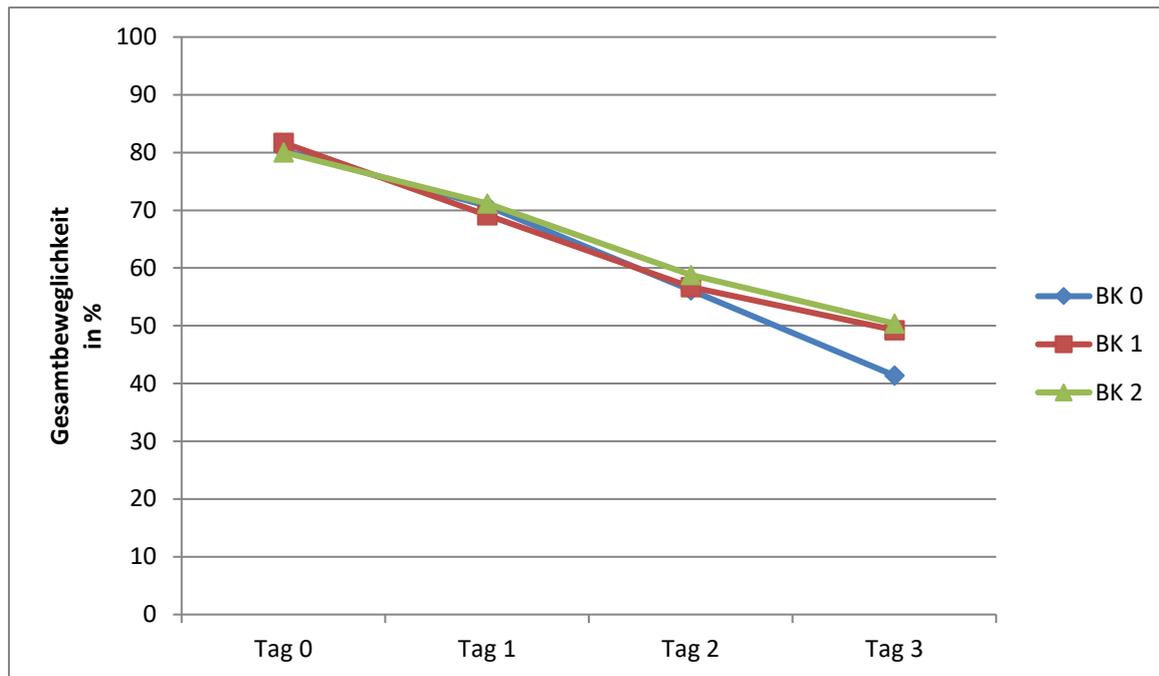


Abbildung 8: Ergebnisse der CASA-gemessenen Gesamtmotilität (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 VD,  $n = 20$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) im Zeitverlauf; dabei enthält BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

#### 4.3.1.2 Vorwärtsbeweglichkeit

In diesem Abschnitt und in den Abbildung 9 und 10 wird der Prozentsatz der mittels CASA gemessenen Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in den Testansätzen dargestellt. Berücksichtigt wurden die verschiedenen VD 1 – VD 4, die unterschiedlichen *ECH*-Suspensionen und die Lagerungsdauer (24, 48 oder 72 h).

Die Ausgangswerte der Testansätze lagen am Tag 0 sehr dicht beisammen. Wie im Liniendiagramm erkennbar ist, zeigten sich in allen Testansätzen im Verlauf der 3 Tage eine signifikante Abnahme der Progressivmotilität ( $p_{\text{Tag}} < 0,0001$ ). Die durchschnittliche Vorwärtsbeweglichkeit der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen betrug am Tag 0:  $73,2 \pm 2,6$  %. Am Tag 3 fiel sie auf  $38,4 \pm 22,1$  % ( $n = 60$ , 8-fach Messung aus einer Probe). Wie bei der Gesamtbeweglichkeit lässt sich auch bei der Vorwärtsbeweglichkeit bereits am Tag 1 ein ungleicher Abfall der Werte erkennen. Die Werte der mit VD 4 versetzten Testansätze lagen deutlich unter den arithmetischen Mittelwerten der übrigen VD. An Tag 2 und 3 steigerte sich der Niveau-Unterschied zwischen den einzelnen VD

noch weiter, sodass an Tag 3 bei den mit VD 4 versetzten Testansätzen nur noch eine Vorwärtsbeweglichkeit von  $2,9 \pm 5,3$  % bei keiner *ECH*-Zugabe,  $2,0 \pm 1,7$  % bei geringer *ECH*-Zugabe und  $4,3 \pm 5,3$  % hoher *ECH*-Zugabe ( $n = 5$ , 8-fach Messung aus einer Probe) erreicht wurde. Der Durchschnitt der übrigen Testansätze (VD 1 – 3, BK 0 – 2) lag in den 5 Versuchsdurchläufen hingegen bei  $50,2 \pm 7,0$  % ( $n = 45$ , 8-fach Messung aus einer Probe) vorwärtsbewegliche Spermien. Neben dem erwähnten Zeiteffekt konnte auch ein VD-Effekt nachgewiesen werden ( $p_{VD} = 0,0004$ ). Des Weiteren bestand eine signifikante Interaktion zwischen Zeit und Verdünner ( $p_{TV} < 0,0001$ ).

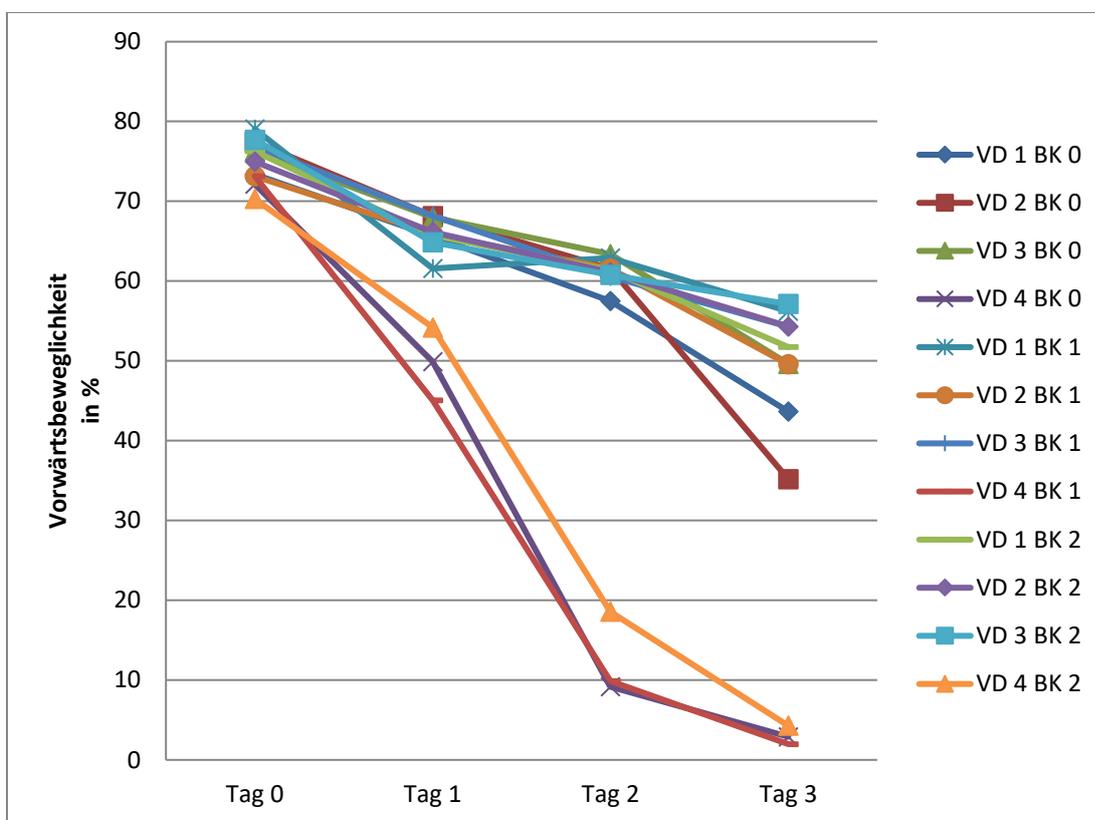


Abbildung 9: Ergebnisse der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

Analog zu der Motilität ließ sich auch bei der Vorwärtsbeweglichkeit kein Effekt der unterschiedlichen BK erkennen (Abb. 10). Ebenso zeigten die Varianzanalysen der Faktoren Tag und *ECH* als auch die Kombination VD und *ECH* keinen statistisch signifikanten Unterschied.

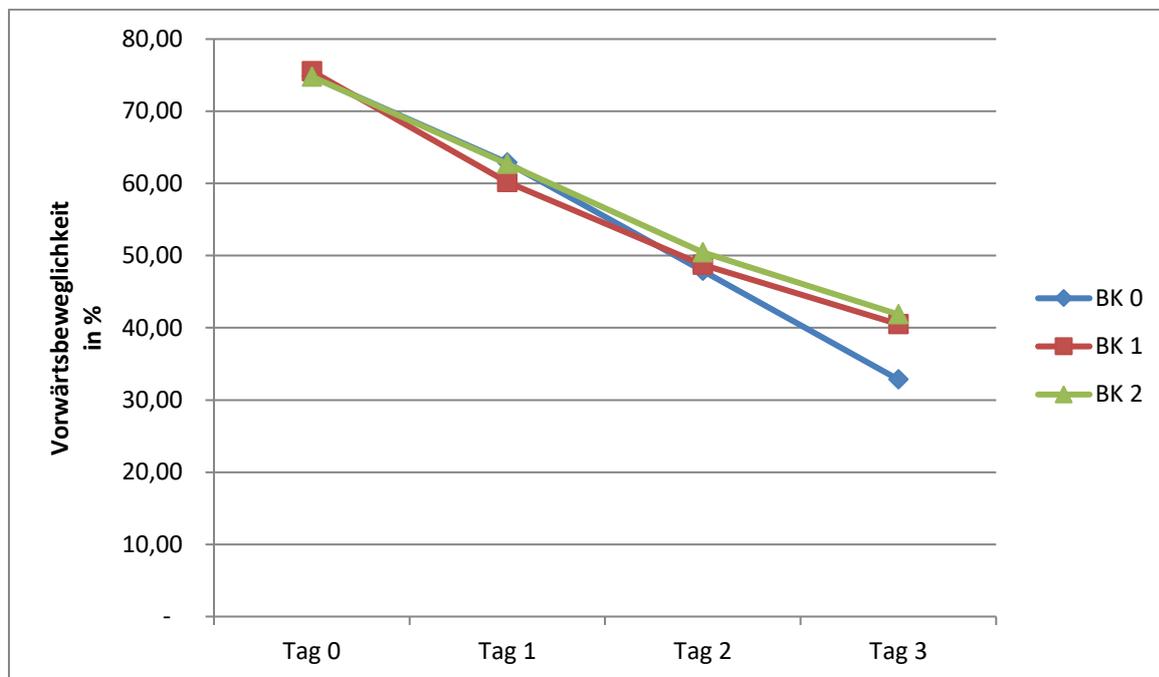


Abbildung 10: Ergebnisse der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 VD,  $n = 20$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) im Zeitverlauf; dabei enthält BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

#### 4.3.1.3 Andere CASA-ermittelte Parameter

Die Messergebnisse der restlichen Parameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH und BCF), die durch den CASA für die verschiedenen VD und unterschiedlichen *ECH* Zusätze nach Lagerung bei 4 °C über 3 Tage bestimmt wurden, sind in der folgenden Tab. 16 im Anhang (9.2) zusammengefasst.

Die Auswertung der Streckenparameter (DAP, DCL und DSL) ergab in allen Testansätzen eine Abnahme der arithmetischen Mittelwerte bis hin zum Tag 3. Weiterhin ist ein Unterschied zwischen den einzelnen VD zu sehen. Die Testansätze, die mit VD 4 versetzt wurden, legten im Schnitt eine kürzere Strecke zurück. Analog zu der Gesamtbeweglich-

keit und Vorwärtsbeweglichkeit wurden auch hier stärkere Abnahmen bei VD 4 über den Zeitraum hinweg und damit eine Zweifach-Wechselwirkung (Zeit und Gentamicinkonzentration) beobachtet. Die übrigen Testansätze verhielten sich untereinander sehr ähnlich und wiesen im arithmetischen Mittel eine geringere Reduktion der Streckenparameter auf.

Die beschriebene Abnahme der arithmetischen Mittelwerte der Parameter DAP, DCL und DSL im Zeitverlauf während des Versuchsdurchlaufs war signifikant ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0001$  bis  $0,0002$ ). In den Testansätzen mit VD 4 konnte ebenfalls bei allen drei Streckenparametern ein signifikanter Unterschied zu den anderen Gentamicinkonzentrationen nachgewiesen werden (DAP:  $p_{\text{VD}} = 0,0014$ ; DCL:  $p_{\text{VD}} = 0,0007$  und DSL:  $p_{\text{VD}} = 0,0027$ ). Ebenso große signifikante Unterschiede konnten für die Zweifach-Wechselwirkung zwischen Zeit und VD errechnet werden (DAP:  $p_{\text{TV}} < 0,0001$ ; DCL:  $p_{\text{TV}} < 0,0001$  und DSL:  $p_{\text{TV}} 0,017$ ). Ein alleiniger Einfluss der zugegebenen BK konnte statistisch nicht belegt werden. Jedoch ergab die Varianzanalyse für die Parameter DAP ( $p_{\text{TB}} = 0,0075$ ) DCL ( $p_{\text{TB}} = 0,0007$ ) und DSL ( $p_{\text{TB}} = 0,011$ ) signifikante Unterschiede bezüglich der Wechselwirkungen zwischen den Tagen und den BK. Weiterhin erwies sich für den Parameter DCL die Wechselwirkung zwischen den VD und der BK als signifikant ( $p_{\text{BV}} = 0,026$ ). Stellvertretend für die drei Streckenparameter sind im Folgenden die für den Parameter DCL als signifikant errechneten Einflussfaktoren graphisch dargestellt.

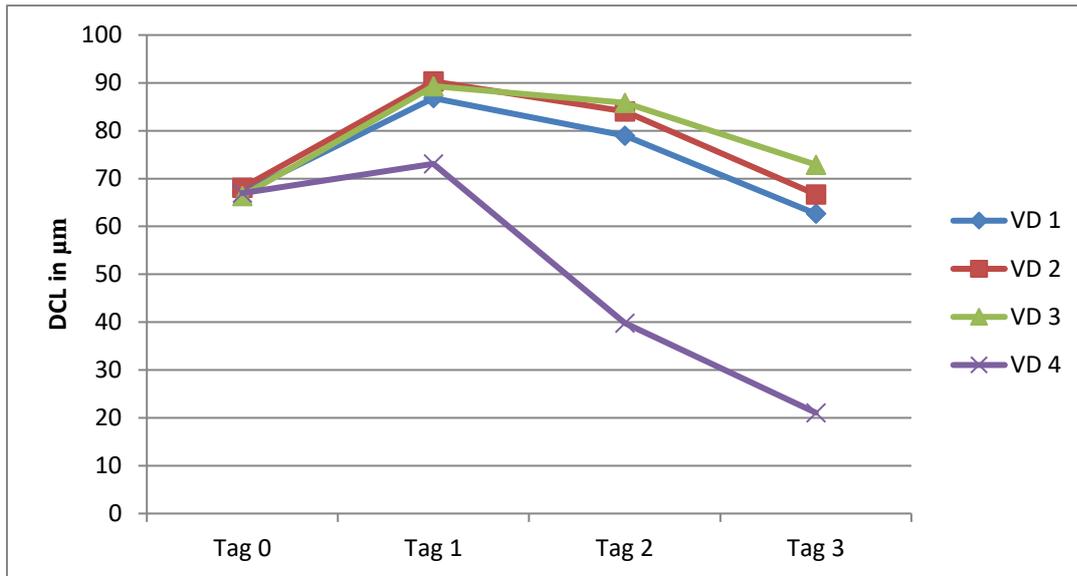


Abbildung 11: Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in  $\mu\text{m}$ ) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK,  $n = 15$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

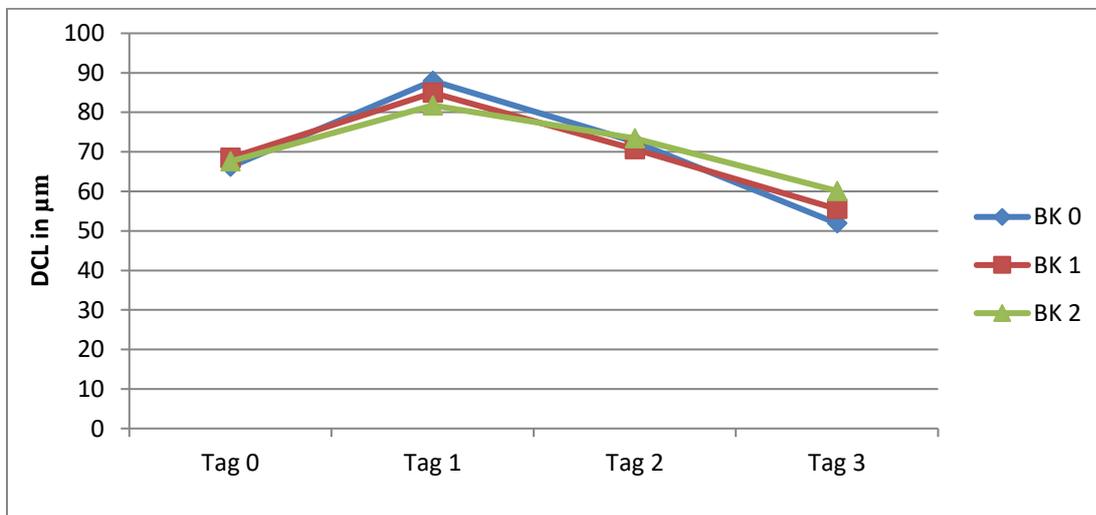


Abbildung 12: Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in  $\mu\text{m}$ ) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 VD,  $n = 20$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) im Zeitverlauf; dabei enthält BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

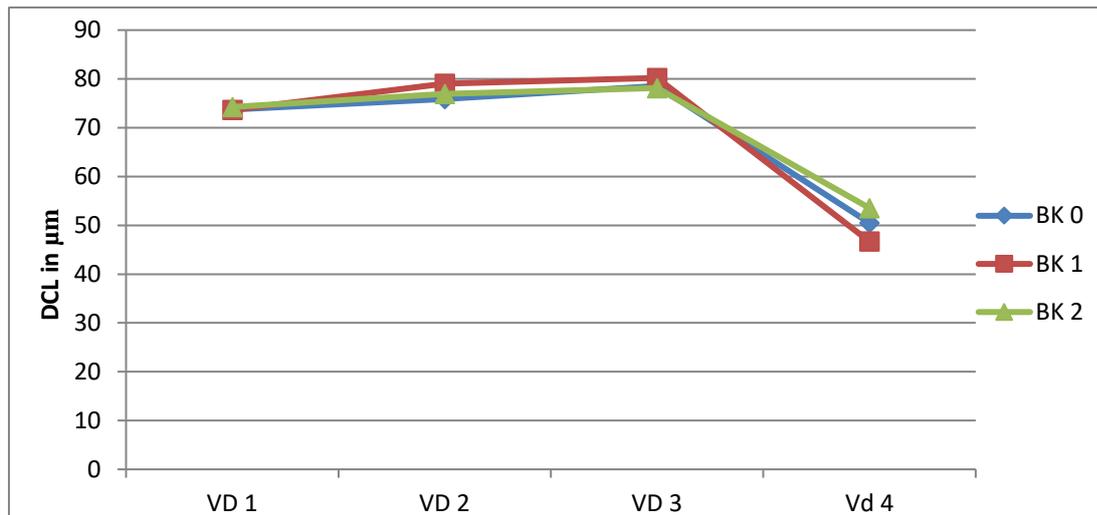


Abbildung 13: Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in  $\mu\text{m}$ ) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 Untersuchungszeitpunkte,  $n = 20$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdüner (VD); dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

Die Auswertung der Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL und VSL) ergab über den Untersuchungszeitraum eine Reduktion der arithmetischen Mittelwerte in allen Testansätzen. Auch hier ist ein Unterschied zwischen den verwendeten VD feststellbar. Bei den Testansätzen, die mit VD 4 versetzt wurden, wurde im arithmetischen Mittel eine geringere Geschwindigkeit gemessen als bei den übrigen VD. In Anbetracht des Zeitverlaufs konnte zusätzlich zu diesem VD-Effekt eine Wechselwirkung zwischen Zeit und VD beobachtet werden. Die Spermien in VD 4 verloren über die drei Tage stärker an Geschwindigkeit. Die übrigen Testansätze verhielten sich hingegen untereinander sehr ähnlich und wiesen im arithmetischen Mittel eine geringere Reduktion der VAP-, VCL- und VSL-Werte auf.

Die beschriebene Abnahme der arithmetischen Mittelwerte der Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL im Zeitverlauf erwies sich als hoch signifikant ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0001$  bis  $0,0002$ ). Auch bei der Varianzanalyse der verschiedenen VD zeichnete sich eine Signifikanz für alle 3 Parameter ab ( $p_{\text{VD}} = 0,0017$ ;  $0,0030$  und  $0,0017$ ). Des Weiteren ergaben sich für die Parameter VAP, VCL und VSL signifikant unterschiedliche Werte durch eine

Wechselwirkung zwischen der Zeit und dem VD ( $p_{TV} < 0,0001$ ;  $< 0,0001$  und  $0,035$ ). Ein alleiniger Einfluss der zugegebenen BK konnte statistisch nicht belegt werden. Jedoch ergaben sich auch hier für die Parameter VAP ( $p_{TB} = 0,015$ ) VCL ( $p_{TB} = 0,001$ ) und VSL ( $p_{TB} = 0,015$ ) signifikante Unterschiede durch eine Wechselwirkung zwischen den Tagen und den BK. Für den Parameter VCL konnte zusätzlich noch eine Wechselwirkung zwischen den VD und der BK als signifikant ( $p_{BV} = 0,015$ ) ermittelt werden. Sowohl VAP als auch VSL lagen in Hinblick auf diese Wechselwirkung oberhalb des als signifikant definierten Bereichs ( $p_{BV} = 0,068$ ;  $0,097$ ). Auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse wird aufgrund der Ähnlichkeit zu den Resultaten der Streckenparameter verzichtet.

Bei Betrachtung des Parameters STR konnte bei den unterschiedlichen Testansätzen eine tendenzielle Abnahme der Werte im Zeitverlauf festgestellt werden. Dabei ist, wie auch in Abb. 14 zu sehen, insbesondere der Abfall in den ersten 24 h markant, während die Werte über die folgenden Tage das erreichte Niveau dann annähernd beibehalten.

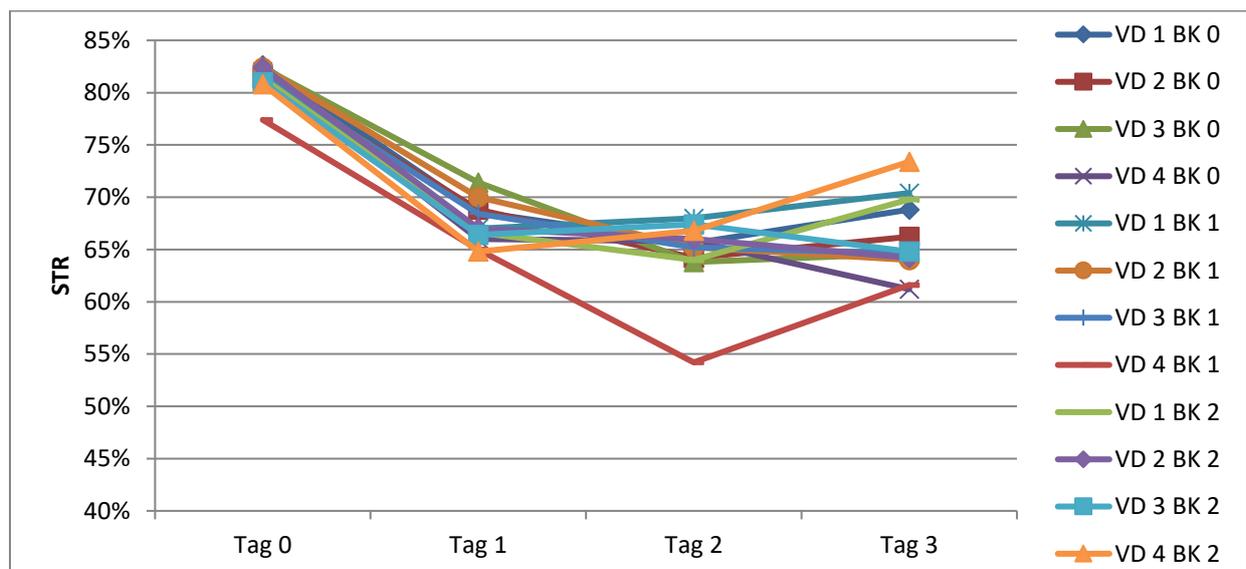


Abbildung 14: Ergebnisse des Bewegungsparameters STR (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

Der Einfluss des Faktors Zeit war signifikant ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0007$ ). Die übrigen Faktoren: VD, BK und die Wechselwirkung aus diesen beiden Parametern hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Geradlinigkeit (STR).

Ein Abfall der Werte in den ersten 24 h konnte auch für den Motilitätsparameter LIN beobachtet werden. Während die am Tag 1 erreichten LIN-Werte der Testansätze mit den Verdünnern VD 2, 3 und 4 an den Folgetagen nur noch gering variierten, war bei VD 1 wieder ein Anstieg der Werte bis hin zum Tag 3 zu beobachten. Zur Veranschaulichung dient die nachstehende Abbildung 15. Die Varianzanalyse bestätigte diese Beobachtungen und ergab für den Faktor Zeit eine hohe Signifikanz ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0001$ ). Daneben konnte auch eine Wechselwirkung zwischen Tag und VD herausgestellt werden ( $p_{\text{TV}} = 0,025$ ). Die übrigen analysierten Parameter zeigten keinen signifikanten Einfluss.

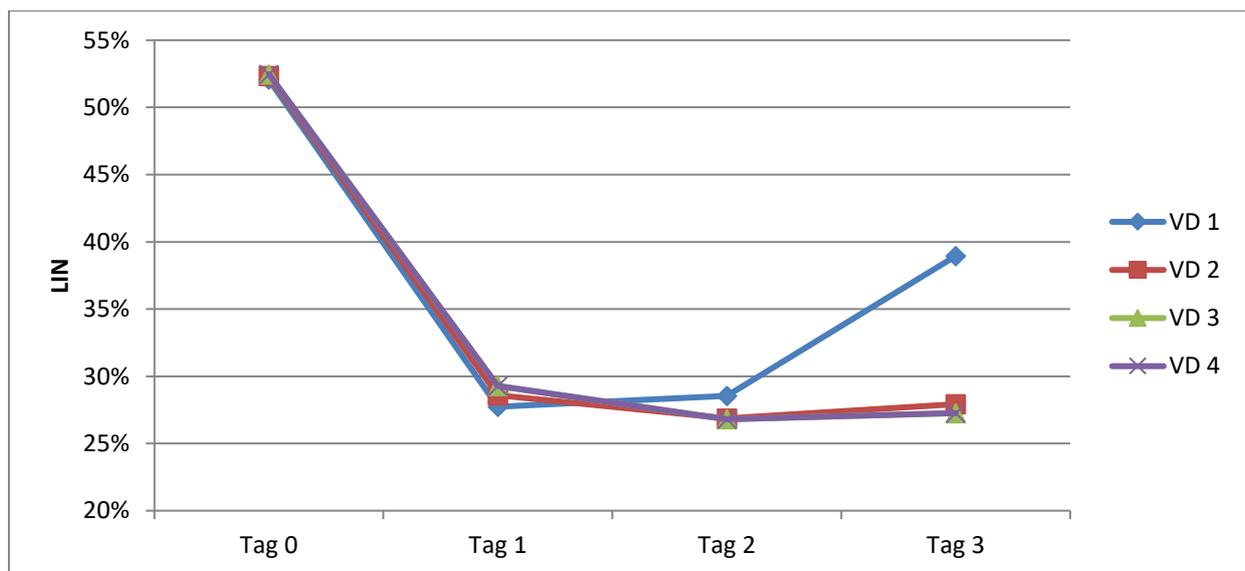


Abbildung 15: Ergebnisse des Bewegungsparameters LIN (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK,  $n = 15$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

Ähnliche Ergebnisse konnten für die Werte des Parameter WOB ermittelt werden. Nach einem Abfall der Messergebnisse aller Testansätze innerhalb der ersten 24 h kam es im

weiteren Zeitverlauf bei den Testansätzen mit VD 2 und 3 im Mittel nur noch zu einem geringen Wiederanstieg. Die Werte der VD 1 bzw. VD 4 stiegen hingegen zu Tag 3 hin wieder an. Der Verlauf ist in Abbildung 16 graphisch dargestellt.

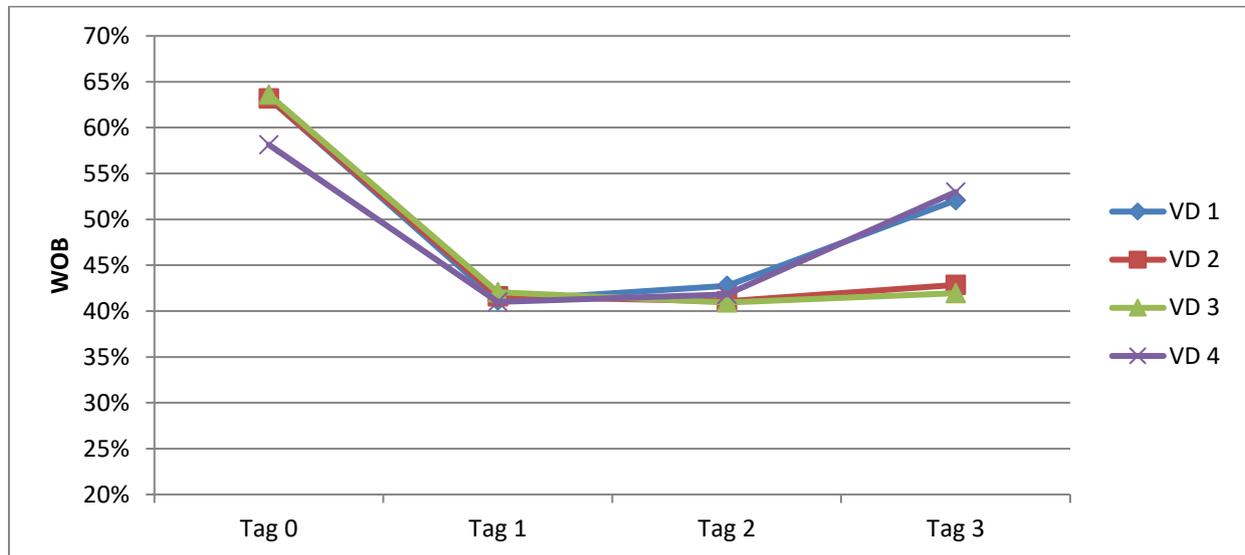


Abbildung 16: Ergebnisse des Bewegungsparameters WOB (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK, n = 15, 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

In der statistischen Auswertung der WOB-Messungen war für den Faktor Zeit eine Signifikanz ( $p_{\text{Zeit}} < 0,0001$ ) nachweisbar. Daneben konnte auch eine signifikante Wechselwirkung zwischen Tag und VD ermittelt werden ( $p_{\text{TV}} = 0,016$ ). Die Analyse der übrigen Parameter ergab keine signifikanten Einflüsse.

Auch für den Motilitätsparameter ALH konnten im Verlauf der drei Tage Unterschiede in Abhängigkeit zum verwendeten VD festgestellt werden. Generell fand ein Anstieg der Werte in den ersten 24 h statt, dem im übrigen Zeitverlauf ein Abfall folgte. Dabei stiegen die arithmetischen Mittelwerte in den Testansätzen mit VD 1, 2 und 3 stärker an als im Ansatz mit VD 4. Die daraufhin einsetzende Abnahme der ALH bis hin zum Tag 3 war für die Testansätze mit VD 1, 2 und 3 deutlich flacher und die Werte blieben oberhalb der Ausgangsniveaus. Der ALH-Wert im Testansatz mit VD 4 sank hingegen stärker ab und erreichte im übrigen Zeitverlauf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus (Abb. 17).

In den Testansätzen waren die ALH-Unterschiede im Zeitverlauf signifikant ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0013$ ). Weiterhin erwies sich der zwischen den unterschiedlichen VD beschriebene Unterschied als signifikant ( $p_{\text{VD}} = 0,001$ ). Ebenfalls statistisch belegt werden konnte die Wechselwirkung aus Zeit und VD ( $p_{\text{TV}} < 0,0001$ ).

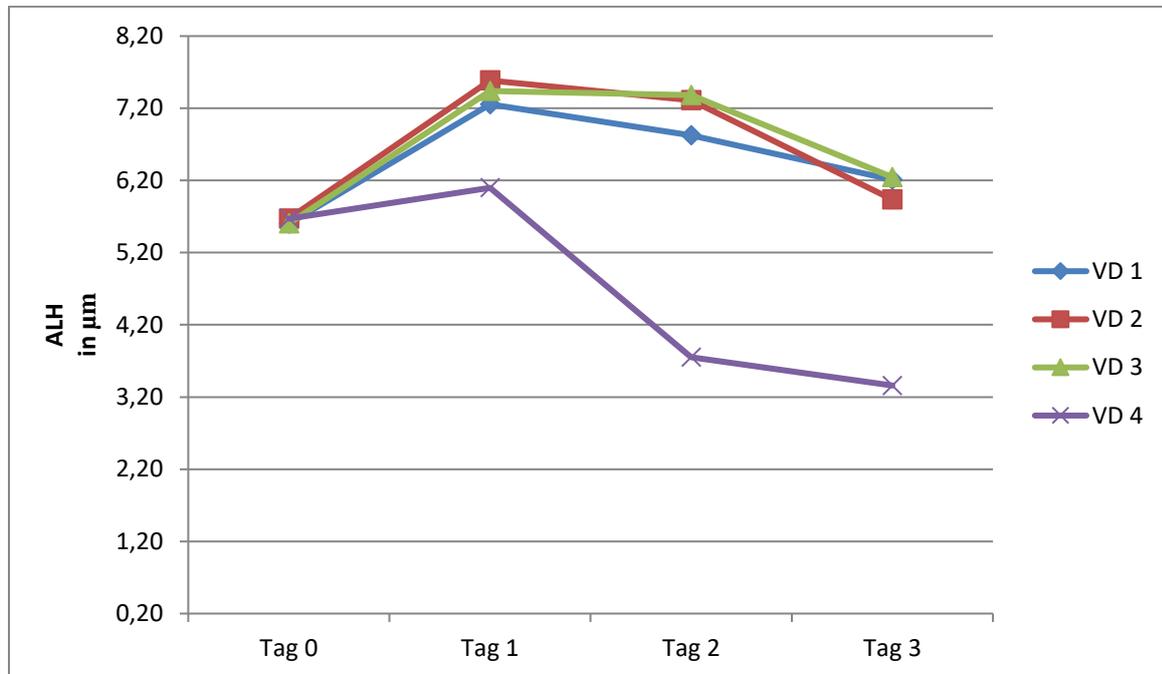


Abbildung 17: Ergebnisse des Bewegungsparameters ALH (in  $\mu\text{m}$ ) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK,  $n = 15$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

BCF zeigte ebenfalls eine tendenzielle Abnahme der arithmetischen Mittelwerte aller Versuchsansätze im Zeitverlauf. Wie in Abbildung 18 zu erkennen, lagen am Tag 0 alle Werte eng beisammen. Die Variabilität der Werte stieg jedoch bis zum Tag 3 hin an, ohne dass ein Zusammenhang zu VD und BK nachweisbar war. Im Zeitverlauf ließ sich für die Testansätze eine signifikante Abnahme der Werte ermitteln ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0021$ ). Die übrigen Variablen und deren Wechselwirkungen blieben ohne Signifikanz und hatten somit wahrscheinlich keinen Einfluss auf die BCF.

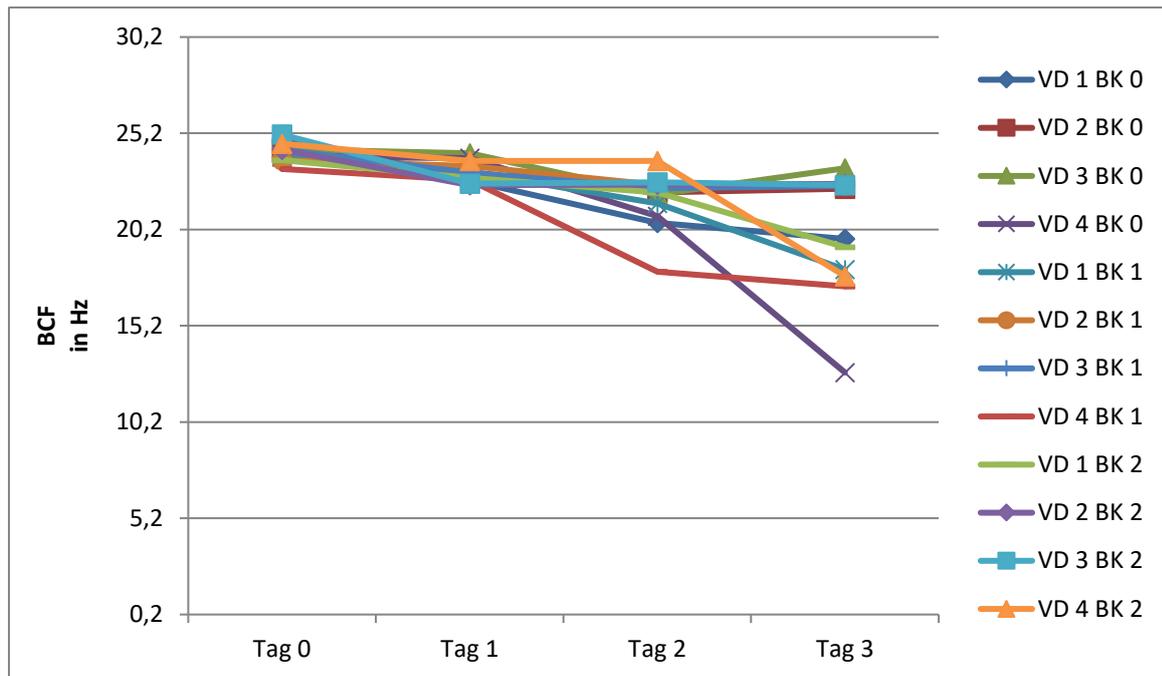


Abbildung 18: Ergebnisse des Bewegungsparameters BCF (in Hz) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

#### 4.3.2 Untersuchungsergebnisse des Eosin-Ausstrichs

Die Spermienviabilität der Testansätze wurde mithilfe des Eosin-Ausstrichs untersucht. Wie bei der Motilitätsanalyse, war auch hier eine konstante, über den Untersuchungszeitraum von 3 Tagen andauernde Abnahme des Anteils lebender Spermien in den Testansätzen festzustellen.

Abbildung 19 zeigt schematisch den prozentualen Anteil der Spermien, die als lebend gewertet wurden. Am Tag 0 der Untersuchung war eine sehr homogene Ausgangslage mit Werten zwischen 70 % und 80 % ungefärbten und damit lebenden Spermien vorzufinden. Ein deutlicher, nahezu linearer Abfall bis zum Tag 3 konnte bei allen Testansätzen festgestellt. Weiterhin lässt sich bereits ab Tag 1, deutlicher noch ab Tag 2 erkennen, dass die Werte der drei Testansätze, die VD 4 enthielten, unter den Werten der übrigen Testansätze lagen und einen stärkeren Abfall aufwiesen.

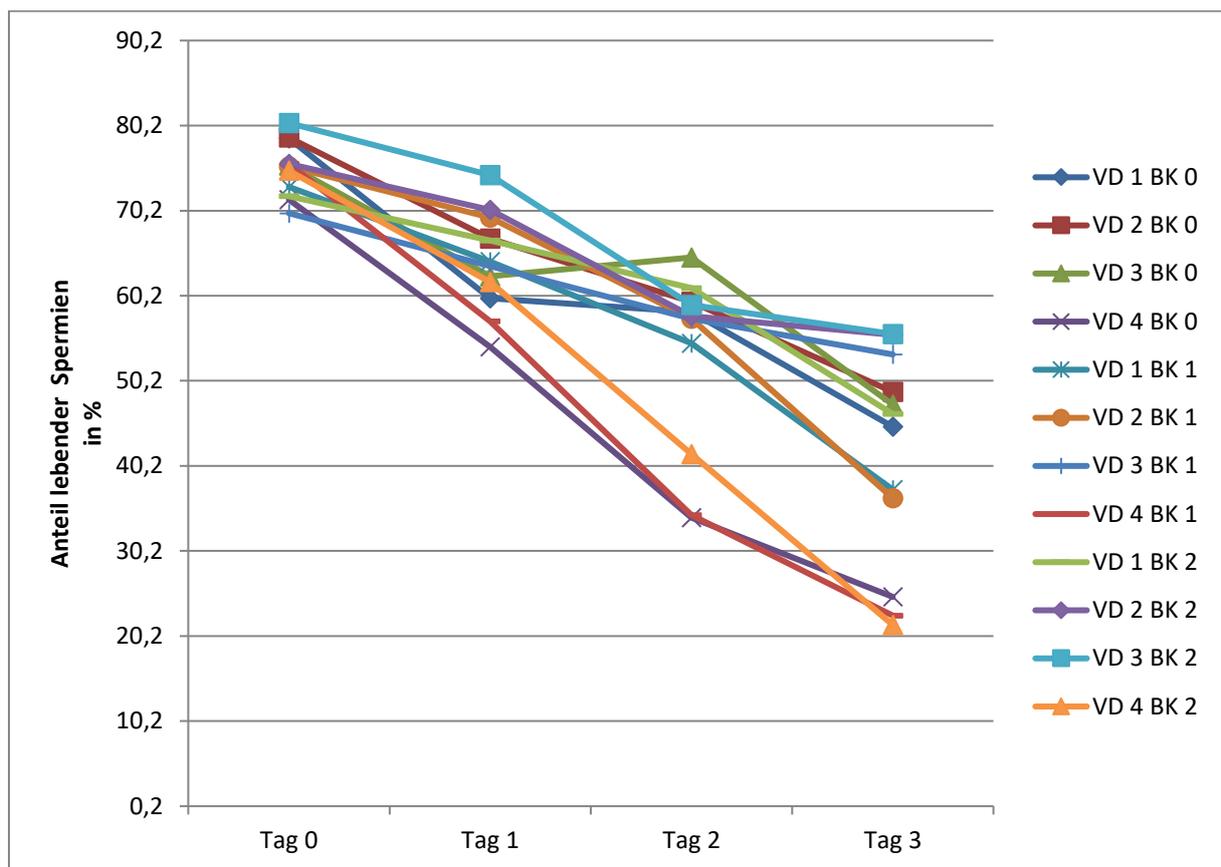


Abbildung 19: Ergebnisse der, nach Eosin-Ausstrich, lebenden Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

Die statistische Varianzanalyse belegt die im Zeitverlauf beschriebene Beobachtung. Es kam zu einer signifikanten Zunahme des prozentualen Anteils der Eosin-gefärbten und damit toten Spermien ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0001$ ). Ebenso konnte ein Einfluss der VD 1 - VD 4 auf den prozentualen Anteil lebender Spermien in den untersuchten Testansätzen nachgewiesen werden ( $p_{\text{VD}} = 0,014$ ). Auch die Zeitabhängigkeit der Messwerte sowie die Wechselwirkung zwischen Zeit und VD, konnten als signifikant bestätigt werden ( $p_{\text{TV}} = 0,035$ ). Ein direkter Einfluss oder eine Wechselwirkung der BK war jedoch statistisch nicht belegbar.

### 4.3.3 Untersuchungsergebnisse der Spermac®-Färbung

Der Einfluss der verschiedenen VD und der verschiedenen BK auf den Anteil morphologisch veränderter Spermien wurde mithilfe der Spermac® Färbung untersucht.

Abbildung 20 zeigt den prozentualen Gesamtanteil der Spermien, die zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt pathologische Veränderungen aufwiesen. Übersichtshalber wurden die arithmetischen Mittelwerte der vier unterschiedlichen VD gebildet. Die Ergebnisse der drei unterschiedlichen BK unterschieden sich zu Beginn der Untersuchung stärker als zu den anderen Zeitpunkten. Es ist ersichtlich, dass über die Zeit der Anteil veränderter Spermien im Mittel aller Testansätze anstieg, auch wenn in einer Einzeldarstellung einzelne Graphen zeitweise geringfügig fallen. Die Testansätze, denen keine *ECH*-Suspension zugegeben wurden waren, wiesen im arithmetischen Mittel stets einen niedrigeren Prozentsatz an pathologisch veränderten Spermien auf als die mit *ECH*-Suspension. Bei dem arithmetischen Mittelwert der Testansätze mit der niedrigen BK 1 war zu Beginn noch ein deutlicher Unterschied zu den Testansätzen mit der BK 0 festzustellen. Ab Tag 2 verliefen die Graphen jedoch sehr ähnlich, auch wenn die Werte der Testansätze mit der BK 1 gering über denjenigen der BK 0 lagen. Die arithmetischen Mittelwerte bei den Testansätzen mit der BK 2 zeigten einen annähernd linearen Anstieg der Werte über die Zeit. Die Messergebnisse lagen dabei stets über denen der anderen Testansätze. Ein Einfluss der unterschiedlichen VD konnte nicht nachgewiesen werden.

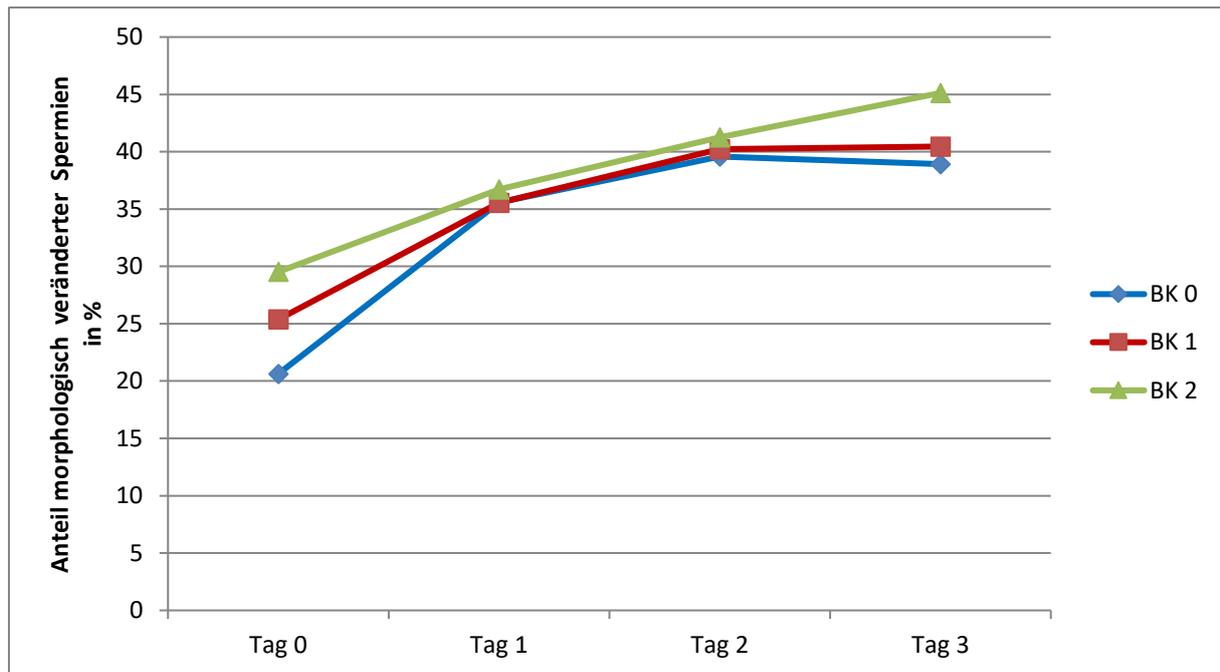


Abbildung 20: Anteil morphologisch veränderter Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 VD,  $n = 20$ , 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) im Zeitverlauf; dabei enthält BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene ECH.

Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg des Anteils an veränderten Samenzellen in den Testansätzen über den Untersuchungszeitraum von 3 Tagen ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0035$ ). Zusätzlich konnte ein negativer Effekt der zugesetzten BK aufgezeigt werden, wobei die Unterschiede zwischen den BK als signifikant einzuschätzen waren ( $p_{\text{BK}} = 0,0069$ ). Weitere Effekte waren nicht nachweisbar.

#### 4.3.3.1 Pathomorphologische Einzelparameter

Im Folgenden werden die einzelnen Parameter aufgeschlüsselt, die im Sinne der klassischen Spermatologie bei den Testansätzen untersucht wurden. Diese morphologischen Veränderungen konnten die Geißel, den Hals oder den Kopf der Spermien betreffen.

In dem untersuchten Zeitraum häufte sich in den 12 Testansätzen bei den 5 Versuchsdurchläufen die Anzahl der arithmetischen Mittelwerte der Geißelveränderungen. Dabei ist insbesondere die Steigerung von Tag 0:  $12,0 \pm 8,7$  % auf Tag 1:  $19,2 \pm 14,7$  % ( $n = 60$ , Einfachmessung einer Probe) zu vermerken. Die Auswertung der folgenden zwei Tage

zeigte ähnliche Werte wie am Tag 1 und somit keine weitere Häufung der Geißelveränderungen während der Lagerung im Kühlschrank (Tag 2:  $19,1 \pm 12,5$  %; Tag 3:  $17,5 \pm 10,3$  %;  $n = 60$ , Einfachmessung einer Probe). Der Niveauanstieg wurde in der statistischen Analyse als hoch signifikant berechnet ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0004$ ). Ein Einfluss der zugegebenen *ECH*-Konzentrationen oder des VD ist hingegen unwahrscheinlich.

Die Betrachtung der Spermienhalsveränderungen lässt einen Einfluss der BK vermuten. Während des Untersuchungszeitraums wiesen die Testansätze, welche mit der höchsten *ECH*-Konzentration (BK 2) versetzt wurden waren, im Mittel (5 Versuchsdurchläufe, 4 VD und 4 Untersuchungszeitpunkte) höhere Werte auf:  $1,6 \pm 1,2$  % als die übrigen Testansätze BK 0:  $1,2 \pm 1,0$  % und BK 1:  $1,3 \pm 1,2$  % ( $n = 80$ , Einfachmessung einer Probe). Die folgende statistische Bewertung belegte die Beobachtung ( $p_{\text{BK}} = 0,01$ ). Die übrigen Parameter zeigten keinen Einfluss auf den Anteil an Spermienhalsveränderungen.

Die graphische Darstellung der Anteile von Spermien mit Halsveränderungen in Abhängigkeit von der BK (Abbildung 21) lässt zusätzlich noch eine Wechselwirkung zwischen der *ECH*-Konzentration und den einzelnen VD erkennen. Bei dem Testansatz ohne *ECH*-Zusatz waren die Werte der einzelnen VD nahezu identisch. Bei geringem *ECH*-Zusatz (BK 1) zeigten die VD 0 und VD 1 die meisten Veränderungen. Bei der hohen *ECH*-Konzentration war dann im VD 3 gefolgt vom VD 1 der höchste Anteil an Halsveränderungen nachweisbar. Diese Wechselwirkung konnte als statistisch signifikant belegt werden ( $p_{\text{BV}} = 0,03$ ).

Der Durchschnittliche Prozentsatz an losen Köpfen der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen nahm über den zwar zu (Tag 0:  $2,5 \pm 1,9$  %; Tag 1:  $2,9 \pm 2,4$  %; Tag 2:  $2,9 \pm 2,8$  % Tag 3:  $3,3 \pm 3,2$  %;  $n = 60$ , Einfachmessung einer Probe), dies erwies sich jedoch statistisch nicht als signifikant. Ebenso konnte keine Beeinflussung durch die unterschiedlichen VD festgestellt werden. Es bestand keine signifikante Abhängigkeit der durchschnittlichen Ergebnisse der 5 Versuchsdurchläufe, 4 VD und 4 Untersuchungszeitpunkte von der BK (BK 0:  $2,3 \pm 1,9$  %; BK 1:  $3,0 \pm 2,5$  %; BK 2:  $3,4 \pm 3,3$  %;  $n = 80$ , Einfachmessung einer Probe). Lediglich die Auswertung der Wechselwirkungen der unterschiedlichen Faktoren (Abb. 21) konnte eine Beeinflussung des Anteils an losen Köpfen durch ein Zusammenwirken von BK und VD herausstellen ( $p_{\text{BV}} = 0,005$ ).

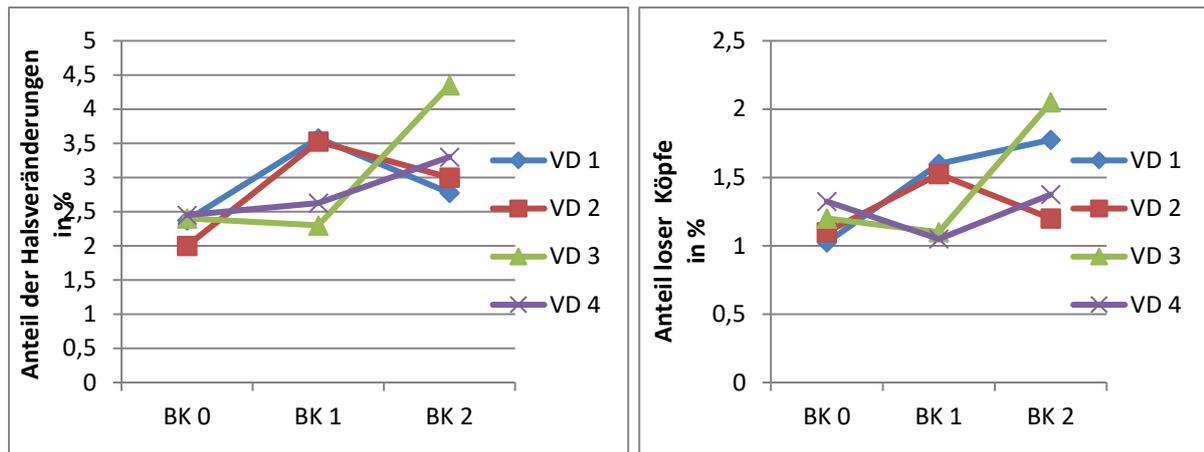


Abbildung 21: Anteil an Spermienhalsveränderungen bzw. loser Köpfe (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 4 Untersuchungszeitpunkte,  $n = 20$ , Einfachmessung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD); dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*.

Die Anzahl der Plasmatotropfen in den unterschiedlichen Testansätzen wurde nicht durch die Variation von VD, BK oder Konservierungsdauer beeinflusst. Im Hinblick auf den Zeitverlauf konnte eine Wechselwirkung zwischen der Lagerungsdauer und den VD festgestellt werden ( $p_{TV} = 0,0021$ ).

#### 4.3.3.2 Kappenveränderungen

Im Hinblick auf eine funktionierende Akrosomenreaktion wurden die durch die Spermac®-Färbung sichtbar gemachten Spermien-Kappen in den Testansätzen auf pathologische Abweichungen untersucht. Dabei wurden bei den Veränderungen zwischen abgelösten, schiefen und deformierten Kopfkappen unterschieden.

Der durchschnittliche Prozentsatz an abgelösten Kappen der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen stieg während der Lagerung signifikant ( $p_{Zeit} = 0,014$ ) an (Tag 0:  $3,5 \pm 4,2$  % bis Tag 3:  $5,4 \pm 3,8$  %;  $n = 60$ , Einfachmessung).

Die Anzahl der schiefen Kappen der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen stieg im arithmetischen Mittel sowohl über die Zeit (Tag 0:  $0,5 \pm 0,5$  % bis Tag 3:  $0,9 \pm 0,6$  %;

n = 60, Einfachmessung) als auch mit zunehmender Gentamicinkonzentration (VD 1:  $0,6 \pm 0,7 \%$  bis VD 4:  $0,8 \pm 0,6 \%$ ; n = 60, Einfachmessung) und zunehmender ECH-Konzentration (BK 0:  $0,7 \pm 0,6 \%$  bis BK 2:  $0,8 \pm 0,6 \%$ ; n = 80, Einfachmessung) an. Die Werte ergaben jedoch keine signifikante Abweichung.

Die Auswertung der Wechselwirkungen zwischen den Variablen Tag und VD konnte eine Signifikanz knapp unterhalb des Signifikanzniveaus zeigen ( $p_{TV} = 0,049$ ).

Über die dreitägige Lagerung konnte auch ein deutlicher Anstieg des Prozentsatzes an deformierten Kappen der 12 Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen nachgewiesen werden. Während am Tag 0 direkt nach Entnahme der Testansätze im arithmetisch Mittel  $4,8 \pm 3,3 \%$  verändert waren, stieg der Anteil nach 3 Tagen bis auf  $12,6 \pm 4,7 \%$  (Tag 1:  $7,6 \pm 5,4 \%$ ; Tag 2:  $11,2 \pm 5,2 \%$ ; n = 60, Einfachmessung). Die statistische Auswertung belegte den beschriebenen Anstieg als signifikant ( $p_{Zeit} < 0,0001$ ). In Anbetracht der unterschiedlichen VD und BK konnten zwar leichte Zunahmen bei steigenden Konzentrationen beobachtet werden, signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht. Mögliche Wechselwirkungen konnten im Zusammenhang mit Kappendeformationen nicht gezeigt werden.

#### **4.3.4 Untersuchungsergebnisse des Hypoosmotischen Schwelltests**

Die Membranintegrität der Spermien wurde in den Versuchen mithilfe des HOS-Tests (Hypoosmotischen Schwelltests) ausgewertet. Die gewonnenen Daten während der dreitägigen Versuchsdurchläufe mit verschiedenen VD und ECH-Konzentrationen sind in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Die arithmetischen Mittelwerte der unterschiedlichen Testansätze in den 5 Versuchsdurchläufen lagen am Tag 0 sehr dicht zusammen ( $9,7 \pm 1,0 \%$ ; n = 60, Einfachmessung). Im folgenden Zeitverlauf konnte bei den unterschiedlichen Testansätzen eine kontinuierliche, wenn auch nicht ganz gleichmäßige Zunahme der Werte bis zum Tag 3 verzeichnet werden. Weiterhin konnte ein Niveauunterschied zwischen den unterschiedlichen VD nachgewiesen werden. Der Anteil membrandefekter, nicht aufgerollter Spermischwänze stieg im VD 4 im Vergleich zu den übrigen drei VD steiler an und war stets am höchsten.

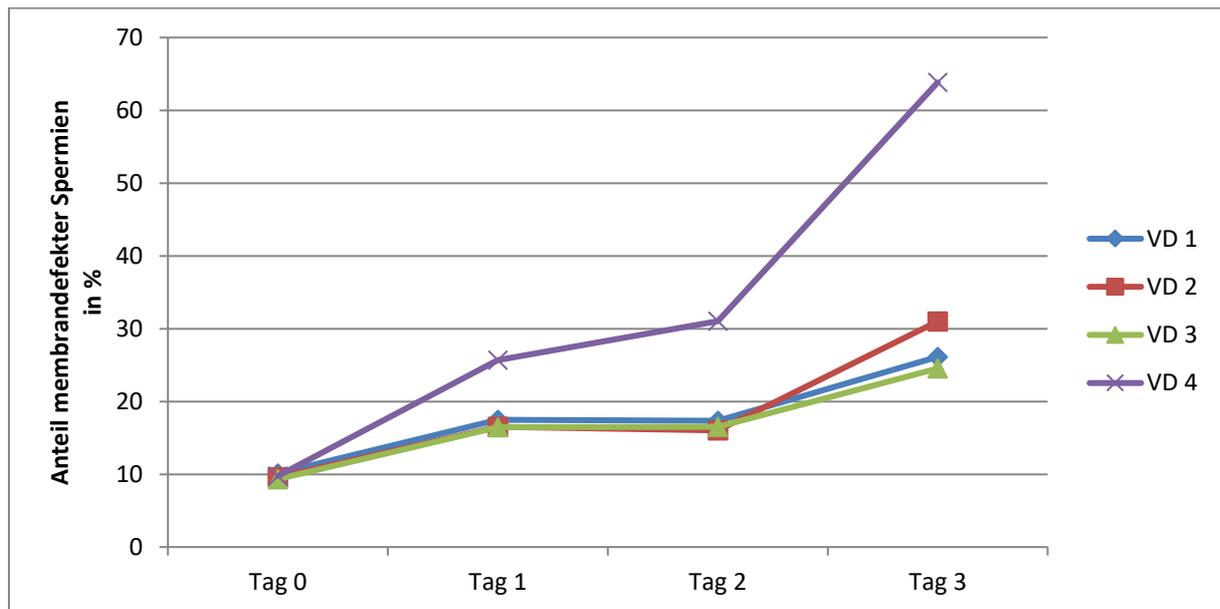


Abbildung 22: Anteil der im HOS-Test nicht aufgerollten, membrandefekten Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der 5 Versuchsdurchläufe und 3 BK,  $n = 15$ , Einfachmessung einer Probe) bei unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin.

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten zeigte eine signifikante Abhängigkeit des Anteils membrandefekter Spermien von dem Faktor Zeit ( $p_{\text{Zeit}} = 0,0007$ ). Auch die Unterschiede zwischen den einzelnen VD wurden als signifikant bewertet ( $p_{\text{VD}} = 0,014$ ). Als Letztes konnte noch eine Wechselwirkung zwischen der Lagerungsdauer und den VD als signifikant herausgestellt werden ( $p_{\text{TV}} = 0,0009$ ). Die zugesetzte *ECH*-Konzentration und weitere Wechselwirkungen waren als Einflussfaktoren auf die Anzahl aufgerollter Spermischwänze im HOS-Test im Untersuchungszeitraum statistisch nicht belegbar.

#### 4.3.5 Bakteriologische Analyse

Im Folgenden wird auf die quantitative mikrobielle Analyse im Zeitverlauf während der Versuchsdurchläufe eingegangen. Diese bezieht sich auf die im Rahmen der Versuche verwendeten *ECH*-Suspensionen, welche in den jeweiligen Testansätzen inokuliert wor-

den waren. Die qualitative Analyse des Keimspektrums im Nativejakulat wurde im Kapitel 4.1.3 abgehandelt.

Die Untersuchung der Kolonien der verschiedenen Testansätze erfolgte nach 1, 2 und 3 Tagen und Lagerung bei 4 °C durch manuelles Auszählen der bebrüteten Agarplatten. In der ersten Woche wurden pro Testansatz jeweils zwei Agarplatten (Blut und Gassner) beimpft. Jedoch wurden aufgrund von Wachstumsunterschiede zwischen den Agartypen nur die Werte der Blut-Agarplatten verwendet. Ab dem zweiten Versuchsdurchlauf fanden deshalb fortan zwei Blut-Agarplatten Verwendung. Eine Differenzierung zwischen den zugegebenen Keimen und der in den Ejakulaten und damit auch Testansätzen enthaltenen Bakterien erfolgte durch wachstumsmorphologische Unterschiede. Letztere wurden bei der Bewertung nicht weiter berücksichtigt.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der quantitativen bakteriologischen Analyse der Testansätze gestaffelt nach dem verwendeten VD graphisch, zum Teil logarithmisch, dargestellt. Bei Betrachtung des VD 1 ist über die Zeit ein Abfall der Koloniezahlen festzustellen. Das stärkste Keimwachstum wurde stets bei der BK 2 gezählt. Im Verlauf der Zeit bis hin zu Tag 3 reduzierte sich die durchschnittliche Zahl gefundener Keime (Tag 1: 50800 KBE/ml auf Tag 3: 37200 KBE/ml, n = 5, 2-fach Messung). Die Keimkonzentrationen in den Testansätzen mit BK 0 und BK 1 lagen im Mittel auf demselben Niveau. Während der 3 Tage fiel auch hier die Zahl anzüchtbarer Keime, wodurch am Ende circa noch 1/5 der Bakterien reisoliert werden konnten (Tag 1: ~500 KBE/ml auf Tag 3 ~140 KBE/ml, n = 5, 2-fach Messung). Eine Keimfreiheit war bei keinem mit VD 1 verdünnten Testansatz festzustellen.

VD 2 wies bereits am Tag 1 deutlich geringere Keimzahlen auf als VD 1, die während der Lagerung noch weiter sanken. Bei der hochkonzentrierten *ECH*-Suspension (BK 2) sank die Keimdichte von 1364 KBE/ml am Tag 1 auf 65,6 KBE/ml an Tag 3 (n = 5, 2-fach Messung). Die Testansätze mit BK 0 und BK 1 zeigten ebenfalls ein deutlich geringeres bakterielles Wachstum (Tag 1: 31 KBE/ml bzw. 25,2 KBE/ml), jedoch konnten auch hier noch am Ende des Untersuchungszeitraums einzelne Kolonien gefunden werden: 1,6 KBE/ml bzw. 4,8 KBE/ml.

Mit VD 3 war eine noch stärkere Reduktion der Keimzahlen in den Testansätzen zu verzeichnen als mit VD 2. Die hohe BK 2 ist bereits nach einem Tag auf 34 KBE/ml und nach

drei Tagen auf durchschnittlich 5,2 KBE/ml (n = 5, 2-fach Messung) gesunken. Bei Betrachtung der niedrigeren BK 1 waren am Tag 1 noch 7,6 KBE/ml zu finden. Im weiteren Verlauf sank die Bakterienzahl auf einzelne Kolonien (Tag 2: 2,4 KBE/ml; Tag 3: 1,8 KBE/ml). In den Testansätzen ohne *ECH*-Inokulation (BK 0) ließen sich im gesamten Zeitverlauf nur vereinzelt Kolonien finden. Die Durchschnittswerte der gefundenen KBE/ml zeigten zudem einen deutlichen Abfall bis zum Tag 3.

Die quantitative Analyse der Keimzahlen unter Einwirkung der im Versuch höchsten Gentamicindosis (VD 4) zeigte bereits nach einem Tag selbst bei hoher *ECH*-Inokulation (BK 2) eine fast vollständige Elimination der Keime. Ab Tag 2 der Untersuchung konnte in keinem Testansatz mehr ein bakterielles Wachstum festgestellt werden.

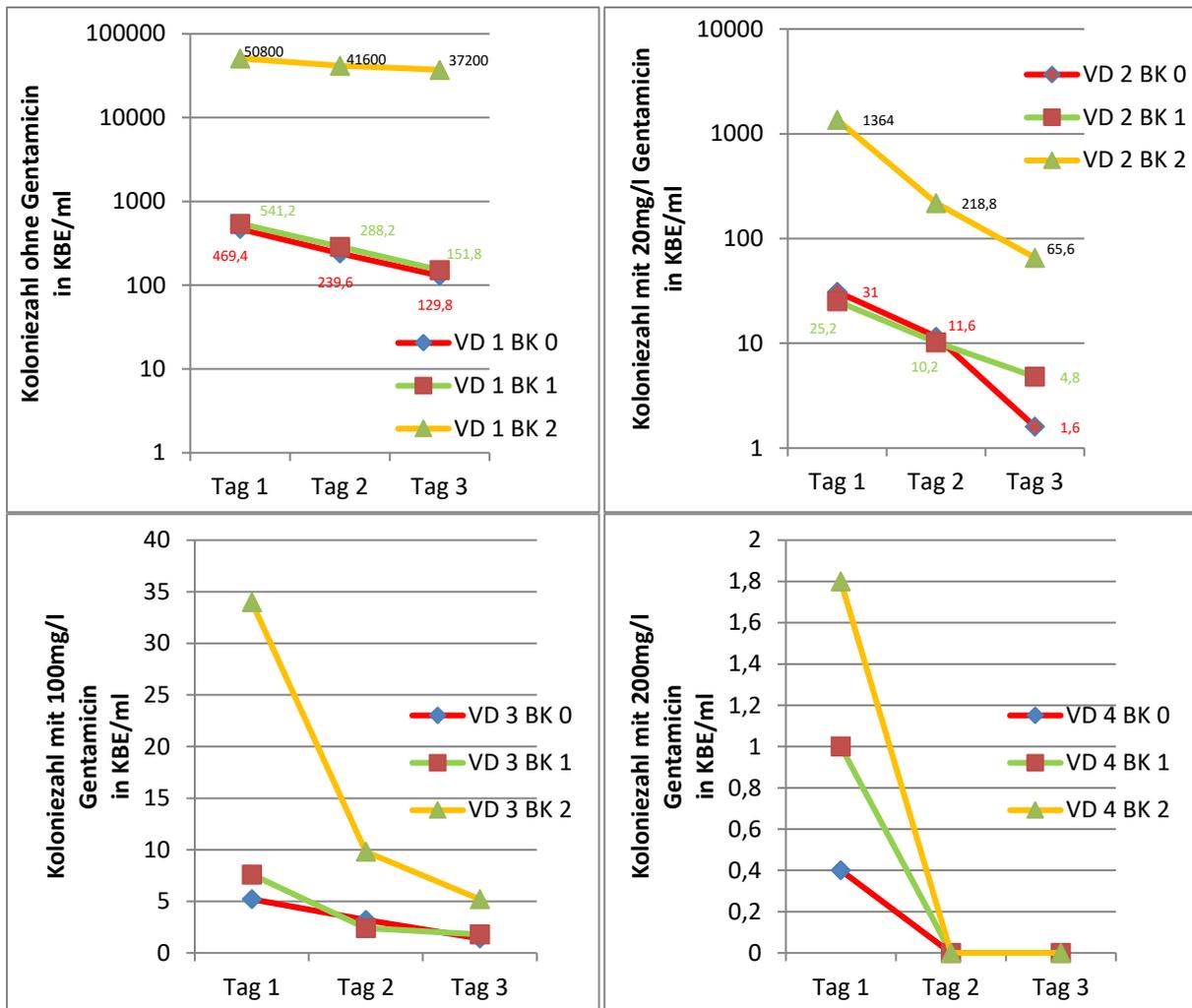


Abbildung 23: Anzahl vermehrungsfähiger *ECH* in den Testansätzen in der quantitativen bakteriellen Analyse (in KBE/ml) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe,  $n = 5$ , 2-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

## 5 Diskussion

Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von *ECH* und Gentamicin auf flüssigkonserviertes Rüdensperma. In einem Splitsample-Verfahren wurden dem Ejakulat dabei verschiedene Konzentrationen des Erregers und des Antibiotikums zugesetzt. Die vier VD (0 mg/l, 20 mg/l, 100 mg/l und 200 mg/l Gentamicin) waren bereits in dem verwendeten Verdünner CaniPro Chill (Minitüb GmbH, Tiefenbach) eingestellt. Bei den Keimzusätzen konnte zwischen keiner (BK 0: 0 KBE/ml), geringer (BK 1: 500 KBE/ml *ECH*) und hoher (BK 2:  $5 \times 10^5$  KBE/ml *ECH*) Inokulation unterschieden werden. Die so entstandenen 12 Testansätze wurden für weitere drei Tage bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und im Abstand von 24 h analysiert. Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss der Faktoren VD, *ECH*, der Zeit und der daraus resultierenden Wechselwirkungen auf die Spermaqualität während der Flüssigkonservierung zu überprüfen. Für die Bewertung der Spermien kamen sowohl klassische subjektive Methoden als auch neuere objektive Verfahren, wie CASA, zum Einsatz.

### 5.1 Diskussion der Fragestellung

Die künstliche Besamung spielt mittlerweile auch in der Hundezucht eine immer größere Rolle (Thomassen und Farstad, 2009; Linde Forsberg, 2010). Dabei ist insbesondere in den letzten 20 Jahren das Interesse an der Flüssigkonservierung von Samen stark angestiegen (Linde Forsberg, 1991; Pinto et al., 1999; Tsutsui et al., 2003; Peña et al., 2006). Die Durchführung ist im Vergleich zum Tiefgefriersperma weniger aufwendig und somit preiswerter und einfach einsetzbar (Peña et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007). Zudem sind die Trächtigkeitsraten nach Insemination mit flüssigkonserviertem Sperma denen der mit kryokonserviertem Samen überlegen (Rota et al., 1995; Rota et al., 1997; Pinto et al., 1999; Ponglowhapan et al., 2004; Linde Forsberg, 2010).

Die zur Herstellung benötigten Ejakulate werden für gewöhnlich durch Masturbation gewonnen. Die Samengewinnung mittels manueller Stimulation ist jedoch keine sterile Technik (Kustritz et al., 2005) und auch das Ejakulat selber ist nicht steril. Man findet eine Vielzahl von Bakterien im Ejakulat (Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et

al., 2006), deren Einfluss auf die Fertilität des Samens und auf die Haltbarkeit der Spermien noch nicht genau geklärt werden konnte (Kustritz et al., 2005; Schaefer-Somi et al., 2009). Bisher zeigte sich eine Tendenz zu vermehrtem Gesamtkeimwachstum bei Rüden mit klinischen Anzeichen und verändertem Ejakulat (Pesch et al., 2007; Goericke-Pesch et al., 2011). Häufig isolierte und fakultativ pathogene Mikroorganismen sind *ECH* und  $\beta$ -häm. Streptokokken (Pesch et al., 2007; Goericke-Pesch et al., 2011). Zwar sind *ECH* z.B. an verschiedenen urogenitalen Erkrankungen, wie Pyometra oder Prostatitis beteiligt (Johnston et al., 2000; Verstegen et al., 2008), eine Beeinträchtigung der Samenqualität wurde beim Hund jedoch noch nicht sicher herausgestellt (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Goericke-Pesch et al., 2011). Im Gegensatz dazu konnte ein negativer Effekt von *E. coli* auf humane Spermien nachgewiesen werden (Diemer et al., 1996; Diemer et al., 2000).

Da bei der Tiefgefrierkonservierung mit keinem weiteren Keimwachstum zu rechnen ist, wird hier häufig auf einen antimikrobiellen Zusatz verzichtet (Hoffmann, 2003). Bei der Flüssigkonservierung ist eine Keimvermehrung allerdings durchaus denkbar, weshalb für gewöhnlich dem Verdünner ein Antibiotikum zugemischt wird (Linde Forsberg; Verstegen et al., 2005; Peña et al., 2006; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Witte et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). Über den Einfluss solcher keimwachstumshemmender Substanzen auf canines Sperma ist bisher wenig veröffentlicht.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Gentamicin näher untersucht. Als VD diente der CaniPro-Chill® Verdünner. Grund hierfür war die einfache Handhabung, gute Verfügbarkeit und die Verbreitung des verwendeten VD, welcher generell vom Hersteller aus mit einem Gentamicin Zusatz ausgeliefert wird. Zudem handelt es sich, wie derzeit bei den meisten gebräuchlichen Mischungen (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Hermansson und Linde Forsberg, 2006; Busch und Waberski, 2007), bei CaniPlus-Chill® um einen auf TRIS-Basis hergestellten VD. Zusätzlich erschien die Untersuchung von Gentamicin interessant, da bei flüssigkonserviertem Hengstsperma für Gentamicin in gewissen Konzentrationen eine nachteilige Wirkung postuliert wurde (Aurich und Sperger, 2007).

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss verschiedener Gentamicin- und *ECH*-Konzentrationen auf canines flüssig konserviertes Sperma zu untersuchen. Um eine Veränderung über die Zeit und damit einen Einfluss der Lagerungsdauer feststellen zu können, erfolgten die Untersuchungen über vier aufeinander folgende Tage.

Für die Bewertung der unterschiedlichen Testansätze diene neben den Verfahren der klassischen Spermatologie auch die Analyse mit Hilfe eines CASA-Systems (SpermVision™).

## **5.2 Diskussion der Methodik**

### **5.2.1 Auswahl der Spenderrüden**

Die für die Versuche nötigen Ejakulate stammten allesamt von Rüden, die für eine andrologische Zuchttauglichkeitsprüfung in der KGGA Gießen vorstellig wurden. Da die Körpermasse positiv mit dem Spernavolumen und der Spermiengesamtzahl korreliert (Günzel-Apel et al., 1994), wurden Hunde mittelgroßer und großer Rassen favorisiert, um letztendlich ausreichend große Ejakulatmengen zu erhalten (Freshman, 2002; Pesch et al., 2007). Diese begründet sich im Versuchsaufbau: Die Gesamtzahl von 12 Kombinationen aus VD 1 – VD 4 und *ECH* pro Versuchsdurchlauf sollte untereinander vergleichbar bleiben und wurde deshalb immer aus demselben Ejakulatpool hergestellt. Um für die benötigte Spermienanzahl nicht mehr als 2 - 3 Rüden hintereinander absamen zu müssen und damit die Weiterverarbeitung zu verzögern, wurden größere Hunde bevorzugt. Potentielle Ungleichheiten in den Eigenschaften des Spermias zwischen verschiedenen Rassen wurden hingenommen. Weiterhin unterschieden sich die Probanden in der bisherigen züchterischen Nutzung und ihrem Alter. Alle in der Studie eingeschlossenen Hunde waren adult (>1 Jahr), klinisch und andrologisch gesund. Eine zeitgleiche züchterische Nutzung erfolgte nicht. Des Weiteren standen die Spendertiere zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht unter antibiotischer Behandlung, um eine Verfälschung der Versuchsergebnisse zu vermeiden. Es wurden ausschließlich Rüden verwendet, deren Ejakulate am Untersuchungstag keine Abweichungen von den Referenzwerten zeigten (Günzel-Apel et al., 1994; Riesenbeck et al., 2001). Eine Keimfreiheit der Ejakulate wäre wünschenswert gewesen, kann jedoch unter Praxisbedingungen nicht realisiert werden (Goericke-Pesch et al., 2011).

## 5.2.2 Gewinnung der Ejakulate

Das gängigste Verfahren zur Samengewinnung beim Hund stellt die manuelle Stimulation dar (Günzel, 1986; Freshman, 2002; Hoffmann, 2003; Kutzler, 2005; Pesch et al., 2007) und war auch in diesen Versuchen die Methode der Wahl. Ein Nachteil ist das relativ hohe Risiko einer bakteriellen Kontamination (Johnston, 1991; Kutzler, 2005; Pesch et al., 2006; Goericke-Pesch et al., 2011). Um diese Gefahr einzudämmen, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen. So wurden während der Samenentnahme Einweghandschuhe verwendet und der Kontakt zwischen Penis, Präputium und Auffanggefäß weitestgehend vermieden. Der Samen wurde fraktioniert aufgefangen, um eine Kontamination mit dem Vorsekret zu vermeiden, welches die meisten Keime enthält (Goericke-Pesch et al., 2011). Dennoch ließ erwartungsgemäß die darauffolgende mikrobiologische Untersuchung der Ejakulatpools stets ein gewisses bakterielles Wachstum erkennen.

Je nach Größe des Rüden wurde die Masturbation am Boden oder auf dem Tisch durchgeführt. Zur besseren Stimulation des Hundes war, wenn möglich, eine Hündin in Standhitze anwesend. Konnte das nicht gewährleistet werden, kamen eine Hündin und Kompressen mit vaginalem Ausfluss einer läufigen Hündin zum Einsatz. So sollten die Erfolgchancen und die Ejakulatmenge verbessert werden (Günzel, 1986; Peña et al., 2006; Pesch et al., 2007). Inwieweit diese Maßnahmen einen Einfluss auf die Ejakulatqualität hatten, lässt sich nicht beurteilen.

## 5.2.3 Spermatologische Untersuchungsmethoden

Um die Vitalität und den Zustand der Spermien zu beurteilen und damit die Qualität des Spermas und die Einflüsse der untersuchten Variablen einordnen zu können, wurden verschiedene Analysetechniken angewendet. Neben der technisch aufwendigen CASA, wurden auch Untersuchungen der klassischen Spermatologie durchgeführt.

Bei der Durchführung der einzelnen Versuche im Rahmen der klassischen Spermatologie wurde sich an der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise orientiert (Günzel, 1986; Johnston, 1991; Riesenbeck et al., 2001; Freshman, 2002).

Zuerst erfolgte die Schätzung der Motilität. Es wurde darauf geachtet, dass die Testansätze zum Untersuchungszeitpunkt auf 37 °C erwärmt waren bzw. blieben. Die Testan-

sätze am Tag 0 wurden schnellstmöglich aufbereitet, untersucht und auf Wärmeplatten gelagert, um temperatur- oder zeitbedingte Abnahme der Beweglichkeit zu vermeiden (Freshman, 2002). Bei der Beurteilung zu den späteren Untersuchungszeitpunkten wurde nur entsprechende Anteil der Testansätze aus dem Kühlschrank entnommen und auf 37 °C erwärmt und nach kurzer Adaptionszeit begutachtet. Der Rest der Testansätze verblieb für die übrigen Untersuchungszeitpunkte im Kühlschrank. Eine zu hohe oder zu niedrige Temperatur kann die Spermien schädigen und die Motilität beeinflussen (Linde Forsberg, 1991; Seed et al., 1996; Iguer-ouada und Verstegen, 2001a; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007). Deshalb wurden während der Versuche Heizplatten und beheizte Objektträgertische verwendet und Objektträger vorgewärmt. Gleichzeitig zur CASA erfolgte eine subjektive Schätzung, wodurch eine gegenseitige Plausibilitätskontrolle beider Verfahren möglich war und die Gefahr einer Fehlmessung reduzierte.

Die nächste Untersuchung stellte der Eosin-Ausstrich dar. Als Färbemittel wurde ausschließlich Eosin verwendet (Hoffmann, 2003), wie es auch in der Routinediagnostik der KGGA üblich ist. Anhand dieser Färbung wurde der Prozentsatz lebender Spermien ausgezählt. Für eine ausreichende Genauigkeit diente die Bewertung von 200 Spermien pro Präparat bei 400× Vergrößerung. Um ein zusätzliches Absterben durch den Färbeschritt zu vermeiden, wurde auch diese Untersuchung möglichst zügig und auf vorgewärmten Objektträgern durchgeführt (Hoffmann, 2003). Generell stellt der Eosin-Ausstrich durch seine gute Durchführbarkeit und einfache Interpretation (weiße Spermien leben, rote Spermien, bei denen Eosin die Zellmembran penetrieren kann, gelten als tot) ein beliebtes und häufig angewandtes Verfahren dar. Deshalb kam es auch in dieser Arbeit zum Einsatz.

Obwohl neben dem Anteil lebender bzw. toter Spermien auch pathomorphologische Veränderungen der Samenzellen im Eosin-Ausstrich hätten beurteilt werden können, erfolgte die Beurteilung der Pathomorphologie in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der akrosomalen Integrität anhand von Spermac<sup>®</sup> gefärbten Ausstrichen (Hoffmann, 2003). Diese kommerziell erhältliche Färbung ist besonders für das Anfärben der unterschiedlichen Bestandteile der spermalen Kopfkappen geeignet. Die Untersuchung erfolgte bei 1000× Vergrößerung, was das Auszählen von 200 Spermien in den stark verdünnten Testansätzen zum Teil zeitaufwändig machte. Die größere Darstellung bietet allerdings eine sicherere Beurteilung der Strukturen. Pathologische Veränderungen konnten ebenso wie die unterschiedlichen Kappenveränderungen deutlich differenziert werden.

Ein Nachteil stellt die Bewertung dar, die jeweils nur eine Veränderung pro Spermium erlaubt. In diesem Fall wurde die Veränderung gezählt, die das Spermium in seiner Funktion am drastischsten einschränkt. Dadurch ist die Vergleichbarkeit zu anderen Studien, wo Kappenveränderungen und pathomorphologische Veränderungen separat gezählt wurden, allerdings nur bedingt möglich. Der Vorteil liegt hingegen, durch das Ausbleiben einer Schnittmenge dieser beiden Veränderungstypen, in einer genaueren Kategorisierung und Differenzierung potenziell infertiler Spermien. Da sowohl die für Flüssigkonservierung anfälligen Kopfkappen (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Tsutsui et al., 2003) als auch die Unversehrtheit der Spermien selbst einen wichtigen Einfluss auf die Fertilität des Spermas haben (Verstegen et al., 2002), erschien diese Form der Datenerhebung sinnvoll.

Die letzte angewandte Untersuchung in dieser Arbeit, der HOS-Test, dient der Überprüfung der Membranintegrität der Spermien (Hoffmann, 2003). Für Vorgänge wie die Kapazitation, die AR und die Gametenfusion ist die Unversehrtheit der Membran eine notwendige Voraussetzung. Der damit erfasste Funktionszustand der Spermienmembran liefert somit hilfreiche prognostische Informationen über die Befruchtungsfähigkeit der Spermien (Correa und Zavos, 1994; Seed et al., 1996; Goericke-Pesch und Failing, 2013). Für die Bewertung der Testansätze wurde eine 400× Vergrößerung und Phasenkontrast gewählt, um auch ein leichtes Aufrollen der Geißel detektieren zu können. Durch die einfache und preiswerte Durchführbarkeit stellt dieses Verfahren eine gute Ergänzungsuntersuchung für die Vitalitätsbeurteilung des Spermas dar.

Neben den klassischen spermatologischen Untersuchungsmethoden wurde auch auf eine CASA zurückgegriffen. Zwar sind die Anschaffungskosten vergleichsweise hoch, jedoch liefert das System in Hinblick auf die Spermienmotilität, schnell, relativ objektive und damit gut vergleichbare Werte (Thurston et al., 1999; Verstegen et al., 2002). Die klassischen Spermatologie-Verfahren sind im Vergleich stärker vom Untersucher und dessen Erfahrung abhängig (Verstegen et al., 2002).

Derzeit stehen verschiedene Modelle für die automatisierte Spermienanalyse zur Verfügung (Günzel-Apel et al., 1993; Rota et al., 1999b; Peña und Linde Forsberg, 2000, Iguer-ouada und Verstegen, 2001a, 2001a; Peña et al., 2003). Für die im Rahmen der Versuche durchgeführten Untersuchungen kam ein SpermVision® CASA System (Minitüb, 84184

Tiefenbach, Deutschland | MOFA global®, 419 Venture Court, Verona, WI 53593) zum Einsatz. Um vergleichbare und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, benötigt jedes System standardisierte und validierte Einstellungen (Smith und England, 2001; Rijsselaere et al., 2003). In dieser Arbeit wurde sich deshalb an aus der Literatur bekannten Konfigurationen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007; Goericke-Pesch et al., 2012) orientiert, diese mit den vom Hersteller (Minitüb, 84184 Tiefenbach, Deutschland) empfohlenen Angaben und eigenen Erfahrungen abgeglichen und entsprechend angepasst. Eine Auflistung der verwendeten Einstellungen ist der Tab. 9 (Kap. 3.6.3) zu entnehmen. Dennoch kann durch kleine Unterschiede die Vergleichbarkeit mit anderen Versuchen beeinträchtigt sein (Kraemer et al., 1998; Smith und England, 2001). So ist die hier gewählte Spermienkopfgröße eher im oberen Referenzbereich einzuordnen (Rijsselaere et al., 2004a). Auch die Aufbereitung der Spermeproben kann auf die Untersuchungsergebnisse Einfluss nehmen (Smith und England, 2001; Rijsselaere et al., 2003). Hier wurde sich ebenfalls an der Literatur orientiert. Die Testansätze wurden auf 37 °C (Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007) erwärmt und 30 Sekunden gewartet, um eine gleichmäßige Verteilung in der Zählkammer zu gewährleisten (Iguer-ouada und Versteegen, 2001a; Smith und England, 2001). Der Gebrauch dieser Kammern wird vom Hersteller empfohlen, kann jedoch auch einen Einfluss auf die Motilität ausüben (Versteegen et al., 2002). Da alle Testansätze dieser Studie auf gleiche Weise bearbeitet und mit gleichen Einstellungen gemessen wurden, ist deren Einfluss auf die Ergebnisse innerhalb der Arbeit als gering bis vernachlässigbar einzuschätzen.

Bei hohen Zellzahlen, wie sie im unverdünnten Rüdensperma zu finden sind, wird eine Fehleinschätzung des Ejakulates mittels CASA beschrieben (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Für das SpermVision® sollte die Zellzahl pro Gesichtsfeld nach Herstellerangaben zwischen 36 – 100 Spermien liegen (Minitüb GmbH, 2006). In der vorliegenden Arbeit spielte dieser Aspekt keine Rolle, da die Testansätze ohnehin waren.

Auch eine Diskrepanz zwischen geschätzter und gemessener Spermien-Motilität, wie in anderen Versuchen beschrieben (Schäfer-Somi und Aurich, 2007), konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Diese Einschätzung beruht auf einer im Rahmen der Analyse durchgeführten subjektiven Plausibilitätskontrolle der Ergebnisse. Für eine sicherere Aussage wäre eine zusätzliche Blindstudie nötig. Eine gravierende Überschätzung, wie bei einer Studie am Bullen aus den 80er Jahren (Amann, 1980), in der bei to-

ten Spermien eine Beweglichkeit von 31 % ermittelt wurde, wird in dieser Arbeit allerdings ausgeschlossen.

Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren stellt die CASA mittels SpermVision® eine einfache und reproduzierbare Untersuchungsmethode dar (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Die Verwendung eines eigelbfreien TRIS-VD zur Verdünnung der Proben minimiert zudem das Risiko einer Beeinflussung des Systems durch Eibestandteile (Rota et al., 1999b; Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

#### **5.2.4 Auswahl und Herstellung der bakteriellen Inokulate**

Bisherige Studien zeigten, dass in Ejakulaten von Rüden häufig eine Vielzahl verschiedener Bakterien vorhanden ist (Ling und Ruby, 1978; Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et al., 2006; Goericke-Pesch et al., 2011). Eine klare Differenzierung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Organismen konnte für den Hund jedoch noch nicht vorgenommen werden (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007), da es sich generell um fakultativ pathogene Bakterien handelt. Jedoch waren bei Rüden mit klinisch-andrologischer Symptomatik vermehrt  $\alpha$ - und  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken, bei Präputialkatarrh vermehrt *ECH* nachweisbar (Pesch et al. 2006), zudem wurde in teratozoospermen Ejakulaten tendenziell häufiger hochgradiges Wachstum von *ECH* identifiziert (Goericke-Pesch et al., 2011).

In der humanen Reproduktionsmedizin ist hingegen bekannt, dass hämolysierende *E. coli* zu einer deutlichen Verschlechterung der Spermaqualität führen können (Diemer et al., 2000), wobei die Konzentration der Keime eine entscheidende Rolle spielt (Diemer et al., 1996). Durch Beschädigung der Plasmamembran neigen die Spermien zu Agglutination. Veränderungen an der Akrosomenmembran beeinträchtigen zudem die Reaktionsfähigkeit mit der Eizelle (Fraczek et al., 2012).

Bei dem für die Studie ausgewählten *ECH* handelte es sich um einen aus dem Hund isolierten Stamm. Er wurde während der Routinediagnostik aus dem Urogenitaltrakt einer Hündin mit Reproduktionsproblematik angezüchtet und für die Versuche zur Verfügung gestellt. Sowohl die Anpassung an den Hund als auch die potenziell-pathogenen Eigenschaften (Johnston et al., 2000; Verstegen et al., 2008) stellten für die Versuche gute Voraussetzungen dar. Die Ergebnisse dieser Studien sind jedoch nicht rückhaltlos auf alle *E. coli* zu übertragen, da sich verschiedene Stämme in ihren O-, K-, F- Antigenen und da-

mit in ihren Virulenz-Faktoren voneinander unterscheiden (Garcia et al., 1988; Rolle und Mayr, 2007; Quinn, op. 2011). Eine Serotypisierung zur genaueren Bestimmung des verwendeten Stammes wurde aus Kostengründen nicht durchgeführt, kann bei Bedarf jedoch noch nachgeholt werden. Zuletzt bleibt auch der Analogieschluss, dass Stämme, die bei der Hündin zu einer klinisch gynäkologischen Symptomatik führen, auch beim Rüden klinisch andrologische und spermatologische Veränderungen bedingen, ungewiss.

Die Anzucht von *ECH* bereitet in der Regel keine Schwierigkeiten. Eine hohe Tenazität, schnelle Vermehrungsintervalle und ein anspruchsloses Wachstum gewährleisteten ein unkompliziertes Vorbereiten der *ECH*-Inokulate. Zudem ermöglichen Hämolyse, schleimiges Wachstum und die Fähigkeit Laktose zu spalten (Rolle und Mayr, 2007; Quinn, op. 2011) eine morphologische Differenzierung der Kolonien auf den Agarplatten, welche die quantitative bakteriologische Auswertung erleichterte.

Um die Spermien und den verwendeten VD so gering wie möglich mit der Bakterien-Suspension zu verdünnen und damit zu beeinflussen, wurde in dieser eine hohe *ECH*-Konzentration gewählt und die Menge an notwendiger Suspension damit reduziert. So wurden die im Versuch verwendeten Bakterien für die hohe mikrobielle Zugabe (BK 2) auf eine Endkonzentration von  $1,5 \times 10^7$  KBE/ml gebracht. Die Vermehrungsphase wurde so kurz wie möglich gestaltet, um einen Metabolitenanstieg und die damit verbundene Absterbephase der Bakterien zu vermeiden. Dieses Vorgehen sollte gewährleisten, dass die *ECH* möglichst vital inokuliert wurden und keine prozessbedingten Schäden das Wachstumsverhalten beeinträchtigten. Regelmäßige Wachstumskontrollen während der Inkubation dienten der genauen Konzentrationsbestimmung. Einen weiteren, potentiell negativen Einfluss auf die Vitalität der Keime übt die Konservierung aus. Durch den Einfrier- und Auftauvorgang kommt es zur Bildung von Eiskristallen, die die Zellen schädigen (Bayer und Remsen, 1970; Mazur et al., 1972). Die Abnahme verfügbaren Wassers beeinflusst die Osmolarität und den pH-Wert des Lösungsmediums (Peña et al., 2006). Deshalb wurden im Vorfeld der Versuche verschiedene Medien ausprobiert, die eine schonende Langzeitlagerung bei  $-80\text{ °C}$  ermöglichen sollten. Das in den Versuchen verwendete Medium wurde in Anlehnung an eine Lösung zum Gefriertrocknen von *Lactobacillus acidophilus* (Martin Senz, 2012) hergestellt. Dieses zeigte sich den anderen getesteten Lösungen gegenüber als überlegen. Dennoch konnte nur eine Überlebensrate von 83,5 % erreicht werden. Durch das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff könnte die-

ser Prozentsatz noch weiter gesteigert werden (Bayer und Remsen, 1970). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht getestet. Um den Verlust an lebenden Bakterien Rechnung zu tragen, wurde vor dem Einfrieren eine entsprechend höhere *ECH* Dichte gewählt.

Das Einstellen der anvisierten Konzentrationen von 500 KBE/ml und  $5 \times 10^5$  KBE/ml erforderte kurz vor dem Versuch eine letzte Verdünnung von 3,5 ml zur niedrigen bzw. 0,5 ml zur hohen Bakterien-Suspension. Diese Diskrepanz im Verdünnungsgrad beruht wahrscheinlich auf einer gewissen Inhomogenität im Ausgangsmaterial. Der Ausgleich dieser Schwankung erfolgte kurz vor dem Inokulieren in die Testansätze mit VD 1. So sollte ein Einfluss auf die Ergebnisse der Versuche ausgeschlossen werden.

Da das Wachstum von Bakterien gewissen Schwankungen unterliegen kann, wurde zur Verifizierung der zugegebenen Dosis jeweils am Tag 0 ein Teil der vorbereiteten *ECH* in Agarplatten gegossen. Hiermit sollte die tatsächlich zugegebene BK kontrolliert werden. Die Schwankungen innerhalb einer, auf vier Nährplatten verteilten Probe, betragen bis zu ~40 %. Dieser Wert liegt jedoch noch im Rahmen der natürlichen Schwankungen (Acton, 2012; Easter, 2014). Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich im Wachstumsverhalten der Bakterien. Eine Kolonie wird oft nicht nur von einer Mikrobe gebildet. Diese sind häufig schwer zu trennen und liegen deshalb in Klumpen vor, die unterschiedlich groß sein können. Trotz sorgfältigem Mischen der Proben kann eine gewisse Varianz somit nicht vermieden werden (Easter, 2014).

BK von 500 KBE/ml sind als geringgradiges Wachstum, Konzentrationen von über  $2 \times 10^4$  bzw.  $10^5$  KBE/ml als hochgradiges Wachstum definiert (Pesch et al., 2007; Goerick-Pesch et al., 2012). Dementsprechend repräsentieren die niedrige Dosis eine in der Praxis häufig vorkommende Kontamination, während die hohe Dosis oberhalb des in der Literatur beschriebenen Referenzbereichs für hochgradiges Wachstum liegt. Um einen möglichen Einfluss der *ECH* auf die Spermaqualität zu ermitteln, wurden die entsprechenden Ergebnisse mit denen eines Testansatzes ohne *ECH* verglichen.

### **5.2.5 Bakteriologische Untersuchungen**

Die bakteriologische Analyse umfasste mehrere Untersuchungen. Zum einen die qualitative Analyse des Nativejakulats auf Agarplatten und mittels MALDI-TOF Massenspekt-

rometrie und zum anderen eine quantitative Analyse der Testansätze im Plattengussverfahren.

Die qualitative Untersuchung der nativen Spermaproben erfolgte zunächst analog zu der in der Routinediagnostik üblichen Praxis (Pesch et al., 2007). Das Ejakulat wurde gleichmäßig auf je einer Blut- und einer Gassner- Agaplatte ausgestrichen und inkubiert. Zusätzlich wurde ein Teil zur Anreicherung in eine BHI (10 ml) gegeben und nach 24 h Inkubation ebenfalls ausplattiert. Morphologisch unterschiedliche Kolonien wurden anschließend subkultiviert. Die so entstandenen Reinkulturen wurden in einem MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Corporation, MA, USA) untersucht. Dieses Analyseverfahren erlaubt eine schnelle und präzise Identifikation unterschiedlicher Mikroorganismen direkt von einer Nähragarplatte. Neben der Zeitersparnis sind, im Vergleich zu der konventionellen phänotypischen Identifikation mittels bunter Reihe, auch die Kosten geringer (Lay, 2000, 2001; Carbonnelle et al., 2011). Ein limitierender Faktor ist die Datenbank, die der Massenspektrometrie zugrunde liegt. Es können nur Spezies erkannt werden, die in der Datenbank hinterlegt sind. Der Ausbau dieses Systems ist aber mittlerweile sehr weit fortgeschritten, sodass es für die Routineuntersuchung geeignet erscheint (Carbonnelle et al., 2011). Die Analyse der Bakterienkulturen konnte in der vorliegenden Arbeit ohne Einschränkung durchgeführt werden. Als Sicherheit wurde von der zugehörigen Software zu jeder Probe eine Bewertungszahl angezeigt, welche die Wahrscheinlichkeit der richtigen Spezies- bzw. Gattungsidentifikation angab. Bei 11 der 13 gefundenen Bakterien war eine „sehr wahrscheinliche“ bis „wahrscheinliche“ Speziesidentifikation möglich, bei den übrigen 2 Keimen (Versuchsdurchlauf 2: *Moraxella canis*; Versuchsdurchlauf 4: *Staph. warneri*) war die richtige Gattungsidentifikation wahrscheinlich. Zu beachten ist, dass bei den Versuchen aus praktischen Gründen keine Einzeltieruntersuchung stattfand. Da die bakterielle Untersuchung der Nativejakulate nicht Hauptaugenmerk der Arbeit war, sondern nur eine ergänzende Untersuchung darstellte, wurde auf eine individuelle Untersuchung der Hunde und auf eine genauere Analyse der zwei unsicheren Keimspezies verzichtet.

Die quantitative Auswertung der 12 Testansätze pro Versuchsdurchlauf erfolgte 24, 48 und 72 h nach ihrer Herstellung. Eine weitere Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt fand nicht statt. Zusätzliche bakteriologische Untersuchungen innerhalb der ersten 24 h würden zwar weitere Aufschlüsse über die Entwicklung der Keimkonzentrationen geben, jedoch musste hierauf aufgrund des geringen Testansatz-Materials und logis-

tischer Aspekte verzichtet werden. Da flüssigkonserviertes Sperma meist innerhalb von ein bis drei Tagen versamt werden sollte (Pesch et al., 2007), lag das Hauptaugenmerk des Versuchs auf dieser Zeitspanne.

Die Anzahl der keimbildenden Kolonien pro Milliliter Probe wurde als Maßeinheit für die quantitative Wertung gewählt. Für verlässliche Ergebnisse müssen Proben möglichst homogen und verlustfrei auf die Nährplatten gebracht werden. Andernfalls können konfluierende Kolonien oder Rückstände an Spatel oder Ösen das Resultat beeinflussen. Das gewählte Plattengussverfahren ist eine geeignete Methode, um die Bakterienkonzentration von flüssigen Medien festzustellen (Viljo Tapio Juhani Nordlund, 1987; Fuchs et al., 2007) und findet somit auch weltweit Anwendung (Gilchrist et al., 1973). Es bietet die Möglichkeit kleine Probenmengen zu verarbeiten und zeigt eine geringe natürliche Varianz der Ergebnisse (Gilchrist et al., 1973). Die Verwendung des im Landesbetrieb Hessisches Landeslabor vorhandenen Spiralplattierers (easySpiral Dilute® Interscience, Frankreich) war aufgrund zu niedriger Testansatz-Volumina nicht möglich. Die Anzahl der Kolonien, die im Plattengussverfahren auf dem Agar wachsen, ist im Durchschnitt kleiner als bei anderen Methoden (Hoben und Somasegaran, 1982). Da in den Versuchen alle Testansätze auf gleiche Weise verarbeitet wurden, waren allerdings keine signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse zu erwarten. Als Grund für die niedrigeren Keimzahlen wird die Temperatur des Agars diskutiert (Hoben und Somasegaran, 1982). Der Agar wird, um ihn in die Petrischalen gießen zu können und ein Vermischen mit der Probe zu gewährleisten, bei einer Temperatur zwischen 45 °C - 50 °C im flüssigen Aggregatzustand verarbeitet. Einige hitzelabile Bakterien könnten so abgetötet werden.

Jeder Testansatz sollte im Rahmen der quantitativen Untersuchung sowohl in Blut- als auch in Gassner-Agar gegossen werden. Diese Doppelbeprobung sollte die Genauigkeit der Ergebnisse erhöhen und helfen, die im Ejakulat enthaltenen Bakterien von den inokulierten *ECH*-Suspensionen zu unterscheiden. Blut-Agar eignet sich zur Anzucht anspruchsvoller Mikroorganismen und bietet die Möglichkeit, hämolysierende Reaktionen festzustellen (Busch, 2010; Merck Millipore, 2014a). Gassner-Agar dient der selektiven Anzucht von Enterobakterien, wie Salmonellen oder *E. coli*, und zeigt zudem die Fähigkeit des Laktosestoffwechsels an (Rolle und Mayr, 2007; Merck Millipore, 2014b). Im Laufe der Versuche stellte sich allerdings heraus, dass die Wachstumsbereitschaft der untersuchenden *ECH*-Kolonien im Gassner-Agar deutlich unter der des Blut-Agars lag. Gassner-Agar ist für die Anzucht von *E. coli* sehr gut geeignet (Merck Millipore, 2014b).

Dennoch handelt es sich um einen Selektivnährboden, der den Bakterien deshalb nicht unbedingt die optimalen Wachstumsbedingungen liefert. So gibt der Hersteller eine Wiederfindungsrate von mehr als 40 % an, die Referenzmethode wird dabei allerdings nicht benannt (Merck Millipore, 2014b). Der verwendete Blut-Agar weist hingegen eine Wiederfindungsrate von mehr als 70 % auf (Merck Millipore, 2014a). Die genaue Ursache für dieses Verhalten wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt.

### **5.2.6 Auswahl der Gentamicinkonzentrationen**

Der hier verwendete VD ist ausschließlich kommerziell erhältlich. Das in den Versuchen verwendeten Gentamicin war somit in entsprechenden Konzentrationen bereits im VD enthalten, welcher speziell für diese Arbeit angefertigt und zur Verfügung gestellt wurde. Das bot auf der einen Seite eine professionelle Herstellung und eine einfache, praxisnahe Handhabung. Andererseits war davon auszugehen, dass die einzelnen VD mit der darin enthaltenen Menge an Gentamicin nicht einer Charge entstammen und daher in ihrer Zusammensetzung voneinander abweichen können. Um den Einfluss von Gentamicin auf canine Spermien zu untersuchen, wurden vier verschiedene Konzentrationsstufen des Antibiotikums gewählt. Eine Sonderform stellt der „VD 1“ dar, der als Kontrolle diente und kein Gentamicin enthielt. Die übrigen Konzentrationen waren 20 mg/l, 100 mg/l und 200 mg/l. Die Kontrolle wurde gewählt, um Vergleichswerte ohne Antibiotika-Einfluss als Referenz zu haben. Hinzu kommt, dass auch bei der Flüssigkonservierung ohne antimikrobiellen Zusatz nicht unbedingt mit einer Verschlechterung der Samenqualität zu rechnen ist (Jasko et al., 1993; Price et al., 2008). Die obere Gentamicin-Grenze wurde bei 200 mg/l festgelegt, da diese auch die im kommerziell erhältlichen CaniPlus Chill® (Minitüb GmbH, Tiefenbach) Verdünner zum Einsatz kommt. Wissenschaftliche Erkenntnisse, warum in der kommerziell erhältlichen Version des Verdünners 200 µg/ml Gentamicin enthalten sind, liegen nicht vor. Die übrigen beiden verwendeten Gentamicinkonzentrationen obliegen einer gewissen Willkür. Sie wurden so festgelegt, dass ihre Konzentration 10 % bzw. 50 % der verwendeten Maximaldosis entsprachen. Andere Konzentrationen wurden in einem Nachversuch untersucht. Weitere Erkenntnisse aus der Literatur über verschiedene Konzentrationen an Gentamicin in flüssigkonservierten Rüdensperma sind nicht bekannt.

## **5.3 Diskussion der Untersuchung des Nativejakulats**

### **5.3.1 Makroskopische und mikroskopische Untersuchung**

Die Untersuchung des Nativejakulats wurde auf ein Minimum beschränkt. Hierdurch sollte das Material des Testansatzes zu Gunsten von späteren Untersuchungen eingespart und die Zeit zwischen Samengewinnung und seiner Konservierung so kurz wie möglich gehalten werden. Eine eingehendere Analyse einzelner Vitalparameter erfolgte unmittelbar nach der Hinzugabe des VD und der *ECH*-Inokulation. Die Zeit zwischen dem Aufbereiten und dem Erheben der getesteten Qualitätsparameter lag zumeist nur zwischen 30 Sekunden und einer Minute, wodurch die damit bedingte Veränderung auf ein Minimum beschränkt werden sollte. Angaben zu einer spontanen Verschlechterung des Samens durch Versetzen mit dem VD können deshalb nicht gemacht werden. Eine deutliche Veränderung der Werte war jedoch nicht zu erwarten (Goericke-Pesch et al., 2012).

Die in diesem Teil der Untersuchung berücksichtigten Parameter dienten vorwiegend einer einfachen Eignungskontrolle der Ejakulate. Für die Versuche waren eine ausreichend hohe Spermiengesamtzahl und eine gewisse Motilität notwendig. Die Farbe, Dichte und das Volumen des Samens variierten zwar zum Teil erheblich, was der Verwendung verschiedener Rassen geschuldet war, befanden sich dabei aber immer im Referenzbereich (Hoffmann, 2003; Busch und Waberski, 2007; Root-Kustritz, 2007). Die Beweglichkeit wurde initial nur subjektiv geschätzt. Eine Mindestbeweglichkeit von mehr als 70 - 75 % sollte und wurde für zu konservierendes Sperma nicht unterschritten (Hoffmann, 2003; Peña Martínez, 2004; Pesch et al. 2007).

### **5.3.2 Bakteriologische Untersuchung**

Die mikrobielle Überprüfung der Ejakulatpools ergab in allen Versuchsdurchläufen einen positiven Befund. Ein Wachstum verschiedener Keime konnte somit trotz guter Entnahme und Hygienebedingungen nicht vermieden werden. Auf die Untersuchung der Einzelejakulate wurde verzichtet.

In den meisten Fällen (4/5) wurde eine Mischpopulation aus verschiedenen Keimen nachgewiesen. Lediglich im Versuchsdurchlauf „5“ wurden ausschließlich *E. coli* isoliert. Diese Ergebnisse decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Situation, wo in

30 - 80 % der Ejakulate Erreger nachgewiesen werden können (Johnston, 1991; Kustritz et al., 2005; Pesch et al., 2006; Schaefer-Somi et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2011). Betrachtet man die einzelnen angezüchteten Keimspezies, lässt sich auch hier eine gute Übereinstimmung mit den in der Literatur gefundenen Spezies zeigen, wo gehäuft *aerobe Bazillen* (25,7 %), *E. coli* (13,2 %), *Staph. pseudintermedius* (11,8 %) und *Strep. canis* (19,7 %) nachgewiesen wurden (Pesch et al., 2006). Diese Keime sind sowohl bei gesunden, wie auch in dieser Untersuchung, als auch bei Rüden mit klinisch andrologischer Symptomatik, Infertilität und abnormen Spermogramm nachweisbar (Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et al., 2006; Schaefer-Somi et al., 2009, Goericke-Pesch et al. 2012). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Erreger in den unterschiedlichen Testansätzen einen Einfluss auf die Samenqualität und damit auf die Versuchsergebnisse hatten. Die Verwendung steriler Samenproben ist jedoch weder realistisch noch möglich. Auch eine einheitliche Ausgangssituation mit demselben Keimen in allen Testansätzen war nicht realistisch, da die Ergebnisse einer bakteriologischen Untersuchung mindestens 24 h in Anspruch nehmen und dies die Weiterverarbeitung der Ejakulate entsprechend verzögert hätte. Zudem sollte in der vorliegenden Untersuchung eine praxisnahe Situation simuliert werden, in der individuelle Schwankungen und Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden konnten. Zudem standen die Verläufe zwischen den Testansätzen im Mittelpunkt der Untersuchung. Durch die gleichen Ausgangsbedingungen relativiert sich somit der Einfluss individueller Unterschiede auf die Ergebnisse.

## **5.4 Diskussion der Untersuchungsergebnisse der Testansätze**

Die Aufgabe der Flüssigkonservierung besteht im Wesentlichen darin, die Qualität und Befruchtungsfähigkeit des Ejakulates so lang wie möglich aufrecht zu erhalten, da diese mit der Zeit abnehmen (Michael et al., 2009). Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Es finden sich jedoch in der Literatur unterschiedliche Angaben über das Ausmaß der Veränderungen in Hinblick auf die Lagerungsdauer der Ejakulate und den Einfluss auf verschiedene Vitalitätsparameter (Bouchard et al., 1990; Rota et al., 1995; Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Rijsselaere et al., 2002; Hermansson et al., 2006; Kmenta et al., 2011).

### 5.4.1 Mittels CASA erhobene Ergebnisse

Die Motilität ist einer der wichtigsten Analyseparameter für die Güte eines Ejakulats (Rigau et al., 2001; Peña Martínez, 2004). Eine gute Beweglichkeit gibt Rückschlüsse auf die Qualität, die Funktionalität und damit auch auf die Viabilität der Spermien. Nur strukturell und funktionell intakte Spermien sind zu einer gerichteten Bewegung imstande (Verstegen et al., 2002; Peña Martínez, 2004). Auch wenn die Motilität als ein Schlüsselparameter für die Fertilität gilt, spielen weitere Faktoren wie Morphologie der Spermien ebenfalls eine wichtige Rolle (Verstegen et al., 2005) und die Fertilität der Spermien kann trotz gut erhaltener Beweglichkeit reduziert sein kann (Linde Forsberg, 1991).

Unmittelbar nach Zugabe der vier VD und den drei BK wurden mittels CASA verschiedene Motilitätsparameter gemessen. Die gewonnenen Werte sind vergleichbar, liegen jedoch zumeist höher als in einer Vorgängerstudie aus gleichem Haus in der ebenfalls der Verdünner „CaniPlus Chill®“ zum Einsatz kam und mit dem SpermVision™ gemessen wurde (Goericke-Pesch et al., 2012). Vergleicht man die Daten mit anderen in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen, sind sowohl Werte oberhalb als auch unterhalb der hier erhobenen Daten zu finden. Eine Abhängigkeit von den Settings und dem verwendeten CASA-System (SpermVision™, HTR Ceros 12.1 semen analyzer, HTR Ivos version 10 analyzer, Strömberg-Mika Cellmotion analyzer) ist nicht auszuschließen. Eine Studie, die ebenfalls Messungen mittels SpermVision™ erhob (Schäfer-Somi und Aurich, 2007) erbrachte zwar ähnliche, aber durchweg höhere Werte. Eine Ausnahme stellt der Parameter ALH dar, der in vorliegender Arbeit höher gemessen wurde. Zu beachten sind die Einstellungen des Systems, die in einigen Punkten voneinander abweichen. Zum anderen kann der verwendete Verdünner, der sich in den Studien unterscheidet, eine gewisse Rolle spielen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Des Weiteren ist auch eine tendenziell niedrigere Spermaqualität nicht auszuschließen. Da diese Varianz der Ergebnisse auch bei verschiedenen Studien der AG Schäfer-Somi bei Verwendung gleicher Einstellungen des SpermVisions™ beobachtet wurde (Eulenberger et al., 2009; Koderle et al., 2009; Schäfer-Somi et al., 2006), scheint die individuelle Spermaqualität von entscheidender

Bedeutung zu sein, was den Einfluss der Einstellungen des SpermVision™ auf die Ergebnisse etwas relativiert.

Inwiefern die Verdünnung selbst eine Beeinflussung der Motilität zur Folge hat, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Arbeiten von verschiedenen Autoren konnten keinen Effekt der Verdünnung des Nativejakulats auf die Motilität verzeichnen (Rota et al., 1997; Sirivaidyapong et al., 2000b; Sirivaidyapong et al., 2000a). Weitere Autoren postulieren eine geringfügige Verschlechterung nach einer TRIS-Citrat-Eigelb-Verdünner (Oettlé, 1986) und TRIS-Fruktose-Eigelb-Verdünner Zugabe (Yildiz et al., 2000; Schäfer-Somi et al., 2006). Wieder andere Studien konnten direkt nach Zugabe des Verdünners eine initiale Motilitätssteigerung beobachten (Tsutsui et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Diese ist wahrscheinlich auf die Zufuhr von Nährstoffen zurückzuführen (Schäfer et al., 1997; Verstegen et al., 2005) und wurde bereits beschrieben (Verstegen et al., 2005; Busch und Waberski, 2007). In dieser Arbeit wurden lediglich die Testansätze direkt nach VD-Zugabe gemessen, weshalb hierzu keine Aussage getroffen werden kann.

Für Seminalplasma wurde ein nachteiliger Effekt auf die Motilität von flüssigkonservierten Rüdensperma dokumentiert (Rota et al., 1995). Dessen Verbleib in den Testansätzen könnte zu den niedrigeren Ausgangswerten beigetragen haben. In anderen Studien konnte diese Beobachtung nicht nachvollzogen werden (Sirivaidyapong et al., 2000b; Goericke-Pesch et al., 2012), weshalb auch im Rahmen dieser Versuche auf das Zentrifugieren und Abpipettieren des Seminalplasmas verzichtet wurde.

Insgesamt ist festzustellen, dass die Ausgangswerte der verwendeten Ejakulatpools im Vergleich mit anderen CASA-Systemen im Durchschnitt liegen. Allgemeine Referenzwerte für frisches flüssigkonserviertes Rüdensperma sind jedoch nicht verfügbar. Da die Testansätze untereinander nur gering variieren, ist die Ursache für Abweichungen von anderen Studien vermutlich in der Samenqualität der Rüden, dem VD und in den Systemeinstellungen und dem verwendeten CASA-System zu suchen.

Für die vorliegende Arbeit ist die Einordnung der Ergebnisse von geringerer Bedeutung, da es sich um Ausgangswerte handelt und insbesondere der zeitliche Verlauf in Hinblick auf die untersuchten Parameter von Interesse ist. Wichtig für die Interpretation innerhalb des Versuchs waren gleiche Voraussetzungen und ähnliche Ausgangswerte in allen Testansätzen.

Für die in dieser Arbeit ermittelten Verlaufswerte, sowohl für die Gesamtbeweglichkeit als auch die Vorwärtsbeweglichkeit, ergab sich ein klarer und signifikanter Abfall bei allen Testansätzen. So wurde in dieser Arbeit ein zum Teil starker Verlust (12 % bis 80 %) der Motilität innerhalb von 3 Tagen beobachtet.

Die Betrachtung der einzelnen Bewegungsparameter zeigte für die Streckenmessungen (DAP, DCL, DSL), die Geschwindigkeitsmessungen (VAP, VCL, VSL) und für ALH, nach einem initialen Anstieg, ebenfalls ein Absinken der Werte bis zum Versuchsende. Die Geradlinigkeit (STR) und Linearität (LIN) nahm insbesondere in den ersten 24 h ab und auch die übrigen Parameterwerte (WOB und BCF) fielen im Zeitverlauf unter die Ausgangswerte.

Eine Reduktion der Motilität im Verlauf der Lagerung wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (Bouchard et al., 1990; Kumi-Diaka und Badtram, 1994; Rota et al., 1995; Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Tsutsui et al., 2003; Verstegen et al., 2005; Hermansson und Linde Forsberg, 2006; Beccaglia et al., 2009a; Michael et al., 2009; Kmenta et al., 2011). Eine Ursache für die Verminderung der Motilität ist der Kälteschock (Busch und Waberski, 2007). Die Ausprägung des Abfalls variiert stark in Abhängigkeit von Autoren und verwendeten Verdünnern. So konnten Rijsselaere et al. (2004b) und Verstegen et al. (2005) in einem TRIS-Glukose-Eigelb Verdünner während einer 10 bzw. 5-tägigen Konservierung keine Motilitätseinbußen verzeichnen. Eine weitere Studie, die vergleichend vier verschiedene Verdünnern, darunter auch CaniPlus Chill®, im Vergleich über 10 Tage testete, dokumentierte einen Abfall der Beweglichkeit von 63 % (CaniPlus Chill) bis 75 % am Tag 0 bis hin zu 12 % bis 59 % (CaniPlus Chill) nach 10 Tagen. Analog sank die Vorwärtsbeweglichkeit von 52 % bis 68 % (60 % bei CaniPlus Chill) auf 2,5 % bis 48 % (CaniPlus Chill) (Goericke-Pesch et al., 2012). Andere Autoren beobachteten in ebenfalls TRIS basierten Verdünnern eine Motilitätsreduktion von 20 % bis 55 % innerhalb der ersten drei Tage (Province et al., 1984; Michael et al., 2009, 2010).

Mögliche Ursachen für diese Varianz sind die Aufbereitungsmethoden, die Konservierungstechnik und der Verdünner selbst (Bouchard et al., 1990; Lopes et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). Zuletzt kann auch die Messung selbst durch unterschiedliche Verfahren und Systeme die Resultate beeinflussen (Rijsselaere et al., 2003).

Wie oben bereits erwähnt, wird von manchen Autoren eine initiale Motilitätssteigerung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz dazu keine Zunahme dieser Parameter nachvollzogen werden. Es konnte aber, trotz des Absinkens der Gesamtbeweglichkeit, ein Anstieg einiger CASA-Parameter (DAP, DSL, DCL, VAP, VCL, VSL) innerhalb der ersten 24 h gemessen werden. Denkbar wäre eine Aktivitätszunahme die durch sich negativ auswirkende Faktoren überlagert wurde. Eine Steigerung von Strecken- und Geschwindigkeitswerten, ein erhöhter Zuckerverbrauch und eine höhere Stoffwechselrate stehen dabei in einem engen Zusammenhang mit dem Motilitätsanstieg (Ponglowhapan et al., 2004). Der hieraus resultierende Verbrauch an Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Ansammlung an Stoffwechselendprodukten könnten zu dem nachfolgenden Motilitätsabfall beitragen (Schäfer et al., 1997). Alternativ kann das an den Tagen eins, zwei und drei zum Einsatz gekommene CaniPlus Enhance®, als Resuspendierlösung der gekühlten Testansätze, die beobachtete Zunahme dieser Parameter erzeugt haben. Zwar ist die genaue Zusammensetzung nicht bekannt, es ist aber anzunehmen, dass analog zum Verdünner, der Mechanismus in einer Nähstoffzugabe liegt (Kmenta et al., 2011).

Vergleicht man die Motilität bei den vier VD untereinander, ist ein deutlicher Unterschied zwischen VD 4 mit 200 mg/l Gentamicin und den übrigen Gentamicinkonzentrationen sowohl graphisch ersichtlich als auch statistisch belegbar. Spermien der Testansätze, die mit dem im Versuch höchsten Antibiotikazusatz vermischt wurden, zeigten eine schnellere und stärkere Reduktion (bis 80 %) verschiedener Motilitätsparameter bis zum Versuchsende.

Gentamicin ist dafür bekannt, dass es sowohl das Gehör als auch Teile des Gleichgewichtsorgans und neuromuskuläre Verbindungen schädigen kann. Weiterhin wird Gentamicin eine renale Toxizität zugeschrieben. Auch wenn die zellulären Mechanismen, die für diese Nebenwirkung verantwortlich sind, noch nicht geklärt wurden, ist denkbar, dass diese Reaktionen auch für einen qualitätsmindernden Effekt im Sperma verursachen können (Jasko et al., 1993). In wieweit jedoch ein Antibiotikum oder im speziellen Gentamicin Vitalparameter von Spermien beeinflusst, ist in der Literatur für den Rüden kaum erforscht (Becher et al., 2013) und auch bei der Flüssigkonservierung von Hengst-samen noch nicht endgültig geklärt (Varner et al., 1998; Aurich und Spergser, 2007; Dean et al., 2012). Die beschriebenen Veränderungen beziehen sich dabei hauptsächlich

auf eine Abnahme motiler Spermien. Verdünner ohne antimikrobiellen Zusatz scheinen, zumindest beim Hengst, denen mit höherer Konzentration (1 g/l Gentamicin, 1000 IU/ml Polymixin B) überlegen (Jasko et al., 1993; Aurich und Spergser, 2007). Im Wesentlichen handelte es sich in diesen Versuchen bei den höheren Konzentrationen um Gentamicin-Zugaben, die mit 1000 mg/l deutlich über den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen lagen. Im Gegensatz hierzu konnte (Varner et al., 1998) bei derselben Menge Gentamicin noch keine Veränderungen feststellen. Ebenso hatte eine Gentamicinkonzentration von 250 mg/l keinen Einfluss auf die Qualität von Hengst- und Schafesperma (Price et al., 2008; Moustacas et al., 2010) In der vorliegenden Arbeit war hingegen bei einer Konzentration von 200 mg/l bereits ein deutlicher Motilitätsverlust zu beobachten. Andere Untersuchungen an Rüdensperma konnten im Gegensatz dazu keine Auswirkung eines gentamicinhaltigen Antibiotikagemisches GTLS (250 mg/l Gentamicin, 50 mg/l Tylosin, 150 mg/l Lincomycin und 300 mg/l Spectinomycin) verzeichnen. Auch die 2× und 4× Menge GTLS zeigte keine Veränderung der Motilität, auch wenn die Prozentzahl membranintakter Spermien geringfügig zurückging (Becher et al., 2013).

Zuletzt ist auch ein Einfluss des VD selbst, in dem das Gentamicin enthalten war, nicht auszuschließen. Hierfür sprechen die genannten Publikationen, bei denen erst mit höherer Gentamicinkonzentration ein schädlicher Einfluss auf das Sperma auftrat. Zudem konnten in nachfolgenden Versuchen (Goericke-Pesch, Sywall et al. 2015) mit analogem Aufbau und zum Teil höheren Gentamicinkonzentrationen, die Ergebnisse dieser Studie bezüglich des Gentamicineffekts nicht bestätigt werden. Da die VD mit den unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen von Minitüb vorgefertigt geliefert wurden, ist es wahrscheinlich, dass sie entweder unterschiedlichen Chargen entstammen oder Unterschiede Herstellung der Testansätze eine abweichende Beschaffenheit erklären können. So kommt auch eine Varianz der chemisch-physikalischen Eigenschaften für die Erhöhung der gemessenen Parameter in Frage (Foote und Leonard, 1964; Carr, 1985; Strzeżek und Fraser, 2009). Es wäre interessant gewesen, die einzelnen VD einer genaueren Analyse zu unterziehen.

Einen klaren Hinweis für einen, durch den Zusatz von *ECH* verursachten, negativen Effekt auf die verschiedenen Bewegungsparameter konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zwar zeigten insbesondere die vom CASA bestimmten Strecken- und

Geschwindigkeitsparameter eine signifikante Wechselwirkung zwischen der Lagerungsdauer und der BK, bei näherer Betrachtung der dazugehörigen Graphen sind die Unterschiede jedoch nur sehr gering und damit von fraglicher klinischer Relevanz. Hinzu kommt, dass die höchste Bakterienkonzentration zum Teil bessere CASA-Werte erzielte, als die niedrigeren Konzentrationen. Eine schlüssige Erklärung für diese Beobachtung konnte sowohl im Versuch als auch in der Literatur nicht gefunden werden. Widersprüchlich zu diesen Ergebnissen wurde von verschiedenen Autoren eine Reduktion der Motilität humaner Spermien durch die Inkubation mit *E. coli* (Diemer et al., 2000; Sanocka et al., 2004; Prabha et al., 2010) beschrieben. Ob die Veränderungen an den Spermien durch die Keime selbst verursacht wurden (Diemer et al., 2000; Sanocka et al., 2004) oder ob Toxine und andere Faktoren dafür verantwortlich waren (Paulson und Polakoski, 1977; Prabha et al., 2010; Schulz et al., 2010), wird kontrovers diskutiert. Die getesteten BK: ein Bakterien-Spermien-Verhältnis von 1:1 (Diemer et al. 1996) bzw. ab  $2 \times 10^5$  *E. coli* (Berktas et al. 2008), schienen hierbei eine wesentliche Rolle zu spielen (Diemer et al., 1996; Althouse und Lu, 2005; Berktas et al., 2008). Über die zeitliche Komponente waren unterschiedliche Angaben von wenigen Stunden (Diemer et al., 1996; Prabha et al., 2010) bis hin zu Tagen (Althouse et al., 2000; Yániz et al., 2010) zu finden. Zur Situation bei caninem Sperma ist nicht viel bekannt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen näher untersucht. Dabei lag die höchste Zugabe an Keimen über der in der Literatur beschriebenen, physiologischen Kontamination (Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Kustritz et al., 2005; Pesch et al., 2007; Schaefer-Somi et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). Dennoch konnte, sowohl direkt nach Zugabe als auch im weiteren Zeitverlauf, kein klarer Hinweis auf eine Beeinträchtigung der Spermienmotilität gezeigt werden. Ein Einfluss anderer bakterieller Kontaminanten, die im Ejakulat vorhanden waren, kann nicht komplett ausgeschlossen werden. Ein völliges Verschleiern des *ECH* Einflusses scheint jedoch unwahrscheinlich. Deshalb ist anzunehmen, dass der verwendete *ECH* bis zu einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  KBE/ml über die Dauer des Untersuchungszeitraumes keine schädliche Wirkung auf die Motilitätsparameter flüssigkonservierten Rüdenspermas ausübt. In wieweit dies auch für andere *E. coli*-Stämme mit gegebenenfalls anderen Virulenz-Faktoren gilt, bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 5.4.2 Anteil Lebender/Toter Spermien im Eosin-Ausstrich

Betrachtet man die Anzahl an ungefärbten Spermien im Eosin-Ausstrich, so konnten unmittelbar nach dem Zusatz aller Komponenten (VD und *ECH*) zum Zeitpunkt 0 im Durchschnitt  $75,1 \pm 3,2$  % lebende Samenzellen identifiziert werden. In der Literatur wird der Unterschied zwischen unverdünnten und verdünnten Ejakulaten als gering beschrieben (Burgess et al., 2000; Sirivaidyapong et al., 2000a; Koderle et al., 2009; Goericke-Pesch et al., 2012). Deshalb ist von einem ähnlichen Ausgangswert im Nativejakulat auszugehen. Vergleicht man den in dieser Arbeit ermittelten Wert mit der Literatur, ist dieser eher am unteren Referenzbereich einzuordnen (Pesch et al., 2006). Andere Autoren konnten mit bis zu 91,4 % lebende Spermien (Lopes et al., 2009) einen deutlich höheren Anteil an lebenden Spermien ermitteln (England und Allen, 1992; Iguer-ouada und Verstegen, 2001a; Michael et al., 2007). In einer größeren retrospektiven Studien von Goericke-Pesch et al. (2013), bei der 256 Hunde ausgewertet wurden, ergab sich ein Durchschnittswert von 86,3 % ungefärbten und damit lebenden Spermien. Im Gegensatz dazu dokumentierte England et al. (1999) in einem Versuch lediglich 68,7 % „normale, lebende Spermien.“ Dabei sind auch morphologisch veränderte Spermien ausgenommen.

Grund für die relativ niedrige Anzahl lebender Spermien in dieser Arbeit könnte in einer Unterschätzung liegen. Hierfür würde auch die zum gleichen Zeitpunkt festgestellte, höhere Motilität von 81 % sprechen. Diese Feststellung ist insofern nicht plausibel, als dass tote Spermien keine Eigenbewegung mehr aufweisen können. So sollte die Anzahl lebender Spermien die Anzahl beweglicher Spermien sogar eher überschreiten, da auch unbewegliche Spermien noch lebendig sein können (Verstegen et al., 2005; Kmenta et al., 2011). Daher ist anzunehmen, dass die Anzahl toter Spermien in dieser Arbeit falsch hoch geschätzt wurde. Eine mögliche Ursache stellt die Färbung dar. Bei dem zum Einsatz gekommenen Eosin-Ausstrich werden nur die toten Spermien und kein Hintergrund angefärbt, wie es bei der Eosin-Nigrosin Färbung der Fall ist. Dabei könnten die ungefärbten Spermien durch mangelnden Kontrast zum Hintergrund unterschätzt wurden sein (Dott und Foster, 1972). Zum anderen könnten partielle Färbungen (Hancock, 1956; Rijsselaere et al., 2005) und undeutlich angefärbte Kappenveränderungen (Dott und Foster, 1972) zu einer Überschätzung des Anteils toter Spermien geführt haben. Faktoren wie eine präparationsbedingte Schädigung oder die Subjektivität durch den

Untersucher wurden versucht auszuschließen, indem eine Wiederholung und Wertung der Färbung durch andere Untersucher stattfand. Eine sensitivere Methode zur Beurteilung der Viabilität wäre die SYBR-14/PI Färbung (Rijsselaere et al., 2005), die allerdings hier nicht zum Einsatz kam. Eine abschließende Klärung dieses verhältnismäßig niedrigen Werts war nicht möglich.

Die Analyse des Lebend-Tot-Verhältnisses im Eosin-Ausstrich im Zeitverlauf ergab ein ähnliches Bild wie der Motilitätsverlaufs. Am Tag 0 lagen die Werte der einzelnen Testansätze, wie oben beschrieben, dicht beisammen. Bis zum Ende des Versuchs reduzierte sich der Anteil lebender Spermien kontinuierlich. Eine Reduktion der lebenden Spermien wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Der Zeitraum umfasst dabei wenige Tage bis drei Wochen (Rota et al., 1995; Rijsselaere et al., 2002; Tsutsui et al., 2003; Ponglowhapan et al., 2004; Hermansson und Linde Forsberg, 2006; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Michael et al., 2009, 2010; Kmenta et al., 2011).

Während des Untersuchungszeitraums zeigte sich eine deutliche Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen, die auch statistisch belegt werden konnte. Hierbei zeigten die Testansätze, die mit VD 4 versetzt wurden, die deutlichste Abnahme des Anteils lebender Spermien und damit niedrigsten Endwerte im Versuch. In anderen Arbeiten ließ sich dieses Verhalten nicht nachvollziehen. Wie bei der Motilität detailliert diskutiert, war ein negativer Einfluss erst bei Gentamicinkonzentrationen von 1000 mg/l nachweisbar (Jasko et al., 1993; Aurich und Spergser, 2007). Für Rüdensperma konnte zwar mittels SYBR-14/PI eine geringe Abnahme des Prozentsatzes membran-intakter Spermatozoa nach 72 h Flüssigkonservierung beobachtet werden, jedoch handelte es sich um einen Verdünner mit einem Antibiotikagemisch und der Effekt war nur ab einer Konzentration von 500 mg/l Gentamicin, 100 mg/l Tylosin, 300 mg/l Lincomycin und 600 mg/l Spectinomycin nachweisbar. Dieselbe Kombination mit der halben Dosis zeigte hingegen keinen Effekt (Becher et al., 2013).

Damit stellt sich die Frage, ob tatsächlich Gentamicin oder doch andere Komponenten für die Abnahme der lebenden Spermien verantwortlich waren. Auch in dem bereits erwähnten, unveröffentlichten Nachversuch (Goericke-Pesch, Sywall et al. 2015) konnte der hier beschriebene negative Einfluss von Gentamicin nicht belegt werden. Somit

kommen, wie bereits diskutiert, auch andere Faktoren und Eigenschaften des VD in Frage, die zu dem Abfall geführt haben können.

Ein Einfluss der zugesetzten BK konnte, wie auch bei der Motilität, nicht festgestellt werden. Und auch wenn Untersuchungen an humanem Ejakulat eine vermehrte Apoptose durch die Co-Inkubation mit *E. coli* zeigten (Villegas et al., 2005), ergaben sich bisher keine Hinweise die für ein vermehrtes Absterben der Spermien und auf eine vergleichbare Situation beim Hund sprechen (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Goericke-Pesch et al., 2011),

Weiterhin war bei Betrachtung der Ergebnisse zu beobachten, dass, wie bereits zum Zeitpunkt 0 die Viabilität durchschnittlich unterhalb der Anzahl motiler Spermien lag. Da sich diese Beobachtung zu jedem Untersuchungszeitpunkt zu finden war, sind die Daten, zumindest in Relation zueinander, verwertbar.

### **5.4.3 Pathomorphologie und Kappenveränderungen**

Die Morphologie der Spermien hat neben der Motilität einen direkten Einfluss auf die Fertilität des Samens (Verstegen et al., 2002). Auch eine Untersuchung der Kopfkappen auf die akrosomale Integrität, die nicht immer mit der Motilität korreliert, ist eine wichtige und ergänzende Untersuchung (Oettlé, 1986). Deshalb wurde dieser Test auch in dieser Arbeit herangezogen. Für die mikroskopische Beurteilung wurde von jedem Testansatz ein Spermac®-Präparat angefertigt und bei 1000× Vergrößerung mit Öl-Immersion betrachtet (Oettlé, 1986; Riesenbeck et al., 2001; Waberski und Petrunkina, 2007). Ein Vergleich der pathomorphologischen Veränderungen mit der Literatur ist nur bedingt möglich, da in den meisten Veröffentlichungen die Spermienmorphologie und der Zustand des Akrosoms getrennt betrachtet wurden. In dieser Untersuchung erfolgte hingegen eine kombinierte Bewertung der beiden Parameter. Dadurch wurde jedes Spermium nur einmal gezählt und nur die schwerste Schädigung dokumentiert.

Trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit liegen die erhobenen Werte zum Zeitpunkt 0 in einem Bereich, der auch in der Literatur angegeben wird. In einer retrospektiven Studie zur Spermienanalyse beim Rüden wurden in 21,5 % der Spermien morphologische Abweichungen gezählt (Goericke-Pesch und Failing, 2013). Dabei nahmen Veränderungen der Geißel mit 9,5 % den größten Anteil der Anomalien ein. Zytoplasmotrop-

fen traten bei 3 %, lose Köpfe bei 2 % und Kopfveränderungen bei 0,5 % der Spermien auf. Zudem zeigten 1,5 % der Spermien Akrosomveränderungen. Andere Autoren kamen mit 79,6 % unveränderten Spermien zu ähnlichen Ergebnissen (Rijsselaere et al., 2004a) und Günzel (2007) gibt einen Referenzwert im Rüdenejakulat von 10 - 25 % Anomalien an. Als Richtwert, insbesondere für die Kryokonservierung, sollten 30 % morphologisch veränderte Spermien nicht überschritten werden (Hoffmann, 2003; Waberski und Petrunkina, 2007). Fällt die Anzahl unter 60 % ist mit einer Beeinträchtigung der Fertilität zu rechnen (Oettté, 1993).

Eine negative Beeinflussung der Werte durch die Präparation und Färbung (z. B. Osmolarität der Lösung), wie von Root Kustritz beschrieben (Root-Kustritz et al., 1998; Root-Kustritz, 2007), kann nicht vollends ausgeschlossen werden. Es wurde jedoch versucht, die Spermien während der Analysen möglichst schonend zu behandeln.

Betrachtet man die Gesamtzahl an aufgetretenen, morphologischen Veränderungen direkt nach dem Anmischen genauer, so ist mit wachsender Gentamicinkonzentration und *ECH*-Konzentration ein Anstieg abgeknickter und aufgerollter Spermischwänze festzustellen. Die übrigen Parameter variierten in einem deutlich geringeren Maß.

Die mit steigender Gentamicinkonzentration verbundene Zunahme veränderter Spermiengeißeln ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Generell wird der Einfluss von Antibiotika auf Spermien kontrovers diskutiert (Varner et al., 1998; Aurich und Spargser, 2007; Dean et al., 2012). Einige Studien zeigten zwar eine Abnahme motiler Spermien durch die Zugabe verschiedener Antibiotika, unter anderem auch Gentamicin, (Wales und White, 1962; Jasko et al., 1993; Varner et al., 1998; Aurich und Spargser, 2007), die Morphologie wurde dabei aber nicht weiter untersucht. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Antibiotikakonzentrationen, unter denen zumindest die Motilitätsabnahmen auftraten, deutlich über den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen lagen (Aurich und Spargser, 2007). Andererseits ist auch hier wieder eine unterschiedliche Beschaffenheit der VD, die diese Veränderungen verursachen, zu diskutieren. Die Zunahme der Geißelveränderungen könnte auf eine veränderte Osmolarität des Mediums hindeuten, was ebenfalls weitere Ergebnisse erklären könnte.

Wie in der Literatur beschrieben und auch in dieser Arbeit nachgewiesen, sind *E. coli* im Rüdensperma eine häufige Kontaminante (Johnston, 1991; Bjurström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et al., 2006; Goericke-Pesch et al., 2011). Dennoch konnte bisher kein eindeutiger, negativer Einfluss auf die Samenqualität beim Hund festgestellt werden (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Goericke-Pesch et al., 2011). Eine Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit zum Zeitpunkt 0 lässt jedoch einen Trend vermuten. Es konnten in dieser Arbeit sowohl vermehrt Kappenveränderungen als auch Geißelveränderungen gefunden werden. Die vorhandene Konzentration lag allerdings deutlich über der Dosis, die in der Literatur untersucht wurde.

In der menschlichen Reproduktionsmedizin konnten bereits Mikroorganismen für Veränderungen der Spermienmorphologie verantwortlich gemacht werden (Sanocka-Maciejewska et al., 2005). *E. coli* ist einer der wichtigsten Erreger, der aus humanen Ejakulaten isoliert werden konnte und einen negativen Effekt auf die Spermienmotilität und Morphologie hatte (Diemer et al., 1996; Diemer et al., 2000; Sanocka et al., 2004). Bezüglich der Morphologie waren oberflächliche Strukturen, wie zum Beispiel die Plasmamembran vom Mittelstück und Hals als auch die Kopfkappe (Diemer et al., 1996; Diemer et al., 2000) betroffen, wodurch es auch zu einem Aufrollen der Geißel und einer Immobilisation kommen kann (Prabha et al., 2010). Zusätzlich war ein Anschwellen des Zytoplasmas und eine Invagination der Geißel sowie ein Defekt der inneren und äußeren Akrosomenmembran zu beobachten (Diemer et al., 2000). Diese durch *E. coli* hervorgerufenen Schäden könnten auch die in dieser Arbeit erhöhte Anzahl an veränderten Samenzellen erklären, auch wenn eine Immobilisation nicht nachzuvollziehen war. Es ist zu beachten, dass durch das Verfahren der Lichtmikroskopie, wie in dieser Arbeit eingesetzt, nur eine begrenzte Auflösung möglich ist, weshalb feinere ultrastrukturelle Veränderungen, wie von Diemer et al. (1998, 2000) beschrieben, unter Umständen nicht detektiert werden konnten. Eine weiterführende elektronenmikroskopische Untersuchung wäre in dieser Hinsicht aufschlussreich.

Betrachtet man die Einwirkzeit der Bakterien auf die Spermien, betrug diese in den Versuch dieser Arbeit zum Zeitpunkt 0 nur wenige Sekunden. Die von Diemer et al. (2000) beschriebenen Veränderungen wurden hingegen nach 4 - 6 h festgestellt. Durch die Zugabe eines aus *E. coli* extrahierten Spermatozoal Immobilization Factor (SIF) konnte bei hohen Konzentrationen eine Immobilisation und zum Teil schon nach 20 Sekunden eine spermizide Reaktion festgestellt werden (Prabha et al., 2010). Auch wenn in dieser Ar-

beit keine vermehrte Immobilisation eines Testansatzes mit hoher BK zum Zeitpunkt 0 beobachtet werden konnte, so ist damit dennoch eine Sofortreaktion für die morphologischen Veränderungen denkbar. Der beschriebene Faktor (SIF) ist sowohl hitze- als auch kälteresistent (Paulson und Polakoski, 1977). Somit könnte er während der Herstellung der Inokulate akkumulieren und mit diesen zu den einzelnen Proben hinzugegeben worden sein. Ein vermehrtes Absterben durch SIF ist nicht bekannt (Paulson und Polakoski, 1977) und wurde auch in dieser Arbeit nicht beobachtet. Für das Einwirken eines solchen Faktors oder Toxins spricht zudem, dass trotz der Anwesenheit des Antibiotikums im Versuch keine Minderung der Anzahl veränderter Spermien zu verzeichnen war.

Auch bei Schafböcken und Schweinen kann *E. coli* die Fertilität beeinträchtigen. Bei Schweinen kommt es zu vermehrter Agglutination und verminderter Wurfgröße ab einer Konzentration von  $3,5 \times 10^3$  KBE/ml (Maroto Martín, Luis O et al., 2010). Bei Konservierung sind die Schäden jedoch erst nach eins bis zwei Tagen sichtbar (Althouse et al., 2000).

Betrachtet man die morphologischen Spermien-Veränderungen im Zeitverlauf, konnte in verschiedenen Arbeiten bereits eine Abnahme des Gesamtanteils intakter Spermien während der Flüssigkonservierung in einem TRIS- Fruktose/Glukose- Eigelb Verdünner festgestellt werden (England und Ponzio, 1996; Tsutsui et al., 2003; Rijsselaere et al., 2004b; Michael et al., 2010; Kmenta et al., 2011). Die Dauer der Lagerung variierte dabei zwischen 3 bis 12 Tagen. Dies bestätigte sich auch in einer Vorgängerstudie, die verschiedene Verdünner, unter anderen auch CaniPuls Chill, über 10 Tage hin untersuchte und dabei in allen Proben einen signifikanten Anstieg des Anteil morphologisch veränderter Spermien fand (Goericke-Pesch et al., 2012). Entgegen dieser Aussagen wird nach Rijsselaere et al. (2002) durch eine dreitägige Lagerung bei 4 °C der Anteil abnormer Spermien nicht verändert. Ein absoluter Vergleich der vorliegenden Arbeit mit anderen Versuchen ist, wie oben geschrieben, nicht möglich. Dennoch ist auch in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der morphologisch veränderten Spermien nachzuvollziehen. Dabei steigt die Anzahl über den gesamten Untersuchungszeitraum in allen Testansätzen auf bis zu 45 % an. Als wichtigste Ursache für die Zunahme der Veränderungen wird von Burgess et al. (2000) die Kühlung des Samens angesehen. So kann sowohl durch sofortige als auch durch verzögerte Effekte die Ultrastruktur der Spermien beschädigt

und damit die Langlebigkeit und die Akrosomintegrität beeinträchtigt werden (Burgess et al., 2000).

Betrachtet man die Einzelparameter der pathomorphologischen Untersuchung, wird ersichtlich, dass in der vorliegenden Arbeit primär der Spermienhals und die Geißel in ihrer Form nachteilig beeinflusst wurden. Alle Testansätze zeigten im Zeitverlauf einen signifikanten Anstieg der Geißelveränderungen. Auch in anderen Arbeiten wurde eine Zunahme abnormaler Geißel dokumentiert (Tsutsui et al., 2003; Goericke-Pesch et al., 2012). Goericke-Pesch und Klaus et al. (2012) stellten dabei insbesondere eine signifikante Zunahme schleifenförmiger Geißel im Zeitverlauf fest. In dieser Arbeit wurden die Geißelveränderungen nicht genauer aufgeschlüsselt. Insgesamt lässt sich aber vermuten, dass die Flüssigkonservierung von Sperma einen negativen Einfluss auf deren Morphologie ausübt. Ohne geeigneten Verdünner läge dieser Anteil jedoch noch höher (Tsutsui et al., 2003).

Neben diesem Zeiteffekt konnte in den vorliegenden Versuchen auch durch die zugegebenen *ECH* ein signifikanter Einfluss auf die Gesamt-Pathomorphologie beschrieben werden. Somit konnte die zum Zeitpunkt 0 diskutierte Tendenz, dass eine höhere *ECH* Konzentration die Spermienmorphologie negativ beeinflusst auch im weiteren Zeitverlauf nachvollzogen werden. Dabei war in den Testansätzen, die mit der höheren Menge an *ECH* versetzt wurden, ein höherer Anteil morphologisch veränderter Spermien als in den Testansätzen mit geringerer oder ohne weitere mikrobielle Inokulation.

Auch bei einzelnen Parametern konnte eine signifikante (Halsveränderungen) bzw. tendenzielle (lose Spermienköpfe) Erhöhung des Anteils morphologischer Veränderungen nach Bakterienzugabe ermittelt werden. Eine Reduktion der Motilität, wie für humanes Ejakulat beschrieben, blieb jedoch aus. Als Ursache kommt der eher geringe prozentuale Anteil der Veränderung in Frage. Zudem blieben die Geißelveränderungen von den BK weitestgehend unbeeinträchtigt.

Neben einer direkten Interaktion der Bakterien mit den Spermien, ist auch eine Beeinträchtigung durch mikrobielle Toxine und andere Faktoren denkbar. Hierzu gehören: hämolysine, Shiga-like Toxine und Lipopolysaccharide (Diemer et al., 2000; Schulz et al., 2010) sowie der oben erwähnte SIF (Spermatozoal Immobilization Factor) (Paulson und Polakoski, 1977; Prabha et al., 2010). Das Vorhandensein solcher Stoffe könnte erklären,

weshalb trotz des Antibiotikums, welches den mikrobiellen Schäden vorbeugen soll, sich kein sichtbarer Vorteil gegenüber dem Verdünner ohne Antibiotikum eingestellt hat.

Auch beim Eber liegen kontroverse Ergebnisse vor. Maroto et al. (2010) und Althouse et al (2000) zeigten eine Beeinträchtigung von Eberejakulaten durch *E. coli*. Dem entgegen konnten Ubeda et al. (2013) keine Abweichungen zu einer keimfreien Probe finden.

Eine weitere mögliche Erklärung der kontroversen Ergebnislage liegt in dem verwendeten Bakterienstamm. Versuche bei Mäusen (Kaur und Prabha, 2014) und an humanen Spermien (Boguen et al., 2014) ergaben unterschiedliche Effekte verschiedener *E. coli* Stämme und Serovare in Hinblick auf Motilität, Viabilität, Morphologie und Fertilität. Der in dieser Arbeit verwendete *ECH* Stamm wurde zwar aus dem Urogenitaltrakt eines Hundes extrahiert, eine genaue Typisierung wurde jedoch nicht vorgenommen. So konnte in einer Studie, die mittels Immunelektrophorese die Fimbrien von humanen uropathogenen *E. coli* mit denen von Rüden verglich, gezeigt werden, dass die Adhesine unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen und sich die untersuchten Stämme damit in ihren Merkmalen unterschieden (Garcia et al., 1988). Zur Klärung der Problematik wären weiterführende Untersuchungen mit unterschiedlichen *E. coli* Stämmen beim Hund mit Fokus auf deren Einfluss auf unterschiedliche Samenparameter nötig.

Die Integrität des Akrosoms ist für die Kapazitation und die folgende AR und damit für die erfolgreiche Befruchtung überaus wichtig (De Los Reyes et al., 2009). In wieweit die Zugabe des Verdünners das Akrosom beeinflusst, ist strittig. In manchen Versuchen ließ sich ein Effekt erkennen (Oettlé, 1986; Rota et al., 1995), in anderen konnte wiederum keine Auswirkung nachvollzogen werden (Burgess et al., 2000; Sirivaidyapong et al., 2000a). Als Ursache für unterschiedliche Ergebnisse kommt der Einsatz verschiedener Verdünner in Frage. Bei einem Vergleich von vier Verdünnern stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen heraus (Goericke-Pesch et al., 2012).

Auch die Lagerung bei 4 °C kann die Integrität des Akrosoms beeinflussen. So nahm diese in den Versuchsdurchläufen in allen Testansätze kontinuierlich ab. Es ist wahrscheinlich, dass neben hohen Kalziumkonzentrationen (Sirivaidyapong et al., 2000a; Cortes et al., 2006) auch durch die Kühlung und Lagerung entstandene ultrastrukturelle Schäden eine AR ausgelösen (Oettlé, 1986; Burgess et al., 2000). Deshalb tritt die Kapazitation der Spermien in verdünntem Sperma früher ein als im nativen Sperma (Kumi-Diaka und

Badtram, 1994). Während nach Kumi-Diaka und Badtram (1994) die Fertilität hierbei nicht leidet, behaupten Iguer-Ouada und Verstegen (2001), dass die Befruchtungsfähigkeit mit zunehmender AR abnimmt.

Die Verwendung eines Verdünners senkt die Anfälligkeit der Spermien für eine Schädigung des Akrosoms bei 37 °C und 20 °C (Sirivaidyapong et al., 2000b), kann diese aber auch während der Lagerung bei 4 °C nicht gänzlich vermeiden (Tsutsui et al., 2003). Insbesondere Eigelb (Iguer-ouada und Verstegen, 2001b; Witte et al., 2009) und LDL (Bencharif et al., 2013) sind für diesen protektiven Effekt verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Einsatz von Eigelb verzichtet, da dieses nach Gebrauchsanweisung des VD für eine Lagerung bis fünf Tage lediglich optional ist (Minitüb GmbH). Dennoch kam es im Zeitverlauf zu einer signifikanten Abnahme intakter Kopfkappen. Auch zahlreiche andere Autoren konnten in z. T. vergleichbaren, eigelbhaltigen Verdünnern mittels Spermac® oder Fluoreszenz (FITC-PNA) einen Anstieg von Kappenveränderungen beobachten (England und Ponzio, 1996; Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007; Michael et al., 2010; Goericke-Pesch et al., 2012). Der prozentuale Anteil intakter Akrosomen variierte dabei zwischen 24 % nach 3 Tagen (Michael et al., 2010) und 10 % (Goericke-Pesch et al., 2012) bis 53 % (Shahiduzzaman und Linde Forsberg, 2007) nach zehn Tagen. Eine weitere Veröffentlichung konnte erst nach 3 Tagen mittels Floreszenz (FITC PNA) einen signifikanten Anstieg von circa 5 % veränderter Kappen auf 35 % nach 23 Tagen nachweisen (Ponglowhapan et al., 2004). Andere Autoren wiederum konnten in ihren Versuchen während der Lagerung bei 4 °C keine Zunahme veränderter Kopfkappen innerhalb von 4 Tage mittels Fluoreszenz (c-FDA/PI) (Rota et al., 1995) und 3 Tage mittels Fluoreszenz (FITC PSA) (Rijsselaere et al., 2004b) feststellen. Für den Verlust der Kopfkappe im Zeitverlauf gab es in der vorliegenden Arbeit lediglich eine Tendenz. Auch Iguer-Ouada und Verstegen (2001) beschrieben lediglich eine leichte Zunahme über neun Tage.

Für einen Einfluss der BK gab es bei der Integrität der Kopfkappen eine leichte, jedoch nicht signifikante Tendenz zu vermehrt auftretenden Schäden bei höherer *ECH*-Konzentration. Mögliche Ursachen zur Schädigung des Akrosoms durch *E. coli* wurde zum Zeitpunkt 0 bereits diskutiert. Daneben scheint auch der von *E. coli* sezernierte Faktor SIF (sperm immobilization factor) eine Schädigung aller oberflächlichen Strukturen zu verursachen (Prabha et al., 2010). In wieweit sich die in dieser Arbeit beschriebene Tendenz auf die inokulierten *ECH* zurückführen lässt oder eher ein Zufallsbefund ist,

kann nicht abschließend beurteilt werden und erfordert weiterführende Untersuchungen. Zudem ist zu klären, inwieweit SIF bei hundeassoziierten *E. coli* eine Rolle spielt.

Für den Parameter Gentamicin konnte in Hinblick auf Pathomorphologie und Veränderungen der Kopfkappen kein Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen gefunden werden. In der Literatur sind hierzu kaum Daten veröffentlicht. Eine Untersuchung, bei der verschiedene Konzentrationen eines Antibiotikagemisches (max.: 1000 mg/l Gentamicin, 200 mg/l Tylosin, 600 mg/l Lincomycin und 1200 mg/l Spectinomycin) getestet wurden konnte keinen Unterschied in der Morphologie zwischen den Gruppen feststellen. (Becher et al., 2013). Auch in den Nachversuchen der vorliegenden Arbeit (Goericke-Pesch, Sywall et al. 2015) konnten diese Ergebnisse nochmals bestätigt werden.

#### **5.4.4 Ergebnisse des Hypoosmotischen Schwelltests**

Die Integrität der Plasmamembran wurde mit Hilfe des HOS-Tests bewertet. Er stellt eine einfache, schnelle und preiswerte Methode dar, um eine Aussage über die funktionelle Beschaffenheit der Spermienmembran zu treffen (Kumi-Diaka, 1993). Durch Verbringen der Spermien in eine hypoosmotische Lösung wird ein Zustrom von Wasser durch das Plasmalemma erzeugt, der zu einem Ausgleich des osmotischen Gradienten führt. Die Folge ist ein Anschwellen der Zellen, welches sich hauptsächlich in einem Aufrollen der Spermenschwänze („curled tail“) äußert. Nur bei einer funktionell intakten Spermienmembran kommt es durch den Transport von Wasser in das Zellinnere zu dieser Schwellung (Jeyendran et al., 1984).

Die erhobenen Werte zum Zeitpunkt 0, direkt nach Verarbeitung, liegen im Durchschnitt dicht beisammen. Eine sofortige Reaktion in Form einer Schädigung der Plasmamembran durch die getesteten Parameter ist somit nicht ersichtlich. Die verhältnismäßig hohe Standardabweichung beruht vermutlich auf der unterschiedlichen Qualität der verwendeten Ejakulate. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen für den Anteil membranintakter Spermien, muss beachtet werden, dass diverse Protokolle für die Herstellung hypoosmolarer Lösungen verwendet werden. Die Osmolarität der Lösungen schwankt zwischen 60 mosmol/l (Kumi-Diaka, 1993) 100 mosmol/l (Bencharif et al., 2013) und 150 mosmol/l (De Souza et al.,

2007; Miß, 2012). Die Anzahl an Versuchen mit vergleichbaren Bedingungen, bei denen direkt nach Zugabe eines TRIS-Verdünners ein HOS-Test durchgeführt wurde, ist sehr gering. Goericke-Pesch et al. (2012) dokumentierten je nach Verdünner zwischen 4 % und 8 %, eine vergleichsweise geringe Anzahl an nicht aufgerollten Schwänzen („not curled“). Zieht man Nativejakulate zum Vergleich hinzu, sind Werte zwischen 4 und 6,5 % „non curled tails“ beschrieben (Lopes et al., 2009; Goericke-Pesch und Failing, 2013), bei Verwendung einer 60mOsm Lösung 9,45 % geschädigte Spermien (Michael et al., 2010).

Der Vergleich mit unverdünntem Sperma kann allerdings nicht ohne Vorbehalt erfolgen. In verschiedenen Arbeiten wird eine Verschlechterung der Werte durch die Zugabe des Verdünners diskutiert (Rota et al., 1995). Nach Klaus (2012) und Goericke-Pesch et al. (2012) ist beim Vergleich der Nativprobe mit der frisch verdünnten ungekühlten Probe bereits ein signifikanter Abfall von bis zu 7 % der membranintakten Spermien festzustellen. Inwiefern die These auch auf diese Arbeit übertragen werden kann, bleibt offen, da das Nativejakulat nicht auf die funktionelle Membranintegrität hin untersucht wurde. Für den weiteren Versuchsdurchlauf war es lediglich wichtig, dass gleiche Voraussetzungen und ähnliche Ausgangswerte in allen Testansätze vorherrschen, um eine Interpretation innerhalb des Versuchs zu gewährleisten.

Die Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit im Zeitverlauf zeigt einen deutlichen und signifikanten Anstieg der nicht aufgerollten Schwänze über den gesamten Versuchszeitraum. Hiervon waren alle Testansätze betroffen. Nach Kumi-Diaka (1993) wirkt sich die Lagerung von Sperma auf die Fähigkeit auf den HOS-Test zu reagieren, negativ aus. Auch andere Autoren konnten während der Flüssigkonservierung einen Abfall der Anzahl funktionell intakter Spermienmembranen nachweisen (Rota et al., 1995; Lopes et al., 2009; Michael et al., 2010). Dem entgegen konnte in einer Studie über Lagerungseinflüsse innerhalb von 24 h auf canines Sperma keine Verschlechterung der Membranintegrität festgestellt werden (Kumi-Diaka und Badtram, 1994). Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, auch wenn ein Anstieg der „non curled“ Spermiengeißeln insbesondere zum Ende der Versuche ersichtlich war.

Die Unterschiede im Grad der Veränderung im Vergleich zu anderen Studien könnten, wie oben erwähnt, auf unterschiedlich osmolaren HOS-Lösungen, unterschiedlicher Einwirkzeit und anderen unterschiedlichen Ausgangsbedingungen beruhen.

Über den Einfluss von Gentamicin auf den HOS-Test ist in der Literatur nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein stärkerer Anstieg nicht aufgerollter Geißeln bei den Testansätzen, die mit VD 4 versetzt wurden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist unbekannt. Eine Analogie zur Gehör-, Gleichgewichts-, und Nierentoxizität von Gentamicin, wie zuvor beschrieben, ist möglich (Jasko et al., 1993). Andererseits konnte der Effekt in den bereits erwähnten Nachversuchen (Goericke-Pesch, Sywall et al. 2015) nicht wiederholt werden, weshalb auch andere, verdünnerassoziierte Faktoren, wie veränderte Verdünnerosmolarität, in Betracht gezogen werden müssen.

Die Zugabe unterschiedlicher Mengen an *ECH* zeigte keinen erkennbaren Einfluss auf die Membranfunktion. In der Literatur ist hierüber kaum etwas bekannt. Beim Eber konnte bei einer Keimkonzentration von 500 KBE/ml *E. coli* im Sperma keinen gesteigerten Qualitätsverlust im HOS-Test nachgewiesen werden (Boguen et al., 2014). Eine weitere Arbeit am Schwein bestätigt diese Ergebnisse bei einer ähnlich hohen *E. coli* Keimzahl (Ubeda et al., 2013). Dabei blieben allerdings auch die übrigen untersuchten Parameter wie Motilität, Morphologie und Akrosom-Integrität von einer Beeinträchtigung durch die Bakterien unbeeinflusst. Deshalb kann erneut diskutiert werden in wieweit eine *E. coli* Kontamination im Rüdensperma generell keinen vermindernden Einfluss auf den HOS-Test hat, oder lediglich der hier verwendete Stamm. Zur Klärung der Frage sind weitere Studien notwendig.

#### **5.4.5 Bakteriologische Analyse**

Der letzte Punkt der Untersuchung befasst sich mit der quantitativen bakteriologischen Analyse der verschiedenen Testansätze. Insgesamt wurden drei verschiedene BK untersucht, die im Zeitverlauf durch die Anwesenheit von vier verschiedenen Gentamicinkonzentrationen im Wachstum beeinflusst wurden. Erwartungsgemäß zeigten die Testansätze mit der höchsten *ECH*-Inokulation die stärkste Keimbelastung und auch die unterschiedlichen Gentamicinkonzentrationen führten, gestaffelt nach ihrer Dosis, zu einer Keimreduktion. Alle Testansätze zeigten über den Versuchszeitraum hinweg einen Ab-

fall der Anzahl keimbildender Einheiten. Auch ohne antimikrobielle Komponente war eine gewisse Reduktion der Bakterien zu sehen.

Für ein sicheres Abtöten einer hohen *ECH* Kontamination reichten Gentamicinkonzentrationen von 0 mg/l, 20 mg/l und 100 mg/l nicht aus. Erst bei einer Konzentration von 200 mg/l Gentamicin konnten bei hohem *ECH* Zusatz nach 24 h nur noch Einzelkolonien detektiert werden.

Im Allgemeinen wirken Antibiotika bei einer Temperatur von über 15 °C. Damit ist ihre Wirkung in flüssigkonservierten Samen auf die Zeitdauer des Herabkühlens beschränkt was, je nach Kühlrate 3 – 6 h beträgt. Danach ist mit keiner weiteren Wirksamkeit zu rechnen (Kayser et al., 1992; Aurich und Spargser, 2007). Eine andere Studie konnte eine stark reduzierte bakterizide Wirkung von circa 50 % bei 7 °C innerhalb von 22 h bei verschiedenen Antibiotika, unter anderem auch Gentamicin, nachweisen (Trauba et al., 1983). Vergleicht man die Keimzahlen ohne und mit Gentamicin, wird deutlich, dass auch in diesem Versuch die stärkste Bakterienreduktion innerhalb der ersten 24 h erfolgte. Aber auch danach konnte eine weitere Keimreduzierung erreicht werden. Neben einer bakteriziden Restwirkung könnten eine Schwächung der Keime und suboptimalen Wachstumsbedingungen, wie die Lagerung bei 4 °C, zu einem weiteren Absterben geführt haben. Weiterhin können Faktoren, die auch bei den gentamicinfreien Testansätzen zu einer Keimreduktion geführt haben, bei den gentamicinhaltigen Testansätzen Einfluss genommen haben. In verschiedenen Arbeiten konnte eine gewisse antimikrobielle Komponente des Seminalplasmas nachgewiesen werden (La Vignera et al., 2011). Sowohl beim Menschen (Edstrom, A. M. L. et al., 2008) als auch beim Schwein (Strzeżek et al., 1987) scheinen zinkbindende Proteine für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Zudem wird auch für Prostatosomen (Vivacqua et al., 2004) und andere Proteine (Kordan et al., 1998; Bourgeon et al., 2004) eine antibakterielle Komponente diskutiert. Obwohl über den Einfluss von zinkbindenden Proteinen im caninen Seminalplasma derzeit noch nicht viel bekannt ist (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2014), konnte ebenfalls eine keimwachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden (Fair und Wehner, 1973). In den Versuchen dieser Arbeit wurde auf eine Zentrifugation der Ejakulate verzichtet. Damit verblieb auch das Seminalplasma in den Testansätzen und könnte die bakterizide Wirkung insbesondere in den Testansätzen ohne Antibiotikum erklären. Andererseits können auch die inokulierten *ECH* in Folge des Gefrierprozesses eine geringere Viabilität aufweisen. Verschiedenste Faktoren, wie z.B. das Kryoprotektant, die Abkühlungsrate,

der pH-Wert, das Auftauregime und bakterienspezifische Eigenschaften können die Effektivität der Konservierung beeinflussen (Hubálek, 2003). Zwar überleben viele Mikroorganismen ein Einfrieren, allerdings können daraus resultierende Schäden die Viabilität senken (Speck und Ray, 1977). In wieweit diese Faktoren auch auf die *ECH* der vorliegenden Versuche Einfluss genommen haben, konnte nicht näher differenziert werden. Ein separates Anzichten der eingefrorenen Stämme bei jedem Versuchsdurchlauf sollte jedoch eine gewisse Viabilität der Keime kontrollieren. Nicht zuletzt können auch suboptimale Bedingungen in den VD zu einem Abfall der Keimzahl geführt haben.

Wie bereits mehrfach beschrieben, ist die Gewinnung des Ejakulates mittels manueller Stimulation kein steriles Verfahren. So konnten auch in dieser Arbeit verschiedene, nativ im Samen vorkommende Bakterien identifiziert werden. Unter anderem handelte es sich dabei auch um hämolysierende Streptokokken und hämolysierende *E. coli*. Damit ist zu erklären, weshalb es auch in den Testansätzen, zu denen im Rahmen des Versuchs keine zusätzlichen *ECH* inokuliert wurden, zu einem positiven bakteriellen Befund kam. Insbesondere die Versuchsdurchläufe vier und fünf zeigten mit  $\sim 2,4 \times 10^2$  KBE/ml und  $\sim 2 \times 10^4$  KBE/ml in den gentamicinfreien Testansätzen die höchste native Keimbelastung. Die Erreger konnten durch Massenspektrometrie einzelner Kolonien zum großen Teil als *E. coli* var. *haem.* identifiziert werden. Eine sichere Unterscheidung diesen bereits im nativen Sperma enthaltenen Bakterien von dem im Versuch zugesetzten *ECH* war damit jedoch nicht möglich. Auch in der Literatur wurde bereits bakterielles Wachstum in einem ähnlichem Umfang beschrieben. So stuften Pesch et al. (2007) und Goercke-Pesch et al. (2012) eine bakterielle Kontamination bis  $2 \times 10^4$  KBE/ml als mäßigen, physiologischen Bewuchs ein. Die in dem Versuch gewählte geringe *ECH*-Inokulation lag damit deutlich unterhalb der durchschnittlich vorgefundenen, nativen bakteriellen Kontamination. Als Folge dessen ergaben sich in der quantitativen bakteriologischen Analyse für die Testansätze BK 0 (ohne *ECH* Zusatz) und BK 1 (geringer *ECH* Zusatz) ähnliche KBE/ml-Werte und Bakterienverläufe. Für eine nachteilige Beeinflussung der übrigen Ergebnisse gab es darüber hinaus keinen Anhaltspunkt. Die deutlich höhere native BK im Versuchsdurchlauf fünf hatte, im Vergleich zu den übrigen Versuchsdurchläufen, keine sichtbare klinisch relevante Verschlechterung der untersuchten Vitalparameter zur Folge. Auf eine statistische Absicherung wurde, da es sich um eine Einzelprobe handelte, verzichtet.

Kritisch betrachtet werden muss die Tatsache, dass es sich bei den untersuchten *ECH* um Gentamicin-sensible Erreger handelt. Im Rüdenejakulat kann jedoch eine Vielzahl verschiedener Bakterien gefunden werden (Ling und Ruby, 1978; Johnston, 1991; Bju-rström und Linde Forsberg, 1992; Pesch et al., 2006). So sind beispielsweise  $\beta$ - haemoly-sierende Streptokokken und auch andere Keime häufig gegenüber Gentamicin resistent (Aurich und Spergser, 2007; Kilburn et al., 2013; Schwarz et al., 2013). So stellt Gentami-cin zwar einen guten Schutz vor Gram-negativen, aeroben Bakterien dar, als Alleinwirk-stoff gegen Gram-positive, aerobe Erreger und Anaerobier ist die Wirkungen jedoch we-niger effektiv (Parlevliet et al., 2011). Welche Gentamicinkonzentrationen für solche resistenten Keime notwendig sind und ob Gentamicin dabei einen geeigneten Wirkstoff darstellt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Zudem ist zu beachten, dass ein Anti-biotikum zwar das Wachstum von Kontaminaten verhindern kann, die existierenden Bakterientoxine jedoch im Sperma verbleiben (Aurich und Spergser, 2007).

## 6 Zusammenfassung

Auch in der Hundezucht gewinnt die künstliche Besamung an Beliebtheit. Die Flüssigkonservierung des Spermas verknüpft sehr gute Besamungserfolge mit einer einfachen und kostengünstigen Handhabung. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit, Samen kurzzeitig zu lagern und zu versenden und schließt damit die Lücke zwischen Frisch- und kryokonserviertem Sperma.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung verschiedener *E. coli* var. *haem.*- und Gentamicinkonzentrationen auf die Spermaqualität und damit auf die Lagerfähigkeit von flüssigkonservierten Samen vom Rüden untersucht. Zudem sollte geprüft werden, inwiefern sich bakterielles Wachstum durch die verschiedenen Gentamicinkonzentrationen verhindern bzw. minimieren lässt. Die Ejakulate stammten von 11 Rüden und wurden für fünf Versuchsdurchläufe gepoolt. Der verwendete CaniPlus Chill® Verdünner setzte sich aus vier Chargen mit verschiedenen Konzentrationen (0, 20, 100 und 200 mg/l) von Gentamicin zusammen. Zu jedem der vier Verdünner wurden zusätzlich noch zwei *E. coli* var. *haem.*-Konzentrate (500 KBE/ml und  $5 \times 10^5$  KBE/ml) inokuliert. Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle ohne weitere Keime angelegt. Diese 12 Testansätze wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und im Abstand von 24 h über 3 Tage spermatologisch (%-Lebend/Tot; %-morphologisch veränderter Spermien; %-membranintakte Spermien; CASA-Beweglichkeitsparameter) und bakteriologisch untersucht.

Am Tag 0 direkt nach dem Verdünnen und vor dem Herabkühlen konnten folgende Werte ermittelt werden: Eine Beweglichkeit von  $81,0 \pm 2,4$  %, Vorwärtsbeweglichkeit von  $73,2 \pm 2,6$  %, Anteil lebender Spermien (Eosin-Ausstrich) von  $75,1 \pm 3,2$  %, Anteil morphologisch normaler Spermien (Spermac®-Färbung) von  $72,2 \pm 11,5$  % und membrandefekte Spermien (HOS-Test) von  $9,7 \pm 1,0$  % (not curled). Insgesamt nahm die Spermaqualität über den Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab, was sich in einer signifikanten Abnahme bis zu einer Beweglichkeit von  $43,2 \pm 21,5$  % und Vorwärtsbeweglichkeit von  $34,6 \pm 20,3$  %, eines Anteils lebender Spermien von  $43,0 \pm 13,3$  % und membranintakte Spermien (HOS-Test) von  $36,4 \pm 17,8$  % (curled) am Tag 3 und einer Zunahme des Anteils an morphologisch veränderten Spermien, inkl. Kopfkappen von  $58,94 \pm 4,09$  % am Tag 3 äußerte. Ferner konnte ein negativer Einfluss der Gentamicinkonzentration nachgewiesen werden: Testansätze, die mit 200 mg/l Gentamicin versetzt waren, zeigten eine signifikant stärkere Reduktion der Beweglichkeit ( $12,7 \pm 8,4$  %) und

Vorwärtsbeweglichkeit ( $4,2 \pm 4,6 \%$ ), des Anteils lebender Spermien ( $21,5 \pm 8,1 \%$ ) und membranintakter Spermien ( $52,0 \pm 26,4 \%$ ). Eine Zunahme morphologisch veränderter Spermien oder Kopfkappen ( $52,0 \pm 9,0 \%$ ) konnte nicht festgestellt werden.

Infolge der verschiedenen hohen *E. coli* var. *haem.*-Konzentrationen manifestierte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil (%) morphologisch veränderter Spermien, von Tag 0 (BK 0: 20,6; BK 1: 25,4; BK 2: 29,5 %) bis hin zu Tag 3 (BK 0: 38,9; BK 1: 40,5; BK 2: 45,2 %;  $p = 0,0069$ ).

Die bakteriologische Analyse ließ eine Verringerung der Keimzahlen in allen Testansätzen erkennen. Am deutlichsten stellte sich die Abnahme bei 200 mg/l Gentamicin dar, wobei nach 24 h nur noch einzelne Kolonien und nach 48 h kein Wachstum mehr nachgewiesen werden konnte. Bei 20 mg/l Gentamicin wuchsen in Verbindung mit der hohen *E. coli* var. *haem.*-Zugabe am Ende des Versuchs noch 656 KBE/ml, bei 100 mg/l Gentamicin noch 52 KBE/ml.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Verdünner mit 100 mg/l Gentamicin im Vergleich zu den übrigen Verdünnern am besten für die Flüssigkonservierung geeignet war. Er bot eine moderate Keimreduktion, ohne dabei die Spermaqualität negativ zu beeinträchtigen. Inwiefern Gentamicin die Verschlechterung der Samenparameter verschuldete, bleibt unklar, da andere Studien erst bei höherer Dosis einen Effekt feststellten. Auch in einem Folgeversuch konnte bei 200 mg/l Gentamicin keine Abnahme der Vitalparameter festgestellt werden, sodass für die vorliegende Arbeit auch andere, verdünnerassoziierte Faktoren als Ursache diskutiert werden müssen. Die Inokulation mit dem *E. coli* var. *haem.*-Stamm erbrachte nur eine geringe Abnahme einzelner Qualitätsparameter und scheint deshalb von untergeordneter klinischer Relevanz. Inwieweit das auch auf andere Stämme und Serovare zutrifft, wurde bisher nicht untersucht.

Zuletzt bleibt auch ungeklärt, in welchem Ausmaß sich die Fertilität des kühlkonservierten Ejakulats durch die getesteten Variablen verändert. So sind weitere Studien notwendig, um auch die Befruchtungsfähigkeit *in vivo* näher beurteilen zu können.

## 7 Summary

Artificial insemination is gaining more and more popularity in dog breeding. The chilled semen preservation combines very good insemination results with a simple and cost-effective handling. In addition, it offers the possibility to store and send semen at short notice, thus closing the gap between fresh and cryopreserved sperm.

This study investigated the importance of different *ECH* (*E. coli* var. *haem.*) and gentamicin concentrations on sperm quality and thereby on the storage capacity of chilled canine semen. In addition, the extent to which bacterial growth can be prevented or minimized by the different gentamicin concentrations should be examined. The ejaculates were collected from 11 male dogs and were pooled for a total of five trials. The CaniPlus Chill extender used was composed of four batches with different concentrations (0, 20, 100 and 200 mg/l) of gentamicin. Each of the four diluents was additionally inoculated with two concentrates (500 CFU/ml and  $5 \times 10^5$  CFU/ml) of *ECH*. Furthermore, a negative control without bacteria was generated. These 12 test samples were stored in the refrigerator at 4 °C. The semen was evaluated for % -living/dead; % -morphologically altered spermatozoa; % -membrane-intact spermatozoa; CASA-mobility parameters at intervals of 24 hours for 3 days. A bacteriological examination of the test samples was carried out on the same schedule. On day 0, immediately after dilution and before cooling down, the following values were determined: mobility of  $81.0 \pm 2.4$  %, forward mobility of  $73.2 \pm 2.6$  %, percentage of living spermatozoa (eosin staining) of  $75.1 \pm 3.2$  %, proportion of morphologically normal spermatozoa (Spermac® staining) of  $72.2 \pm 11.5$  % and of membrane-defective spermatozoa (HOS test) of  $9.7 \pm 1.0$  % (not curled). Overall, sperm quality decreased continuously over the study period, resulting in a significant decrease of motility to  $43.2 \pm 21.5$  % and progressive motility to  $34.6 \pm 20.3$  %, the proportion of living spermatozoa of  $43.0 \pm 13.3$  % and membrane-intact spermatozoa (HOS test) of  $36.4 \pm 17.8$  % (curled) on day 3, and an increase in the proportion of morphologically altered spermatozoa, including detached acrosomes, of  $58.9 \pm 4.1$  %. In addition, a negative influence of the gentamicin concentration could be detected: Samples supplemented with 200 mg/l of gentamicin showed a significantly greater reduction in motility ( $12.7 \pm 8.4$  %) and progressive motility ( $4.2 \pm 4.6$  %), the percentage of living spermatozoa ( $21.5 \pm 8.1$  %)

and membrane-intact spermatozoa ( $52.0 \pm 26.4$  %). An increase of morphologically altered spermatozoa or acrosomes ( $52.0 \pm 9.0$  %) could not be detected.

Due to the different concentrations of *ECH*, a significant difference was found in the proportion of morphologically altered spermatozoa (%) from day 0 (BK 0: 20.6; BK 1: 25.4; BK 2: 29.5) to day 3 (BK 0: 38.9, BK 1: 40.5, BK 2: 45.2) ( $p = 0,0069$ ). The bacteriological analysis showed a reduction of the bacteria in all samples. The decrease was most pronounced at 200 mg/l of gentamicin, whereas after 24 hours only single colonies and after 48 hours no bacterial growth could be detected. At 20 mg/l of gentamicin in combination with the high *ECH* additive, 656 CFU/ml were still grown at the end of the experiment, and 52 CFU/ml at 100 mg/l of gentamicin.

The results of this work show that the extender with 100 mg/l of gentamicin was best for chilled semen preservation compared to the other extenders. It offered a moderate bacterial reduction without adversely affecting sperm quality. To which extent gentamicin was responsible for the deterioration of the sperm parameters remains unclear, since other studies only detected an effect at a higher concentrations. Also in further studies no decrease in the vital parameters could be determined at 200 mg/l of gentamicin. For that reason, other, extender-associated factors must also be discussed.

Inoculation with the used *ECH* strain yielded only a slight decrease in single quality parameters and therefore seems of minor clinical relevance for subfertility. To what extent this also applies to other bacterial strains and serovars has not yet been investigated.

Finally, it remains unclear as to which degree the fertility of chilled canine semen is affected by the tested variables. Further studies are necessary in order to be able to assess the fertilization capacity *in vivo*.

## 8 Literaturverzeichnis

**Abe Y, Lee DS, Sano H, Akiyama K, Yanagimoto-Ueta Y, Asano T, Suwa Y, Suzuki H (2008):** Artificial Insemination with Canine Spermatozoa Frozen in a Skim Milk/Glucose-Based Extender. *J. Reprod. Dev.* 54: 290–294.

**Aboagla EM, Terada T (2004):** Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160–1172.

**Acton QA (2012):** Issues in General Food Research: 2011 Edition. ScholarlyEditions.

**Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S (2006):** What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 67: 2–8.

**Aitken RJ (1989):** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction* 41: 183–197.

**Aitken RJ (1998):** Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 59: 1037–1046.

**Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA (2004):** Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 994–1010.

**Akhter S, Ansari MS, Andrabi SMH, Ullah N, Qayyum M (2008):** Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 272–278.

**Alhaider AK, Watson PF (2009):** Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 147–161.

**Althouse GC, Kuster CE, Clark SG, Weisiger RM (2000):** Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology* 53: 1167–1176.

**Althouse GC, Lu KG (2005):** Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63: 573–584.

**Alvarez JG, Storey BT (1992):** Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232–241.

**Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987):** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 8: 338–348.

**Amann RP (1980):** Validation of a System for Computerized Measurements of Spermatozoal Velocity and Percentage of Motile Sperm. *Biology of Reproduction* 23: 647–656.

**Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL (2005):** Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction* 129: 535–543.

**Andersen K (1975):** Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Reproduction in Domestic Animals* 10: 1–4.

**Appell RA, Evans PR (1978):** The effect of temperature on sperm motility. II. Is bacterial growth a factor? *Fertil. Steril.* 30: 436–438.

**Arriola J, Foote RH (1982):** Effects of amikacin sulfate on the motility of stallion and bull spermatozoa at different temperatures and intervals of storage. *J. Anim. Sci.* 54: 1105–1110.

**Asano T, Abe Y, Suwa Y, Suzuki H (2010):** Canine Frozen Spermatozoa Using Trehalose and Raffinose in Skim Milk Based Extender. abstract 668. *Biology of Reproduction*: 192.

**Aurich C, Seeber P, Müller-Schlösser F (2007):** Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 445–448.

**Aurich C, Spergser J (2007):** Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 67: 912–918.

**Bayer ME, Remsen CC (1970):** Structure of *Escherichia coli* after freeze-etching. *J Bacteriol* 101: 304–313.

**Beccaglia M, Anastasi P, Chigioni S, Luvoni GC (2009a):** TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl 2: 345–349.

**Beccaglia M, Anastasi P, Luvoni GC (2009b):** Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Vet. Res. Commun.* 33 Suppl 1: 77–80.

**Becher AC, Spergser J, Aurich C, Zottler E, Aurich JE, Schäfer-Somi S (2013):** Cooled Storage of Canine Semen: in vitro Effects of Different Concentrations of an Antibiotic Combination on Growth of Mollicutes. *Reprod Dom Anim* 48: 961–966.

**Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Barrière P, Larrat M, Tainturier D (2008)** Warum werden die Namen der Autoren mal fett hervorgehoben und hier nicht mehr? Im ganzen Verzeichnis kontrollieren: The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 70: 1478–1488.

**Bencharif D, Amirat-Briand L, Le Guillou J, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois ML, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Barrière P, Tainturier D (2013):** Canine-chilled Sperm: Study of a Semen Extender Made with Low-density Lipoproteins from Hen Egg Yolk Supplemented with Glutamine. *Reproduction in Domestic Animals* 48: 258–266.

**Bennetts LE, Aitken RJ (2005):** A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 71: 77–87.

**Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P (2007):** Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77: 120–126.

**Bergeron A, Crête M, Brindle Y, Manjunath P (2004):** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70: 708–717.

**Bergeron A, Manjunath P (2006):** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1338–1344.

**Berktaş M, Aydın S, Yılmaz Y, Cecen K, Bozkurt H (2008):** Sperm motility changes after coincubation with various uropathogenic microorganisms: an in vitro experimental study. *Int Urol Nephrol* 40: 383–389.

**Bjurström L, Linde Forsberg C (1992):** Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in stud dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 670–673.

**Boguen R, Uribe P, Treulen F, Villegas JV (2014):** Distinct isolates of uropathogenic *Escherichia coli* differentially affect human sperm parameters in vitro. *Andrologia* 46: 943–947.

**Bouchard GF, Morris JK, Sikes JD, Youngquist RS (1990):** Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 34: 147–157.

**Bourgeon F, Evrard B, Brillard-Bourdet M, Colleu D, Jégou B, Pineau C (2004):** Involvement of semenogelin-derived peptides in the antibacterial activity of human seminal plasma. *Biology of Reproduction* 70: 768–774.

**Bousseau S, Brillard J, Marquant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M (1998):** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699–706.

**Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL (2000):** Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54: 129–136.

**Burgess CM, Bredl JC, Plummer JM, England GCW (2000):** Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 57: 357–363.

**Busch U (2010):** Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen. Springer Berlin Heidelberg.

**Busch W (Hrsg.) (2009):** Fruchtbarkeitskontrolle bei Groß- und Kleintieren. 102 Tabellen. Enke, Stuttgart.

**Busch W, Bader H (2001):** Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer, Stuttgart.

**Busch W, Waberski D (Hrsg.) (2007):** Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Schattauer, Stuttgart.

**Calamera JC, Fernández PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF (2001):** Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia* 33: 79–86.

**Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011):** MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical biochemistry* 44: 104–109.

**Carr DW (1985):** Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biology of Reproduction* 33: 588–595.

**Chen H, Cheung MPL, Chow P, Cheung ALM, Liu W, O WS (2002):** Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. *Reproduction* 124: 491–499.

**Correa JR, Zavos PM (1994):** The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351–360.

**Cortes CJ, Codelia VA, Manosalva I, Lange J de, De Los Reyes M, Moreno RD (2006):** Proacrosin/acrosin quantification as an indicator of acrosomal integrity in fresh and frozen dog spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 93: 165–175.

**Dahlberg B (1976):** Asymptomatic bacteriospermia. *Urology* 8: 563–566.

**De Los Reyes M, Palomino J, Lange J de, Anguita C, Barros C (2009):** In vitro sperm penetration through the zona pellucida of immature and in vitro matured oocytes using fresh, chilled and frozen canine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 37–45.

**De Souza FF, Barreto CS, Lopes MD (2007):** Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology* 68: 100–106.

**Dean CJ, Hobgood AM, Blodgett GP, Love CC, Blanchard TL, Varner DD (2012):** The addition of ticarcillin-clavulanic acid to INRA 96 extender for stallion semen cooling. *Equine Vet J* 44: 95–99.

**Del Porto, George B., Derrick FC, Bannister ER (1975):** Bacterial effect on sperm motility. *Urology* 5: 638–639.

- Diemer T, Huwe P, Michelmann HW, Mayer F, Schiefer HG, Weidner (2000):** Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int J Androl* 23: 178–186.
- Diemer T, Weidner W, Michelmann HW, Schiefer HG, Rován E, Mayer F (1996):** Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl* 19: 271–277.
- Dietz JP, Sertich PL, Boston RC, Benson CE (2007):** Comparison of ticarcillin and piperacillin in Kenney's semen extender. *Theriogenology* 68: 848–852.
- Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT (1981):** The genital Mycoplasma and Ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. *Can. J. Comp. Med.* 45: 233–238.
- Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M (2007):** Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68: 168–177.
- Dott HM, Foster GC (1972):** A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'Live/Dead' stain. *Reproduction* 29: 443–445.
- Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G, Driscoll D, Noble H (1984):** A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22: 291–304.
- Easter M (2014):** What do your microbiology test results really mean? [http://www.hygiene.net/doc\\_download/626-what-do-your-microbiology-test-results-really-mean](http://www.hygiene.net/doc_download/626-what-do-your-microbiology-test-results-really-mean).
- Edstrom AML, Malm J, Frohm B, Martellini JA, Giwerzman A, Morgelin M, Cole AM, Sorensen OE (2008):** The Major Bactericidal Activity of Human Seminal Plasma Is Zinc-Dependent and Derived from Fragmentation of the Semenogelins. *The Journal of Immunology* 181: 3413–3421.
- England GCW (1999):** Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology* 52: 981–986.
- England GCW, Allen WE (1992):** Factors affecting the viability of canine spermatozoa. *Theriogenology* 37: 373–381.

- England GCW, Millar KM (2008):** The ethics and role of AI with fresh and frozen semen in dogs. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2: 165–171.
- England GCW, Ponzio P (1996):** Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. *Theriogenology* 46: 165–171.
- Erbengi T (1993):** Ultrastructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 8: 416–421.
- Eulenberger K, Schäfer-Somi S, Aurich C (2009):** Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and chromatin status of frozen-thawed canine spermatozoa within six hours of storage at 37 degrees C. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 44 Suppl 2: 354–358.
- Fair WR, Wehner N (1973):** The antibacterial action of canine prostatic fluid and human seminal plasma in an agar diffusion assay system. *Investigative urology* 10: 262–265.
- Farchione LA (1981):** Inactivation of aminoglycosides by penicillins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 8: 27–36.
- Farstad W (1984):** Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J Small Animal Practice* 25: 561–565.
- Farstad W (2009):** Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl 2: 336–341.
- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM (2006):** DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* 27: 176–188.
- Foote RH, Leonard EP (1964):** The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on the survival of dog semen in buffered-yolk extenders. *Cornell Vet* 54: 78–89.
- Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH (2010):** In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73: 480–487.
- Fraczek M, Piasecka M, Gaczarzewicz D, Szumała-Kakol A, Kazienko A, Lenart S, Laszczyńska M, Kurpisz M (2012):** Membrane stability and mitochondrial activity of

human-ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. *Andrologia* 44: 315–329.

**Fraczek M, Szumała-Kakol A, Jedrzejczak P, Kamieniczna M, Kurpisz M (2007):** Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertil. Steril.* 88: 1076–1085.

**Freshman JL (2002):** Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 17: 104–107.

**Fuchs G, Eitinger T, Schlegel HG (2007):** *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme.

**Fukushima FB, Malm C, Henry M, Gheller VA, Serakides R, Neves MM, Macedo SP, Figueiredo MS, Andrade MEJ, Chaves MS, Silva MX, Rezende CM, Melo EG (2010):** Site of intrauterine artificial insemination in the bitch does not affect sperm distribution within the uterus. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 1059–1064.

**Garcia E, Bergmans HE, Van den Bosch JF, Orskov I, Van der Zeijst BA, Gaastra W (1988):** Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie van Leeuwenhoek* 54: 149–163.

**Gavella M, Lipovac V, Vučić M, Ročić B (1996):** Superoxide anion scavenging capacity of human seminal plasma. *Int J Androl* 19: 82–90.

**Gilchrist JE, Campbell JE, Donnelly CB, Peeler JT, Delaney JM (1973):** Spiral plate method for bacterial determination. *Appl Microbiol* 25: 244–252.

**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 = Zuchthygiene* 48: 213–217.

**Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A (2012):** Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science* 135: 97–105.

**Goericke-Pesch S, Weiss R, Wehrend A (2011):** Bacteriological findings in different fractions of canine ejaculates showing normospermia, teratozoospermia or azoospermia. *Australian Veterinary Journal* 89: 318–322.

**Goldberg AM, Argenti LE, Faccin JE, Linck L, Santi M, Bernardi ML, Cardoso MR, Wentz I, Bortolozzo FP (2013):** Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science* 95: 362–367.

**Grainger J, Hurst J (2016):** Practical Microbiology for Secondary Schools. A resource for key stages 3, 4 & post-16 and the equivalent scottish qualifications. <http://microbiologyonline.org/teachers/resources>.

**Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D (1995):** Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction* 103: 17–26.

**Griveau JF, Le Lannou D (1997):** Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology* 20: 61–69.

**Günzel AR (1986):** Zur Spermagewinnung, -beurteilung und -konservierung sowie Samenübertragung beim Hund. *Tierärztliche Praxis* 14: 275–282.

**Günzel AR (2007):** Praktischer Teil - KB bei ausgewählten Tierarten. Künstliche Besamung beim Hund. In: Busch W, Waberski D (Hrsg.), *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer, Stuttgart, 262–272.

**Günzel-Apel AR, Günther C, Terhaer P, Bader H (1993):** Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 47: 271–278.

**Günzel-Apel AR, Terhaer P, Waberski D (1994):** Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte. *Tierärztliche Praxis*: 483–486.

**Hammerstedt RH (1993):** Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 675.

**Hancock JL (1956):** The morphology of boar. *Journal of the Royal Microscopical Society* 76: 84–97.

**Harrop AE (1954):** Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br Vet J* 110: 424–425.

**Hatamoto LK, Baptista-Sobrinho CA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CN (2006):** Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 66: 1610–1614.

**Henkel R (2005):** The impact of oxidants on sperm function. *Andrologia* 37: 205–206.

**Hermansson U, Linde Forsberg C (2006):** Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65: 584–593.

**Hermansson U, Ponglowhapan S, Linde Forsberg C, Holst BS (2006):** A short sperm-oocyte incubation time ZBA in the dog. *Theriogenology* 66: 717–725.

**Hoben HJ, Somasegaran P (1982):** Comparison of the Pour, Spread, and Drop Plate Methods for Enumeration of *Rhizobium* spp. in Inoculants Made from Presterilized Peat. *Appl Environ Microbiol* 44: 1246–1247.

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

**Hollett RB (2006):** Canine brucellosis: outbreaks and compliance. *Theriogenology* 66: 575–587.

**Holst BS, Larsson B, Rodriguez-Martinez H, Lagerstedt AS, Linde Forsberg C (2000):** Zona pellucida binding assay--a method for evaluation of canine spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 57: 137–140.

**Hubálek Z (2003):** Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205–229.

**Huwe P, Diemer T, Ludwig M, Liu J, Schiefer HG, Weidner W (1998):** Influence of different uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in an in vitro experiment. *Andrologia* 30: 55–59.

**Iguer-ouada M, Verstegen JP (2001a):** Evaluation of the “Hamilton Thorn computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology* 55: 733–749.

**Iguer-ouada M, Verstegen JP (2001b):** Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55: 671–684.

**Iguer-ouada M, Verstegen JP (2001c):** Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55: 1143–1158.

**Jasko DJ, Bedford SJ, Cook NL, Mumford EL, Squires EL, Pickett BW (1993):** Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 40: 885–893.

**Jeschke T (2008):** Erhebungen zur Situation der caninen Reproduktionsmedizin bei Tierärzten und Züchtern – ein Beitrag zur Erhebung des Status quo und zur Verbesserung der Lehre auf diesem Gebiet

**Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R (1989):** Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res* 24: 185–196.

**Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ (1984):** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction* 70: 219–228.

**Johnston SD (1991):** Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 21: 545–551.

**Johnston SD, Kamolpatana K, Root-Kustritz MV, Johnston GR (2000):** Prostatic disorders in the dog. *Animal Reproduction Science* 60-61: 405–415.

**Kasimanickam VR, Kasimanickam RK, Memon MA, Rogers HA (2012):** Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5°C. *Animal Reproduction Science* 136: 139–145.

**Kaur K, Prabha V (2014):** Spermagglutinating *Escherichia coli* and its role in infertility: in vivo study. *Microbial pathogenesis* 69-70: 33–38.

**Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T, Tsutsui T (2007):** Superoxide Dismutase and Catalase Activities in the Seminal Plasma of Normozoospermic and Asthenozoospermic Beagles. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 133–136.

**Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW (1992):** Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38: 601–614.

**Kilburn C, Rooks DJ, McCarthy AJ, Murray RD (2013):** Antimicrobial resistance in some gram-negative bacteria isolated from the bovine ejaculate. *Reprod. Domest. Anim.* 48: 525–528.

**Kmenta I, Strohmayer C, Müller-Schlösser F, Schäfer-Somi S (2011):** Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology* 75: 1095–1103.

**Koderle M, Aurich C, Schäfer-Somi S (2009):** The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa. *Theriogenology* 72: 1215–1220.

**Kordan W, Holody D, Eriksson B, Fraser L, Rodriguez-Martinez H, Strzezek J (1998):** Sperm Motility Inhibiting Factor (SMIF) - A Plasmatic Peptide with Multifunctional Biochemical Effects on Boar Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 33: 347–354.

**Korpimäki T, Kurittu J, Karp M (2003):** Surprisingly fast disappearance of  $\beta$ -lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *Journal of Microbiological Methods* 53: 37–42.

**Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J (1998):** Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction* 13: 611–619.

**Kumi-Diaka J (1993):** Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39: 1279–1289.

**Kumi-Diaka J, Badtram G (1994):** Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: In vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41: 1355–1366.

**Kustritz MVR, Johnston SD, Olson PN, Lindeman CJ (2005):** Relationship between inflammatory cytology of canine seminal fluid and significant aerobic bacterial, anaerobic bacterial or mycoplasma cultures of canine seminal fluid: 95 cases (1987–2000). *Theriogenology* 64: 1333–1339.

**Kutzler MA (2005):** Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64: 747–754.

**La Vignera S, Vicari E, Condorelli RA, D'Agata R, Calogero AE (2011):** Male accessory gland infection and sperm parameters (review). *International Journal of Andrology* 34: e330-47.

**L'Abée-Lund TM, Heiene R, Friis NR, Ahrens P, Sorum H (2003):** *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Veterinary Record* 153: 231–235.

**De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C (1997):** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* 2: 48–54.

**Lay JO (2000):** MALDI-TOF mass spectrometry and bacterial taxonomy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19: 507–516.

**Lay JO (2001):** MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass spectrometry reviews* 20: 172–194.

**Linde Forsberg C (2014):** Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen.

<http://www.ivis.org/advances/Concannon/linde3/chapter.asp?LA=1> (14.04.2014).

**Linde Forsberg C (1991):** Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 21: 467–485.

**Linde Forsberg C (1995):** Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 10: 48–58.

**Linde Forsberg C, Ström Holst B, Govette G (1999):** Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: A retrospective study. *Theriogenology* 52: 11–23.

**Linde Forsberg C (Hrsg.) (2010):** Canine artificial insemination: State of the Art.

**Ling GV, Branam JE, Ruby AL, Johnson DL (1983):** Canine prostatic fluid: techniques of collection, quantitative bacterial culture, and interpretation of results. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 201–206.

**Ling GV, Ruby AL (1978):** Aerobic bacterial flora of the prepuce, urethra, and vagina of normal adult dogs. *Am. J. Vet. Res.* 39: 695–698.

**Lopes BV, Cunha ICN, Silva JFS (2008):** Canine Chilled Semen: Influence of Latex and Air. In: *Proceedings of the International Symposium on Canine and Feline Reproduction*

& Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress - Vienna, Austria, 2008.

**Lopes G, Simões A, Ferreira P, Martins-Bessa A, Rocha A (2009):** Differences in preservation of canine chilled semen using different transport containers. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 158–163.

**Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M:** Bruker Daltonik GmbH; MALDI-TOF MS; Application Note # MT-80.

**Manjunath P (2002):** Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biology of Reproduction* 67: 1250–1258.

**Mann T, Lutwak-Mann C (1981):** Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry, and investigative andrology. Springer-Verlag, Berlin, New York.

**Maroto Martín, Luis O, Muñoz EC, De Cupere F , Van Driessche E, Echemendia-Blanco D, Rodríguez JMM, Beeckmans S (2010):** Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Animal Reproduction Science* 120: 95–104.

**Martin Senz (2012):** Prozesstechnische Stabilisierung des probiotischen Milchsäurebakteriums *Lactobacillus acidophilus*. Berlin, Technische Universität Berlin, Fakultät III – Prozesswissenschaften, Dissertation.

**Maxwell WMC, Stojanov T (1996):** Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1013.

**Mazur P, Leibo SP, Chu EH (1972):** A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research* 71: 345–355.

**Medeiros CMO, Forell F, Oliveira A, Rodrigues JL (2002):** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327–344.

**Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:** Merck: GASSNER Agar (Water-blue Metachrome-yellow Lactose Agar acc. to GASSNER). Selective agar proposed by GASSNER (1918) for the detection and isolation of pathogenic Enterobacteriaceae in foodstuffs and other materials.

**Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (2010):** Merck Datenblatt, MERCKOPLATE Bluetagar.

**Merck Millipore (2014a):** Blut-Agar (Basis) zur Isolierung und Züchtung verschiedener anspruchsvoller Mikroorganismen. [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Blut-Agar-%28Basis%29,MDA\\_CHEM-110886](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Blut-Agar-%28Basis%29,MDA_CHEM-110886).

**Merck Millipore (2014b):** Wasserblau-Metachromgelb-Lactose-Agar nach GASSNER für die Mikrobiologie. [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/GASSNER-Agar,MDA\\_CHEM-101282](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/GASSNER-Agar,MDA_CHEM-101282).

**Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Boscós CM (2007):** Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68: 204–212.

**Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscós CM (2009):** Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 112: 119–135.

**Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscós CM (2010):** Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 201–207.

**Mickelsen WD, Memon MA, Anderson PB, Freeman DA (1993):** The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology* 39: 553–560.

**Minitüb GmbH:** Manual CaniPlus Chill. 31370/0030.

**Minitüb GmbH (2006):** SpermVision™-Benutzerhandbuch.

**Miß N (2012):** Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdünner. VVB Laufersweiler, 1. Aufl., Giessen.

**Mitryk B, Jarco PE, Rybak MJ (1996):** Stability and antimicrobial activity of gentamicin sulfate, tobramycin sulfate and amikacin sulfate in polypropylene syringes for use in once-daily aminoglycoside therapy. *Am J Health Syst Pharm* 53: 2855–2859.

**Mogielnicka-Brzozowska M, Dziekońska A, Strzeżek R, Załęcki M, Majewska A, Tołścik K, Kordan W (2014):** Effect of seminal plasma zinc-binding proteins on motili-

ty and membrane integrity of canine spermatozoa stored at 5°C. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 58.

**Morrell JM (2006):** Update on Semen Technologies for Animal Breeding\*. *Reprod Domest Anim* 41: 63–67.

**Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M (2002):** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695–1706.

**Moustacas VS, Xavier MN, Carvalho-Júnior CA, Costa EA, Henry M, Santos RL (2010):** Effect of extender supplementation with various antimicrobial agents on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen. *Theriogenology* 74: 1476–1481.

**Moustafa MH (2004):** Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction* 19: 129–138.

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

**Nagai T, Yamaguchi K, Moriwaki C (1982):** Studies on the effects of sugars on washed human sperm motility. *Journal of pharmacobio-dynamics* 5: 564–567.

**Nakagata N (2000):** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm. Genome* 11: 572–576.

**Neild DM, Gadella BM, Chaves MG, Miragaya MH, Colenbrander B, Agüero A (2003):** Membrane changes during different stages of a freeze–thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59: 1693–1705.

**Nishiyama T, Kinugasa T, Kimura T, Watanabe G, Taya K, Tsumagari S, Takeishi M (1999):** Determination of optimal time for mating by artificial insemination with chilled semen using luteinizing hormone surge as an indicator in beagles. *Journal of the American Animal Hospital Association* 35: 348–352.

**Niżański W (2005):** Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen–thawed semen. *Veterinary Medicine* 8: 12.

- Niżański W (2006):** Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66: 470–483.
- Nunez-Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martinez-Ferrer M, Meseguer MA (1998):** Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa. *Human Reproduction* 13: 2756–2761.
- Oettlé EE (1986):** Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12: 145–150.
- Oettlé EE (1993):** Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47: 257–260.
- Okano T, MURASE T, Asano M, Tsubota T (2004):** Effects of Final Dilution Rate, Sperm Concentration and Times for Cooling and Glycerol Equilibration on Post-Thaw Characteristics of Canine Spermatozoa. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1359–1364.
- Pace MM, Graham EF (1974):** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* 39: 1144–1149.
- Palacios LE, Wang T (2005):** Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *J Amer Oil Chem Soc* 82: 571–578.
- Parlevliet JM, Lynn JW, Paccamonti DL (2011):** The Use of Cefquinome in Equine Semen Extender. *Journal of Equine Veterinary Science* 31: 139–142.
- Paulson JD, Polakoski KL (1977):** Isolation of a spermatozoal immobilization factor from Escherichia coli filtrates. *Fertility and Sterility* 28: 182–185.
- Peña AI, Linde Forsberg C (2000):** Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 859–875.
- Peña AI, Lugilde LL, Barrio M, Herradón PG, Quintela LA (2003):** Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1725–1739.
- Peña FJ, Núñez-Martínez I, Morán JM (2006):** Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. *Reprod Domest Anim* 41: 21–29.

- Peña Martínez AI (2004):** Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 209–224.
- Pesch S, Schuler G, Wilhelm E, Hoffmann B (2007):** Semen collection, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierärztl Praxis* 35: 81–90.
- Pesch S, Weiss R, Hoffmann B (2006):** Bacterial flora in dog semen. *Tierärztl Prax* 2006; 34 (K): 17-21 34: 17–21.
- Pinto CRF, Eilts BE, Paccamonti D (1998):** The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology* 50: 301–305.
- Pinto CRF, Paccamonti D, Eilts BE (1999):** Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. *Theriogenology* 52: 609–616.
- Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C (2004):** Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62: 1498–1517.
- Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, Mavuduru RS, Singh SK (2010):** Mechanism of sperm immobilization by *Escherichia coli*. *Advances in urology* 2010: 240268.
- Price S, Aurich C, Davies-Morel M (2008):** Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 261–266.
- Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL (1984):** Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22: 409–415.
- Quinn PJ (op. 2011):** *Veterinary microbiology and microbial diseases*. Wiley-Blackwell, 2nd edition, Oxford.
- Rideout MI, Burns SJ, Simpson RB (1982):** Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32: 35–40.
- Riesenbeck A, Völger D, Hoffmann B (2001):** Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma. *Tierärztliche Praxis*: 116–120.
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña AI, Rodríguez-Gil J (2001):** Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56: 801–815.

**Rijsselaere T, van Soom A (2010):** Techniques for artificial insemination in dogs. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 79: 463–466.

**Rijsselaere T, van Soom A, Hoflack G, Maes D, Kruif A de (2004a):** Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology 62: 1292–1306.

**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, Maes D, Kruif A de (2003):** Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology 60: 1553–1568.

**Rijsselaere T, van Soom A, Maes D, Verberckmoes S, Kruif A de (2004b):** Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa. Theriogenology 61: 1589–1602.

**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.

**Rolle M, Mayr A (2007):** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke, 8., überarb. Aufl, Stuttgart.

**Root-Kustritz MV (2007):** The value of canine semen evaluation for practitioners. Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology 68: 329–337.

**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, Iguer-ouada M, Verstegen JP, Linde Forsberg C (1999a):** Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without equex STM paste. Theriogenology 51: 1045–1058.

**Rota A, Peña AI, Linde Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1999b):** In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen–thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. Animal Reproduction Science 57: 199–215.

- Rota A, Rota A, Martini M, Milani C, Romagnoli S (2005):** Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 45: 29–37.
- Rota A, Ström B, Linde Forsberg C (1995):** Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 °C. *Theriogenology* 44: 885–900.
- Rota A, Ström B, Linde Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1997):** Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38 °C. *Theriogenology* 47: 1093–1101.
- Salamon S, Maxwell WMC (2000):** Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77–111.
- Saleh RA, Agarwal A (2002):** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23: 737–752.
- Sanocka D, Fraczek M, Jedrzejczak P, Szumała-Kakol A, Kurpisz M (2004):** Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology* 62: 111–124.
- Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M, Kurpisz M (2005):** Bacterial infection and semen quality. *Journal of Reproductive Immunology* 67: 51–56.
- Schaefer-Somi S, Spergser J, Aurich C (2009):** Bacteria and mycoplasmas in canine ejaculates - a retrospective survey. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 96: 240–245.
- Schäfer S, Holzmann A, Arbeiter K (1997):** Untersuchungen zur Transmigrationsrate von kurzzeitkonserviertem Hundesperma. *Reprod Domest Anim* 32: 285–289.
- Schäfer-Somi S, Aurich C (2007):** Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Animal Reproduction Science* 102: 1–13.
- Schäfer-Somi S, Kluger S, Knapp E, Klein D, Aurich C (2006):** Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology* 66: 173–182.
- Schulz M, Sánchez R, Soto L, Risopatrón J, Villegas JV (2010):** Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine

translocation, viability, and motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 94: 619–623.

**Schwarz S, Kadlec K, Silley P (2013):** Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. ZETT-Vlg, 1., neue Ausg, Steinen, Kr Lörrach.

**Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Makris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen KA, Veeramachaneni DNR, Wise DL (1996):** Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: A consensus report. *Reproductive Toxicology* 10: 237–244.

**Shahiduzzaman AK, Linde Forsberg C (2007):** Induced immotility during long-term storage at +5 degrees C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 68: 920–933.

**Shannon P, Curson B (1983a):** Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 26: 187–189.

**Shannon P, Curson B (1983b):** Effect of egg yolk, amaranth, DNA, and seminal plasma on resistance of washed and unwashed bovine sperm to cold shock. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 26: 455–460.

**Silva AR, De Cássia Soares Cardoso R, Uchoa DC, MacHado da Silva LD (2002):** Effect of Tris-Buffer, Egg Yolk and Glycerol on Canine Semen Freezing. *The Veterinary Journal* 164: 244–246.

**Silva L, Onclin K, Snaps F, Verstegen JP (1995):** Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43: 615–623.

**Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B (2000a):** Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53: 789–802.

**Sirivaidyapong S, Ursem P, Bevers MM, Colenbrander B (2000b):** Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 57: 383–386.

**Smith J (2008):** Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology* 70: 375–383.

**Smith SC, England GCW (2001):** Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis. *Journal of reproduction and fertility. Supplement 57*: 151–159.

**Sokkar SM, Darwiesh G, Madbooly A, Kaaden OR (2003):** Study of the Pathological Effect of *Escherichia coli* Endotoxin in Rams. *J Vet Med Series B 50*: 226–230.

**Speck ML, Ray B (1977):** Effects of Freezing and Storage on Microorganisms in Frozen Foods: A Review. *Journal of Food Protection 40*: 333–336.

**Squires EL, McGlothlin DE, Bowen RA, Berndtson WE, Pickett BW (1981):** Use of antibiotics in stallion semen for the control of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Equine Veterinary Science 1*: 43–48.

**Stockner PK, Bardwick C (1991):** The relationship of semen parameters to fertility in the dog. *Canine Practice 16*: 15-&.

**Stone SC, De la Maza LM, Peterson EM (1986):** Recovery of microorganisms from the pelvic cavity after intracervical or intrauterine artificial insemination. *Fertil. Steril. 46*: 61–65.

**Ström Holst B, Larsson B, Linde Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (2000):** Evaluation of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa using a zona pellucida binding assay. *Reproduction 119*: 201–206.

**Strzeżek J, Hopfer E, Zaborniak A (1987):** Zinc ion-dependent protein in boar semen. II. Effects on sperm motility and antibacterial properties. *Animal Reproduction Science 13*: 133–142.

**Strzeżek R, Fraser L (2009):** Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality. *Reproductive Biology 9*: 113–126.

**Szász F, Gábor G, Solti L (2000):** Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Vet. Hung. 48*: 325–333.

**Thirumala S, Ferrer MS, Al-Jarrah A, Eilts BE, Paccamonti DL, Devireddy RV (2003):** Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology 47*: 109–124.

**Thomassen R, Farstad W (2009):** Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 71: 190–199.

**Thomassen R, Sanson G, Krogenaes A, Fougner JA, Berg KA, Farstad W (2006):** Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology* 66: 1645–1650.

**Thurston LM, Watson PF, Holt WV (1999):** Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *Reproduction* 117: 271–280.

**Trauba WH, Spohr M, Arnold M, Klotz M (1983):** Bakterizide Aktivität von Chemotherapeutika in simulierten Urinproben bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 1983: 494–502.

**Tsutsui T, Hase M, Hori T, ITO T, Kawakami E (2000):** Effects of Orvus ES Paste on Canine Spermatozoal Longevity after Freezing and Thawing. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 533–535.

**Tsutsui T, Shimizu T, Ohara N, Shiba Y, Hironaka T, Orima H, Ogasa A (1989):** Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *Nippon Juigaku Zasshi* 51: 257–263.

**Tsutsui T, Tezuka T, Mikasa Y, Sugisawa H, Kirihara N, Hori T, Kawakami E (2003):** Artificial Insemination with Canine Semen Stored at a Low Temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 307–312.

**Ubeda JL, Ausejo R, Dahmani Y, Falceto MV, Usan A, Malo C, Perez-Martinez FC (2013):** Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology* 80: 565–570.

**Vaillancourt D, Guay P, Higgins R (1993):** The effectiveness of gentamicin or polymyxin B for the control of bacterial growth in equine semen stored at 20 degrees C or 5 degrees C for up to forty-eight hours. *Can J Vet Res* 57: 277–280.

**Varner DD, Scanlan CM, Thompson JA, Brumbaugh GW, Blanchard TL, Carlton CM, Johnson L (1998):** Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* 50: 559–573.

**Verstegen JP, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K (2008):** Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology* 70: 364–374.

**Verstegen JP, Iguer-ouada M, Onclin K (2002):** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149–179.

**Verstegen JP, Onclin K, Iguer-ouada M (2005):** Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris–glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64: 720–733.

**Viljo Tapio Juhani Nordlund (19. Febr. 1987):** Verfahren zur Bestimmung von Mikrobengehalten nach einem Plattengussverfahren sowie dabei zu verwendende Schalen.

**Villegas JV, Schulz M, Soto L, Sánchez R (2005):** Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10: 105–110.

**Vivacqua A, Siciliano L, Sabato M, Palma A, Carpino A (2004):** Prostatosomes as zinc ligands in human seminal plasma. *Int J Androl* 27: 27–31.

**Waberski D, Petrunkina AM (2007):** Arbeits- und Untersuchungsmethoden. In: Busch W, Waberski D (Hrsg.), *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer, Stuttgart, 99–118.

**Wales RG, White IG (1962):** Effect of some antibacterials on dog spermatozoa. *Reproduction* 3: 294–302.

**Wall RJ, Foote RH (1999):** Fertility of Bull Sperm Frozen and Stored in Clarified Egg Yolk-Tris-Glycerol Extender. *Journal of Dairy Science* 82: 817–821.

**Wanke MM (2004):** Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 195–207.

**Watson PF (1979):** The preservation of semen in mammals. *Oxford reviews of reproductive biology* 1: 283–350.

**Watson PF (1995):** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871.

**Watson PF (2000):** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60-61: 481–492.

- Watson PF, Martin IC (1975):** Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 28: 153–159.
- Watts JR, Wright PJ, Lee CS, Whithear KG (1996):** New techniques using transcervical uterine cannulation for the diagnosis of uterine disorders in bitches. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 51: 283–293.
- White I, Blackshaw AW, Emmens CW (1954):** Metabolic and motility studies relating to the low temperature storage of ram and bull spermatozoa. *Australian Vet J* 30: 85–94.
- Wilson MS (1992):** Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 47: 307–311.
- Wilson MS (2001):** Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 31: 291–304.
- Wilson MS (2003):** Endoscopic Transcervical Insemination in the Bitch (12-Dec-2003).
- Witte TS, Schäfer-Somi S, Kuchar A, Möstl E, Iben C, Aurich C (2009):** Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 110: 293–305.
- Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M (1993):** Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil. Steril.* 60: 154–158.
- Wright PJ (1991):** Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Australian Vet J* 68: 10–13.
- Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P (2010):** Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science* 122: 142–149.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T (2000):** Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579–585.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALH	amplitude of lateral head displacement [ $\mu\text{m}$ ] (durchschnittliche seitliche Kopfauslenkung)
AOC	average orientation change of the head (durchschnittlicher Kopf-Richtungswechsel)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AR	Akrosomreaktion
BCF	beat cross frequency [Hz] (Anzahl seitlicher oszillatorischer Bewegungen)
BHI	Brain Heart Infusion (Hirn-Herz-Bouillon)
BK	Bakterienkonzentration
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius (Temperatur)
CASA	Computer-assisted sperm analysis (Computergestützte Spermienanalyse)
CFU	colony forming unit (=KBE)
DAP	distance average path [ $\mu\text{m}$ ] (Durchschnittsstrecke)
DCL	distance curved line [ $\mu\text{m}$ ] (Kurvenstrecke)
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSL	distance straight line [ $\mu\text{m}$ ] (geradlinige Strecke)
ECH	Versuchsbakterium dieser Arbeit: <i>E. coli</i> var. <i>haem</i> ( <i>Escherichia coli</i> var. <i>haemolytica</i> )
et al.	et alii (und andere)
Genta	Gentamicin
GLTS	Antibiotikagemisch (Gentamicin, Lincomycin, Tylosin, Spectinomycin)

h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (biochemischer Puffer)
HOS-Test	hyposmotischer Schwelltest
i. d. R.	in der Regel
JLU- Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
Kap.	Kapitel
KB	Künstliche Besamung
KBE	Koloniebildende Einheit
KGGA	Klinik für Geburtshilfe, Gynakologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
LDL	Low-density-Lipoprotein
LHL	Landesbetrieb Hessisches Landeslabor
LIN	(VSL/VCL) linearity [%] (Linearität)
MALDI-TOF	Massenspektrometrie: Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (time of flight).
Max.	Maximum
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (biochemischer Puffer)
Min.	Minimum
Mio.	Millionen
mM	Millimol
n	Anzahl
Nr.	Nummer
p	probability (p-Wert /Signifikanzwert)
p <sub>VD</sub>	p-Wert für „Haupteffekt Verdünner“
p <sub>Tag</sub>	p-Wert für „Haupteffekt Zeitverlauf“
p <sub>BK</sub>	p-Wert für „Haupteffekt Bakterienkonzentration“

$p_{xy}$	p-Wert für Zweifachwechselwirkung (T = Zeitverlauf, V = Verdünner, B = Bakterienkonzentration)
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlosung)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SD	standard deviation (Standardabweichung)
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
STR	(VSL/VAP) straightness [%] (Geradlinigkeit)
<i>Strep.</i>	<i>Streptococcus</i>
Tab.	Tabelle
TES	2-((1,3-Dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)amino)ethanesulfonsäure (biochemischer Puffer)
TG-Sperma	Tiefgefriersperma
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VAP	velocity average path [ $\mu\text{m}/\text{sec}$ ] (mittlere Streckengeschwindigkeit)
VCL	velocity curved line [ $\mu\text{m}/\text{sec}$ ] (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn)
VD	Verdünner (CaniPlus Chill® Verdünner) mit bzw. ohne Gentamicin (VD 4: 200 mg/l, VD 3: 100 mg/l, VD 2: 20 mg/l, VD 1 0 mg/l Gentamicin)
%	Volumenprozent
VSL	velocity straight line [ $\mu\text{m}/\text{sec}$ ] (lineare Geschwindigkeit)
WOB	(VAP/VCL) wobble [%] (kurvilineare Strecke um die mittlere Strecke)
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
ZP	Zona pellucida

## 9.2 Ergebnistabellen

Tabelle 16: Anteil morphologisch veränderter Spermien (in %) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe, n = 5, Einfachmessung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) zum Zeitpunkt 0; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene *ECH*

BK	VD	Abgelöste Kappen		Schiefe Kappen		Veränderte Kappen		Halsveränderungen		Geißelveränderung		Lose Köpfe	
		$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD
0	1	3,00	3,67	0,38	0,48	2,13	1,03	0,75	0,29	6,00	3,76	2,13	1,11
1	1	4,50	7,01	0,38	0,48	3,88	2,29	2,00	1,96	9,63	8,39	2,50	2,04
2	1	3,63	3,42	0,63	0,48	4,50	2,48	2,25	0,65	8,25	5,75	2,50	1,91
0	2	3,50	4,12	0,30	0,27	3,10	1,92	0,90	0,74	10,00	5,68	1,40	0,65
1	2	4,50	6,49	0,80	0,76	6,20	3,77	1,40	0,82	11,60	9,43	3,70	2,64
2	2	3,70	5,24	0,40	0,65	5,60	4,80	1,50	1,00	15,40	12,51	2,90	2,36
0	3	2,40	2,38	0,40	0,22	5,70	4,37	1,10	0,74	8,30	7,22	2,00	1,70
1	3	2,40	2,33	0,80	0,57	4,80	2,20	1,10	0,65	12,30	8,63	2,20	1,57
2	3	2,80	3,70	0,30	0,45	6,30	4,96	2,20	1,79	15,10	11,21	3,40	2,79
0	4	3,50	5,65	0,90	0,22	4,60	2,79	1,30	1,30	11,20	8,58	2,40	1,02
1	4	4,10	5,87	0,30	0,27	3,30	2,05	0,90	1,47	12,90	9,93	2,10	2,07
0	1	3,90	3,99	1,00	0,35	4,90	3,31	2,00	2,12	16,20	11,58	3,10	3,09

BK	VD	Plasmotropfen		Gesamtpathomorph.	
		$\bar{x}$	$\pm$ SD	$\bar{x}$	$\pm$ SD
0	1	0,38	0,48	14,75	7,24
1	1	1,00	1,68	23,88	14,74
2	1	0,38	0,25	22,13	10,21
0	2	0,30	0,45	19,50	8,43
1	2	0,40	0,42	28,60	12,83
2	2	0,20	0,45	29,70	16,46
0	3	0,50	0,35	20,40	9,46
1	3	0,50	0,50	24,10	11,19
2	3	0,90	0,55	31,00	13,34
0	4	0,40	0,55	24,30	9,13
1	4	0,30	0,45	23,90	10,03
0	1	0,30	0,27	31,40	14,41

Tabelle 17: Ergebnisse der CASA-gemessenen Parameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH und BCF) (Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe, n = 5, 8-fach Messung einer Probe) bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen (BK) und Gentamicinkonzentrationen im Verdünner (VD) im Zeitverlauf; dabei enthält VD 1 = 0 mg/l, VD 2 = 20 mg/l, VD 3 = 100 mg/l und VD 4 = 200 mg/l Gentamicin; BK 0 = 0 KBE/ml, BK 1 = 500 KBE/ml und BK 2 =  $5 \times 10^5$  KBE/ml zugegebene ECH.

Tag	BK	VD	DAP		DCL		DSL		VAP		VCL		VSL	
			$\bar{x}$	$\pm$ SD										
0	0	1	42,07	7,76	64,76	9,57	34,93	7,58	98,61	17,33	151,33	21,17	82,20	16,91
0	0	2	43,08	7,36	66,46	8,52	35,41	8,23	101,17	15,88	155,57	18,14	83,44	18,17
0	0	3	43,97	7,82	67,38	6,65	36,70	9,18	103,55	16,35	158,17	12,59	86,70	19,86
0	0	4	41,21	3,58	66,37	3,29	34,00	4,74	95,77	7,33	153,8	7,26	79,15	9,51
0	1	1	42,63	6,17	68,49	7,16	35,02	6,71	100,46	13,54	160,96	15,61	82,72	14,69
0	1	2	43,06	6,99	68,88	6,89	35,75	7,68	101,83	17,59	162,05	15,57	84,77	18,88
0	1	3	43,36	6,74	68,17	6,46	35,79	7,95	102,44	14,63	160,7	13,31	84,76	17,57
0	1	4	37,12	4,67	68,50	7,34	29,10	5,85	86,38	10,57	158,37	13,60	67,87	13,49
0	2	1	43,40	8,24	67,95	8,47	35,75	8,81	101,92	18,14	159,22	18,23	84,14	19,42
0	2	2	44,00	6,26	68,89	5,61	36,64	7,38	103,75	14,49	162,13	12,92	86,62	16,80
0	2	3	43,05	6,49	67,71	6,36	35,11	6,81	101,89	14,48	159,75	13,89	83,45	15,21
0	2	4	38,33	4,56	65,96	6,26	31,18	4,75	90,67	10,61	155,47	14,06	73,90	10,66
1	0	1	37,19	6,06	91,77	17,94	25,69	5,06	84,91	11,83	207,81	35,97	58,63	9,95
1	0	2	38,03	5,20	91,67	14,13	26,55	5,24	88,39	10,26	211,35	28,43	61,62	10,58
1	0	3	39,27	7,48	92,01	16,05	28,69	8,93	90,61	15,36	210,78	33,03	66,12	19,06
1	0	4	31,17	5,88	76,40	13,64	20,70	3,78	71,19	14,35	172,99	32,12	47,27	9,25
1	1	1	36,10	4,73	88,16	14,49	24,50	4,65	83,28	11,66	201,92	34,58	56,43	11,06
1	1	2	38,3	4,43	93,56	12,24	27,08	4,45	89,55	9,67	217,04	25,82	63,32	9,98
1	1	3	36,94	4,52	88,3	10,24	25,53	5,24	86,23	9,50	204,08	20,54	59,70	11,66
1	1	4	28,71	7,22	69,67	16,88	18,68	4,64	65,20	17,44	156,82	39,95	42,51	11,09
1	2	1	33,54	5,44	80,52	18,17	22,55	3,56	77,18	12,41	183,73	39,31	51,97	8,60
1	2	2	36,10	5,54	85,64	13,71	24,42	4,84	84,02	13,05	197,88	31,66	56,84	11,48
1	2	3	36,90	5,83	87,65	14,93	24,86	5,87	86,15	13,45	202,81	33,14	58,12	13,80
1	2	4	30,40	4,17	73,18	11,35	19,77	2,6	69,32	9,71	165,66	24,95	45,09	6,08
2	0	1	31,28	11,82	78,78	36,64	20,22	7,11	70,50	25,10	175,45	78,88	45,76	14,70
2	0	2	34,59	5,74	85,56	18,58	22,40	3,54	79,13	12,33	193,95	40,22	51,22	7,56
2	0	3	34,21	4,64	85,41	15,7	21,98	2,96	79,59	10,16	196,70	34,48	51,13	6,40
2	0	4	17,76	2,99	40,28	7,65	11,65	2,08	40,00	7,52	89,08	18,61	26,52	5,02
2	1	1	31,12	11,56	76,27	36,2	20,97	7,44	71,87	26,40	174,48	82,53	48,43	16,64
2	1	2	34,87	6,05	85,14	19,07	22,94	4,26	80,45	13,45	194,66	42,18	52,88	9,26
2	1	3	35,26	6,41	88,27	21,01	23,25	4,85	81,01	14,4	201,02	47,19	53,34	10,63
2	1	4	14,67	8,62	32,8	19,55	9,90	5,8	33,58	19,91	73,70	44,37	22,89	13,5
2	2	1	32,57	9,83	81,90	31,11	21,28	7,51	73,21	21,18	182,34	67,70	47,92	15,97
2	2	2	33,76	4,44	81,42	11,92	22,48	3,35	78,59	10,37	188,11	27,83	52,30	7,81
2	2	3	34,87	5,81	83,83	18,30	23,93	5,59	79,81	12,18	190,50	39,90	54,66	11,71
2	2	4	20,46	3,94	46,42	9,19	13,63	2,32	45,88	9,73	102,87	22,29	30,68	5,94
3	0	1	25,93	9,70	59,54	28,27	17,04	5,05	60,01	19,11	135,44	59,64	39,77	9,07

3	0	2	25,37	6,08	59,80	16,58	16,65	3,29	57,23	13,78	133,09	36,8	37,75	7,46
3	0	3	28,89	5,94	69,39	18,10	18,78	3,62	65,48	13,55	155,76	40,37	42,68	8,15
3	0	4	11,18	6,28	18,88	10,86	8,45	4,76	26,36	15,18	43,49	25,59	20,18	11,45
3	1	1	27,59	10,47	61,76	30,25	18,28	5	64,9	25,45	144,24	71,00	42,83	12,17
3	1	2	29,42	5,87	68,56	15,82	18,72	2,78	67,18	12,79	155,10	34,91	42,95	5,89
3	1	3	31,25	7,31	76,04	20,82	20,09	4	71,6	16,04	172,33	46,27	46,26	8,57
3	1	4	9,93	6,11	15,75	11,30	7,54	4,5	24,33	15,27	37,58	27,18	18,75	11,48
3	2	1	29,23	12,62	66,70	35,59	19,24	6,45	68,65	22,65	152,09	71,97	46,05	9,58
3	2	2	30,33	4,78	71,80	13,98	19,55	2,82	70,64	11,57	165,73	31,94	45,58	6,47
3	2	3	30,93	5,28	73,31	14,22	20,19	3,6	70,22	12,68	165,14	33,46	45,86	8,62
3	2	4	14,77	2,65	28,59	9,87	10,76	2,38	36,47	6,72	67,35	18,78	27,15	7,88

Tag	BK	VD	STR		LIN		WOB		ALH		BCF	
			$\bar{x}$	$\pm SD$								
0	0	1	0,83	0,04	0,54	0,06	0,65	0,05	5,43	0,60	24,93	3,07
0	0	2	0,81	0,06	0,53	0,07	0,64	0,04	5,66	0,70	24,40	2,59
0	0	3	0,82	0,07	0,54	0,09	0,65	0,06	5,56	0,70	24,38	2,82
0	0	4	0,82	0,06	0,51	0,06	0,62	0,04	5,40	0,84	23,97	2,39
0	1	1	0,82	0,06	0,51	0,05	0,62	0,03	5,73	0,79	24,03	2,06
0	1	2	0,82	0,06	0,52	0,07	0,62	0,06	5,64	0,67	23,80	1,88
0	1	3	0,82	0,06	0,52	0,07	0,63	0,04	5,72	0,69	24,35	2,15
0	1	4	0,77	0,07	0,43	0,09	0,55	0,08	5,93	0,49	23,35	1,46
0	2	1	0,81	0,05	0,52	0,07	0,63	0,04	5,65	0,60	23,8	2,23
0	2	2	0,82	0,06	0,53	0,07	0,63	0,04	5,72	0,61	24,35	1,81
0	2	3	0,81	0,05	0,51	0,06	0,63	0,04	5,52	1,05	25,13	3,46
0	2	4	0,81	0,04	0,47	0,03	0,58	0,02	5,69	0,41	24,66	2,04
1	0	1	0,69	0,04	0,28	0,02	0,41	0,02	7,44	0,65	22,74	0,68
1	0	2	0,69	0,07	0,29	0,03	0,42	0,02	7,61	0,69	23,19	1,09
1	0	3	0,71	0,01	0,31	0,06	0,42	0,03	7,24	1,05	24,16	2,14
1	0	4	0,66	0,01	0,27	0,02	0,41	0,02	6,37	1,64	23,91	3,48
1	1	1	0,67	0,05	0,27	0,02	0,41	0,02	7,32	0,93	23,18	1,53
1	1	2	0,70	0,04	0,29	0,03	0,41	0,02	7,68	0,41	23,50	1,14
1	1	3	0,68	0,06	0,29	0,04	0,42	0,02	7,60	0,55	23,15	1,13
1	1	4	0,65	0,02	0,27	0,01	0,41	0,03	5,80	1,66	22,76	0,57
1	2	1	0,67	0,04	0,28	0,04	0,42	0,04	7,00	1,13	22,88	0,62
1	2	2	0,67	0,04	0,28	0,03	0,42	0,02	7,46	0,59	22,51	0,58
1	2	3	0,66	0,07	0,28	0,04	0,42	0,02	7,47	0,54	22,59	0,85
1	2	4	0,65	0,01	0,27	0,02	0,42	0,02	6,12	1,21	23,76	2,72
2	0	1	0,66	0,04	0,28	0,07	0,42	0,08	6,84	1,93	20,54	3,57
2	0	2	0,64	0,02	0,26	0,02	0,41	0,02	7,21	0,87	22,13	0,65
2	0	3	0,64	0,02	0,26	0,02	0,4	0,03	7,55	0,75	22,02	0,97
2	0	4	0,66	0,02	0,30	0,04	0,45	0,04	3,78	0,95	20,89	2,93
2	1	1	0,68	0,06	0,31	0,12	0,45	0,12	6,85	1,90	21,56	2,12
2	1	2	0,65	0,03	0,27	0,02	0,41	0,02	7,41	1,09	22,51	1,10
2	1	3	0,65	0,03	0,26	0,02	0,41	0,03	7,36	1,12	22,34	0,89
2	1	4	0,54	0,30	0,25	0,14	0,36	0,21	3,20	1,97	18,01	10,43
2	2	1	0,64	0,04	0,26	0,02	0,41	0,05	6,78	1,59	22,12	1,50
2	2	2	0,66	0,02	0,27	0,01	0,41	0,01	7,32	0,75	22,53	0,76
2	2	3	0,67	0,06	0,28	0,03	0,42	0,03	7,24	0,73	22,65	1,73
2	2	4	0,67	0,04	0,30	0,03	0,44	0,02	4,27	0,94	23,76	2,08
3	0	1	0,69	0,13	0,36	0,21	0,50	0,18	5,83	1,53	19,71	6,51
3	0	2	0,66	0,05	0,29	0,06	0,43	0,05	5,23	1,27	22,32	1,78

3	0	3	0,65	0,02	0,28	0,03	0,42	0,03	5,99	1,52	23,39	2,58
3	0	4	0,61	0,34	0,37	0,22	0,48	0,28	3,23	1,97	12,77	8,04
3	1	1	0,70	0,16	0,42	0,33	0,54	0,26	6,19	1,63	18,12	10,18
3	1	2	0,64	0,04	0,28	0,03	0,43	0,03	6,08	1,26	22,51	1,62
3	1	3	0,65	0,04	0,27	0,03	0,42	0,02	6,51	1,39	22,47	1,50
3	1	4	0,62	0,35	0,42	0,25	0,54	0,32	2,95	1,66	17,25	10,91
3	2	1	0,70	0,13	0,39	0,26	0,52	0,22	6,61	1,94	19,29	8,06
3	2	2	0,64	0,02	0,27	0,02	0,42	0,02	6,50	0,97	22,57	1,12
3	2	3	0,65	0,01	0,27	0,01	0,42	0,02	6,24	1,14	22,51	1,17
3	2	4	0,73	0,11	0,43	0,21	0,56	0,18	3,90	1,05	17,78	2,77

### 9.3 Einstellungen des SpermVision™-Systems

SpermVision Version	3.5.6.2 (07.2009)
Einstellung:	RUDE p6o075,b1o035
Lichtintensität:	80 - 110
Motilitätsanalyse	
- Sichtfeldtiefe:	20 µm
- Pixel zu µm Verhältnis:	168 zu 100
- Zellerkennung:	20 bis 60 µm <sup>2</sup>
- Bewertungsvorraussetzungen:	4000 Spermien oder 8 Felder
- Punkte bei der Spermienbewegung:	11
- Level 1-Klassifizierung:	
- unbewegliche Spermien:	AOC < 9,5°
- lokalbewegliche Spermien:	DSL < 6,0 µm
- vorwärtsbewegliche Spermien:	AOC ≥ 9,5° und DSL ≥ 6,0 µm
- Level 2-Klassifizierung:	
- hyperaktive Spermien:	VCL > 118 µm/s, ALH > 6,5 µm und LIN < 0,5
- lineare Spermien:	STR > 0,9 und LIN > 0,5
- nicht lineare Spermien:	STR ≤ 0,9 und LIN ≤ 0,5

- kurvilineare Spermien:

DAP/Radius  $\geq 3$  und LIN  $< 0,5$

## 9.4 Chemikalien und Geräte

### 9.4.1 Lösungen, Medien und Chemikalien

- CaniPlus Chill, Konservierungsmedium für Frischsamen Hund, 20 ml, Ref Nr. 13700/0030; Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach
- CaniPlus Chill, Konservierungsmedium für Frischsamen Hund, 20 ml, Sonderanfertigung; Auftragsnummer B141713, Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach
- CaniPlus Enhance, Medium für die Hundebesamung, 20 ml, Ref Nr. 13700/0031; Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach
- Spermac Set, Färbelösungen für Morphologie, 4 x 50 ml, REF. 15405/0000; Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach
- Brain Heart Infusion Broth, 10 ml, TV5090E; Oxoid Deutschland GmbH, 46467 Wesel)
- Buffered Peptone Water, 9 ml, TV5013D; Oxoid Deutschland GmbH, 46467 Wesel)
- Blut-Agar (Basis): Artikelnummer 1.10328.0500/5000; Merck KGaA, 64293 Darmstadt
- Gassner-Agar(Basis): Artikelnummer 1.01282.5000; Merck KGaA, 64293 Darmstadt
- Natriumzitat (tri-Sodium citrate dihydrate powder EMPROVE® ESSENTIAL; Merck KGaA; 64293 Darmstadt)
- Eosin-B (Eosin B (bluish) (C. I.45400) for microscopy Certistain®; Merck KGaA; 64293 Darmstadt)
- Fruktose (D(-)-Fructose EMPROVE® ESSENTIAL; Merck KGaA 64293 Darmstadt)
- Laktose, (Artikelnummer: 8921; Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe)
- Saccharose, (Artikelnummer: 9286; Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe)
- Maltose, (Artikelnummer: 8951; Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe)
- Magermilch, (Entrahmte Milch 0,1% Fett) Schwälbchen-Molkerei Jakob Berz AG, 65307 Bad Schwalbach

#### 9.4.2 Geräte, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

- Injektionsflaschen 2R, Art.Nr.: 127572, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; 37520 Osterode am Harz
- Zählkammer "Standard Count" 20  $\mu\text{m}$ , 4 Zählbereiche, (Leja), REF. 12050/0300; Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach
- Eppendorf-Reaktionsgefäße, 3810X, Eppendorf AG, 22339 Hamburg
- epT.I.P.S.® Standard Pipettenspitzen, 0,5 – 20  $\mu\text{L}$  / 2 – 200  $\mu\text{L}$  / 50 – 1000  $\mu\text{L}$  / 0,5 - 10 mL; Eppendorf AG, 22339 Hamburg
- Pipettenspitze Best.Nr.: 70.1116 / 70.760.001 / 70.762, Sarstedt AG & Co; 51588 Nümbrecht
- Impföse, 1  $\mu\text{L}$ , Art.-Nr.: 731101; Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- Petrischale, PS, 94/16 mm Art.-Nr.: 632181; Greiner Bio-One GmbH, D-72636 Frickenhausen
- BD Falcon™ Conical Tube, 15ml, bd biosciences, 69126 Heidelberg
- Objektträger ELKA, Kanten geschnitten, 76 x 26 mm, Best-Nr.: 42400010; Karl Hecht GmbH & Co KG, 97647 Sondheim v. d. Rhön
- Deckgläser Stärke 1, 15 x 15 mm, Best-Nr.: 41000106; Karl Hecht GmbH & Co KG, 97647 Sondheim v. d. Rhön
  
- Neubauer-Zählkammer, Art.Nr.: 1080355; Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, 21031 Hamburg
- Eppendorf Reference® Einkanal-Pipetten, 2 – 20  $\mu\text{L}$  / 100 – 1000  $\mu\text{L}$  / 20 – 200  $\mu\text{L}$  / 1 – 10 ml; Eppendorf AG, 22339 Hamburg
- Rainin Pipet-Lite LTS, Einkanal-Pipette, 0,5 – 10  $\mu\text{L}$ , Mettler-Toledo GmbH, 35396
- H 500, Mikroskop, Helmut Hund GmbH; 35580 Wetzlar
- CM E, Mikroskop, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, 35578 Wetzlar
- HT 200, Wärmeplatte, Helmut Hund GmbH; 35580 Wetzlar
- WNB 45, Wärmebad, Memmert GmbH + Co. KG; 91126 Schwabach
- KD 14505 Kühlschrank; Miele & Cie. KG, 33332 Gütersloh
- PJ 300, Waage, Mettler-Toledo GmbH, 35396 Gießen

- Assistent Counter AC-15, Karl Hecht GmbH & Co KG; 97647 Sondheim
- EasySpiral® Dilute, Spiralplattierer, Interscience; 78860 Saint Nom, France
- Brutschrank IN750, Memmert GmbH + Co. KG; 91126 Schwabach
- Microflex™ LRF, Massenspektrometer, Bruker Cooperation; MA 01821 Billerica, USA

#### CASA-System:

- Software : Spermvision™ 3.5.6.2 (Minitüb GmbH 84184 Tiefenbach), Windows XP Professional
- Mikroskop: Olympus BX41 Okular (10 x), Phasenkontrastobjektiv (UPlanFINH 20×/0.50 Ph1), Digitalkamera (XM10) (Olympus Deutschland GmbH, 20097 Hamburg)
- PC: Pentium® 4 Prozessor (2,26 GHz,) 1 GB RAM, HDD: 40 GB

### **9.4.3 Herstellungsangaben selbst hergestellter Lösungen**

#### Eosin-Färbelösung (Hoffmann, 2003)

- 100ml Aqua dest.
- 3g Natriumzitrat
- 2g Eosin-B

#### Hypoosmotische Lösung (Hoffmann, 2003)

- 100ml Aqua dest.
- 0,735g Natriumzitrat
- 1,351g Fruktose

#### Gefrierschutzmittel für die *ECH* (Martin Senz, 2012), modifiziert

- 158ml Aqua dest.
- 8g Laktose
- 8g Saccharose
- 8g Maltose
- 18g Magermilch

## 9.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Übersicht über den Versuchsaufbau und die Zusammensetzung der 12 Testansätze .....	32
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Zählshablone des Spiralplattierer (EasySpiral® Dilute, Interscience) .....	36
Abbildung 3:	Beispiel eines Monitorbildes nach der Motilitätsanalyse.....	53
Abbildung 4:	Prozentsatz pathomorphologischen Veränderungen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchäufe.....	66
Abbildung 5:	Prozentsatz pathomorphologischen Veränderungen Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchäufe.....	67
Abbildung 6:	Prozentsatz nicht aufgerollter Spermischwänze im HOS-Test Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchäufe.....	68
Abbildung 7:	Ergebnisse der CASA-gemessenen Gesamtmotilität (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	70
Abbildung 8:	Ergebnisse der CASA-gemessenen Gesamtmotilität (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	71
Abbildung 9:	Ergebnisse der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	72
Abbildung 10:	Ergebnisse der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	73
Abbildung 11:	Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in $\mu\text{m}$ ) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	75
Abbildung 12:	Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in $\mu\text{m}$ ) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	75
Abbildung 13:	Ergebnisse des Bewegungsparameters DCL (in $\mu\text{m}$ ) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	76
Abbildung 14:	Ergebnisse des Bewegungsparameters STR (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchäufe.....	77

Abbildung 15: Ergebnisse des Bewegungsparameters LIN (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	78
Abbildung 16: Ergebnisse des Bewegungsparameters WOB (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	79
Abbildung 17: Ergebnisse des Bewegungsparameters ALH (in $\mu\text{m}$ ) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	80
Abbildung 18: Ergebnisse des Bewegungsparameters BCF (in Hz) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	81
Abbildung 19: Ergebnisse der, nach Eosin-Ausstrich, lebenden Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ). .....	82
Abbildung 20: Anteil morphologisch veränderter Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	84
Abbildung 21: Anteil an Spermienhalsveränderungen bzw. loser Köpfe (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	86
Abbildung 22: Anteil der im HOS-Test nicht aufgerollten, membrandefekten Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	88
Abbildung 23: Anzahl vermehrungsfähiger <i>ECH</i> in den Testansätzen in der quantitativen bakteriellen Analyse (in KBE/ml) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	91

## 9.6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen bei unterschiedlichen Spermaarten gekoppelt mit unterschiedlichen Ort der Samendeponierung.....	5
Tabelle 2: Qualitätskriterien für Rüdensperma .....	9
Tabelle 3: Mittelwerte der Versuchsergebnisse zum Einfluss des Tiefrierens auf eine mit Gefrierschutzmedium versetzte <i>ECH</i> -Suspension.....	38
Tabelle 4: Anzahl der <i>ECH</i> -Keimdichte in der BHI nach Anreicherung; Verdünnung und Ausplattieren auf Blut-Agar.....	39
Tabelle 5: Anzahl der Kolonien der stichprobenartigen Auftaukontrolle der angefertigten <i>ECH</i> -Suspensionen (BK 1 und BK 2) .....	41

Tabelle 6:	Zählergebnisse und errechneter Mittelwert der in den Versuchsdurchläufen 1 - 5 verwendeten <i>ECH</i> -Suspensionen (BK 1 und BK 2) zur Überprüfung der eingesetzten Keimdichte in den Versuchsdurchläufen.....	42
Tabelle 7:	Auflistung der im Versuch abgesamten Rüden .....	43
Tabelle 8:	Befundungsprotokoll für die Erhebung der Spermienmorphologie .....	49
Tabelle 9:	Tabellarische Darstellung der für die SpermVision® Motilitätsanalyse verwendeten Einstellungen und Richtwerte .....	51
Tabelle 12:	Ergebnisse der qualitativen bakteriologischen Untersuchung der gepoolten spermareichen Fraktion.....	60
Tabelle 10:	Darstellung des Verdünnungsverhältnisse von Spermien : Verdünnung in den einzelnen Versuchsdurchläufen .....	61
Tabelle 11:	Gentamicin-Endkonzentration in den einzelnen Testansätzen in den unterschiedlichen Versuchsdurchläufen .....	61
Tabelle 13:	Prozentsatz der CASA-gemessenen Gesamtmotilität Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe.....	62
Tabelle 14:	Prozentsatz der CASA-gemessenen vorwärtsbeweglichen Spermien Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe.....	63
Tabelle 15:	Prozentsatz an im Eosin-Ausstrich als lebend gezählte Spermien Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe.....	65
Tabelle 16:	Anteil morphologisch veränderter Spermien (in %) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung (SD) der Versuchsdurchläufe.....	160
Tabelle 17:	Ergebnisse der CASA-gemessenen Parameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH und BCF) Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der Versuchsdurchläufe.....	161

## 10 Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Axel Wehrend für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. vet. Sandra Goericke-Pesch für die hervorragende Betreuung. Sie stand mir stets mit einem offenen Ohr für meine Fragen und mit konstruktiver Kritik bestärkend zur Seite. Für Ihre Ermunterung zur Promotion und Ihre Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Tobias Eisenberg bei der Unterstützung bei mikrobiologischen Fragen sowie deren Bewältigung und für die Kooperationsbereitschaft mit dem Landesbetrieb Hessisches Landeslabor.

Herrn Andreas Schaubmar und Dr. Klaus Failing von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die sehr nette und geduldige Betreuung des statistischen Teils dieser Arbeit und der Hilfe bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen und des Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, die stets hilfsbereit waren und allen Tierbesitzern, die mir bereitwillig mit ihren Rüden zur Verfügung standen.

Zuletzt möchte ich noch meinen Freunden für die stetige Motivierung und insbesondere Nena für ihre Korrekturarbeit danken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Nicole und meinen Eltern, die mich auf dem gesamten Weg unterstützt haben, wo sie konnten und somit diese Arbeit ermöglicht haben.

## 11 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde 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, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift