

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Ein Vergleich zwischen den Vitalfärbungen  
Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin  
und dem NucleoCounter SP-100®  
zur Beurteilung der Spermienmembranintegrität  
bei Spermaproben von Rüden und Bullen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von  
Lena Daub  
aus Tübingen

2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Tag der Promotion: 31. Januar 2015

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Spermatozoa.....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Morphologie des reifen Spermiums	2
2.1.2 Biochemie und Aufgaben der Plasmamembran	3
<b>2.2 Spermauntersuchung .....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Makroskopische Spermauntersuchung	5
2.2.2 Mikroskopische Spermauntersuchung	7
<b>2.3 Vitalfärbungen .....</b>	<b>12</b>
2.3.1 Einsatz von Vitalfärbungen in Nativsperma	12
2.3.2 Einsatz von Vitalfärbungen in Tiefgefriersperma	20
2.3.3 Klassifizierung der Spermien	23
2.3.4 Nachfärbungen von Spermien	25
2.3.5 Reproduzierbarkeit der Beurteilung und Einfluss des Untersuchers	25
2.3.6 Vitalfärbungen im Vergleich zu anderen Parametern	26
<b>2.4 Der NucleoCounter SP-100® .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Bedienung und Einsatzbereich	29
2.4.2 Reproduzierbarkeit der Messungen	30
2.4.3 Vergleich des NucleoCounters® mit anderen Methoden zur Bestimmung der Spermienkonzentration	31
2.4.4 Vergleich von Vitalfärbungen mit Fluoreszenzfärbungen	33
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Untersuchte Tiere und Probengewinnung.....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Frischsperma	36
3.1.2 Tiefgefriersperma	38
<b>3.2 Verarbeitung der Spermaproben .....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Messungen mit dem NucleoCounter®	39
3.2.2 Einsatz der Vitalfärbungen	40
<b>3.3 Versuchsaufbau .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Versuchskontrollen.....</b>	<b>47</b>
3.4.1 Kontrollmessungen mit dem NucleoCounter®	47
3.4.2 Wöchentliche Verlaufsauswertung der vitalgefärbten Ausstriche	47
<b>3.5 Statistische Auswertung .....</b>	<b>47</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
<b>4.1 Messungen mit dem NucleoCounter® .....</b>	<b>49</b>
4.1.1 Dichte und Vitalität	49

4.1.2 Kontrollmessungen	51
<b>4.2 Auswertung der vitalgefärbten Ausstriche</b> .....	<b>52</b>
4.2.1 Alter der Ausstriche zum Zeitpunkt der Auswertung	52
4.2.2 Vorkommen von nicht auswertbaren Ausstrichen	52
4.2.3 Vorkommen von halbgefärbten Spermien	53
4.2.4 Vergleich der drei Vitalfärbungen untereinander	55
4.2.5 Reproduzierbarkeit bei mehrfacher Beurteilung eines Ausstriches	61
4.2.6 Reproduzierbarkeit bei Anfertigung mehrerer Ausstriche einer Probe	65
4.2.7 Wöchentliche Verlaufsauswertung der vitalgefärbten Ausstriche	70
<b>4.3 Vergleich der Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter®</b> .....	<b>75</b>
4.3.1 Vergleich der Ergebnisse	75
4.3.2 Einfluss des Untersuchers	77
4.3.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von der Qualität der Probe	81
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>86</b>
<b>5.1 Diskussion der Methode</b> .....	<b>86</b>
5.1.1 Proben	86
5.1.2 NucleoCounter SP-100®	86
5.1.3 Vitalfärbungen	88
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>91</b>
5.2.1 NucleoCounter SP-100®	91
5.2.2 Vitalfärbungen	92
5.2.3 Vergleich der Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter®	94
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	<b>98</b>
<b>7 Summary</b> .....	<b>100</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>102</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>113</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>123</b>
<b>11 Anhang</b> .....	<b>125</b>
<b>12 Danksagung</b> .....	<b>174</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestillata
BN	Bromphenolblau-Nigrosin
ca.	circa
dest.	destillata
E	Eosin
EN	Eosin-Nigrosin
engl.	englisch
et al.	et alii
Exkl.	exklusive
HOS-Test	hyposmolarer Schwelltest
HRF	Gruppe 1 (Hund Rüde Frischsperma)
HRT	Gruppe 2 (Hund Rüde Tiefgefriersperma)
Inkl.	Inklusive
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Max	Maximum
Min	Minimum
Mio	Millionen
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NC	NucleoCounter SP-100 (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark)
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
RBF	Gruppe 3 (Rind Bulle Frischsperma)
RBT	Gruppe 4 (Rind Bulle Tiefgefriersperma)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

# 1 Einleitung

Die zunehmende Anwendung der assistierten Reproduktion beim Rüden und Bullen erfordert immer genauere, schnellere und kostensparendere Maßnahmen zur Evaluation der Spermaqualität. Dabei stellt die Bestimmung der Spermiovitalität neben der Motilitätsbeurteilung einen wichtigen Parameter im andrologischen Labor dar, um die Gesamtzahl lebender Spermien in einer Spermaprobe zu bestimmen.

Für die Bewertung der Integrität der Spermienmembran werden seit langem sogenannte „Lebend-Tot“-Färbungen eingesetzt und dadurch der Prozentsatz an toten Spermien evaluiert. Die ersten erfolgreichen Ergebnisse mit Vitalfärbungen wurden im Rahmen von Untersuchungen an Schafbockspermien 1942 erzielt (LASLEY et al.). Die selektive Permeabilität von lebenden Zellen und die damit einhergehende relative Widerstandsfähigkeit gegen viele Farbstoffe stellt dabei die Basis für das Färbeprinzip dar.

Der NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) ist ein portables Gerät mit integriertem Fluoreszenzmikroskop, welches seit Anfang des neuen Jahrhunderts auf dem Markt ist und sowohl der Konzentrationsmessung als auch der Vitalitätsbestimmung dient, wodurch der Prozentsatz an toten Spermien wiederum errechnet werden kann.

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die drei Vitalfärbungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin mit den Ergebnissen des NucleoCounters<sup>®</sup> zu vergleichen. Parallel dazu wurde bei der Auswertung der Vitalfärbungen sowohl die Reproduzierbarkeit dieser Untersuchungstechniken als auch der Einfluss des Untersuchers und der Lagerungsdauer der Ausstrichpräparate analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden innerhalb von 2 Jahren (2012/2013) Versuche zu Ejakulaten von Rüden und Bullen durchgeführt. Es kamen sowohl Proben von Frischsperma als auch von Tiefgefriersperma zum Einsatz. Die Proben wurden aus dem Patientengut der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München und den Besamungsstationen Grub und Neustadt Aisch gewonnen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Spermatozoa

Spermien sind männliche Keimzellen, welche zu eigenständiger Bewegung fähig sind und die Aufgabe haben, den haploiden Chromosomensatz im weiblichen Genitaltrakt bis zur Eizelle zu transportieren, um diesen bei der Befruchtung der Oozyte zu übertragen (PEÑA et al., 2009). Sie wurden erstmals 1677 von dem Wissenschaftler Van Leeuwenhoek entdeckt und „animalcula“ genannt (PESCH & BERGMANN, 2006). Die Gestalt und Größe eines Spermiums variiert je nach Tierart, die Grundstruktur weist jedoch bei den verschiedenen Spezies Gemeinsamkeiten auf.

#### 2.1.1 Morphologie des reifen Spermiums

Das Spermatozoon des Rüden ist im Durchschnitt 61,4 µm (CUMMINS & WOODALL, 1985; WOODALL & JOHNSTONE, 1988) lang, das des Bullen 75-90 µm (SCHNORR, 1996). Die Gesamtlänge korreliert beim Rüden nicht signifikant mit dem Körpergewicht (WOODALL & JOHNSTONE, 1988). Ein Spermium wird im Wesentlichen in einen Kopf und einen Schwanz untergliedert (LADHA, 1998).

Am Spermienkopf lassen sich ein Kern (Nucleus), ein Akrosom (Kopfkappe) und eine postakrosomale Region differenzieren. Der aus dicht kondensiertem Chromatin bestehende Zellkern enthält den haploiden Chromosomensatz und macht den größten Anteil des Kopfes aus. Das Akrosom bedeckt den Kern kappenartig zu etwa zweidrittel und beinhaltet hydrolysierende Enzyme (u.a. Hyaluronidase und Akrosin), welche eine wichtige Bedeutung bei der Penetration der Schutzhüllen der Eizelle (Corona radiata und Zona pellucida) haben und während der Akrosomenreaktion freigesetzt werden (ROVAN, 2011). Das hintere Eindrittel wird als postakrosomale Region bezeichnet, welche durch das Äquatoralsegment von dem Akrosom getrennt wird. Die Basalplatte befindet sich am Abschluss des Kopfes. Der Spermienkopf des Rüden ist oval geformt und ist im Durchschnitt 6,1 µm lang und 3,8 µm breit

(WOODALL & JOHNSTONE, 1988), der des Bullen 9,15  $\mu\text{m}$  lang und 4,25  $\mu\text{m}$  breit (SCHMOLLICH & MICHEL, 1992).

Der Spermischwanz wird in ein Hals-, Mittel-, Haupt- und Endstück eingeteilt (SAACKE & ALMQUIST, 1964) und dient der Fortbewegung im weiblichen Genitaltrakt. Den größten Anteil bildet das Hauptstück mit ca. 45,2  $\mu\text{m}$  Länge beim Rüden (CUMMINS & WOODALL, 1985; WOODALL & JOHNSTONE, 1988) und 64,84  $\mu\text{m}$  beim Bullen (SCHMOLLICH & MICHEL, 1992). Der Spermienhals stellt die Verbindung zwischen Spermienkopf und dem distalen Schwanzanteil her. Darauf folgt das Mittelstück, welches beim Rüden etwa 10,1  $\mu\text{m}$  (WOODALL & JOHNSTONE, 1988) und beim Bullen 14,84  $\mu\text{m}$  (SCHMOLLICH & MICHEL, 1992) lang ist. Zentral befindet sich der Achsenfaden (Axonema), welcher von neun Mantelfasern begleitet wird. Mitochondrien umgeben diese Mantelfasern und sorgen für die Vorwärtsbewegung benötigte Energie, indem sie ATP bereitstellen (PEÑA et al., 2009). Die äußeren Mikrotubuli gleiten an den inneren Mikrotubuli durch die Spaltung von ATP in Dynein- und Kinesinmolekülen entlang und erzeugen dadurch die Schlagbewegung der Geißel (ROVAN, 2011). Das Mittelstück wird durch den Schlussring vom Hauptstück getrennt. In diesem Abschnitt werden der Achsenfaden und die Mantelfasern zusätzlich von Ringfasern umgeben. Das Endstück ist mit 4-6  $\mu\text{m}$  Länge und 9,2  $\mu\text{m}$  Breite beim Rüden und 4-6  $\mu\text{m}$  Länge beim Bullen verhältnismäßig kurz und dünn (SINOWATZ, 2001). Dies beruht auf dem Fehlen der Mantel- und Ringfasern. Dieser Abschnitt besteht daher lediglich aus dem Achsenfaden und der umgebenden Zellmembran (ROVAN, 2011).

### **2.1.2 Biochemie und Aufgaben der Plasmamembran**

Die Plasmamembran umhüllt das gesamte reife Spermatozoon. Sie ist heterogen und besteht aus fünf spezifischen Domänen (Akrosom, Equatorialregion, Basalsegment, Mittelstück, Schwanz), deren Unterschiede auf den verschiedenen physiologischen Funktionen beruhen (LADHA, 1998). Die Plasmamembran besteht wie alle Biomembranen aus Proteinen (TÖPFER-PETERSEN & WABERSKI, 2001). Die Hauptlipide lassen sich in Phospholipide, Glykolipide und Sterine unterteilen (PARKS & LYNCH, 1992). Die Intaktheit dieser Membran ist essentiell für die Funktionsfähigkeit der Samenzelle (BRITO et al., 2003; HOLT & NORTH, 1984; KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994). Zum einen dient sie dem mechanischen Schutz,

zum anderen erfüllt sie wichtige Aufgaben als selektive und kontrollierende Barriere im Transport von Molekülen (HAMMERSTEDT et al., 1990; JEYENDRAN et al., 1984). Dadurch fungiert die Membran als Regulator von intrazellulären metabolischen Aktivitäten und steuert sowohl den pH-Wert, als auch die Ionenzusammensetzung sowie das osmotische Volumen des Spermiums. Aufgrund des hohen Anteils an ungesättigten Fettsäuren sind Spermien sehr anfällig gegenüber oxidativem Stress (KODAMA et al., 1996).

## 2.2 Spermauntersuchung

Das Ziel einer Spermauntersuchung ist es, eine Aussage über die Fertilität eines Ejakulats zu treffen (BRITO et al., 2003; PEÑA-MARTINEZ, 2004). Dabei lässt sich durch Untersuchung von Frischsperma die Funktion von Hoden und Nebenhoden evaluieren, wohingegen bei Untersuchung von Tiefgefriersperma das Augenmerk auf dem möglichen Schaden liegt, welcher durch den Einfrier- und Auftauprozess entstanden ist. Zur Anwendung kommt die Spermauntersuchung daher vor allem bei der Überprüfung der Zuchttauglichkeit und im Rahmen der künstlichen Besamung. Es existieren verschiedene Analysemethoden, um die Spermaqualität sowohl subjektiv als auch objektiv zu beschreiben. Die klassische Untersuchung wird in eine makroskopische und mikroskopische unterteilt. Nachteile der konventionellen Untersuchungstechniken liegen in der Subjektivität, Variabilität und der geringen Anzahl an untersuchten Spermien (RIJSSELAERE et al., 2005).

Darüber hinaus gibt es weitere Verfahren, welche meist spezialisierten Laboren vorbehalten bleiben. Diese Methoden arbeiten oft Computer-unterstützt und bieten daher die Möglichkeit, die oben genannten Einflüsse zu minimieren.

Eine Garantie zur erfolgreichen Befruchtung liefern Normwerte bei der herkömmlichen Spermauntersuchung nicht, sondern es werden lediglich Tiere mit zu erwartenden Fertilitätsproblemen identifiziert (MOCE & GRAHAM, 2008). Eine Bestätigung der *Potentia generandi* kann nur durch eine nachgewiesene Konzeption erfolgen (AMANN & HAMMERSTEDT, 1993).

### 2.2.1 Makroskopische Spermauntersuchung

In der makroskopischen Spermauntersuchung werden Parameter festgehalten, die sich ohne Verwendung eines Mikroskops bestimmen lassen. Hierzu gehören das Volumen, das Aussehen und Beimengungen, sowie die Untersuchung des pH-Wertes.

Das Ejakulatvolumen ist abhängig von Tierart, Rasse, Alter, Vererbung und Umwelt. Das Volumen korreliert nicht mit der Spermaqualität. Die Messung des Volumens

wird bei jedem Tier im Besamungseinsatz festgehalten, um zusammen mit der Spermienkonzentration die Gesamtspermienzahl im Ejakulat errechnen zu können. Die Gesamtspermienzahl wiederum stellt einen Indikator der Spermaqualität dar und ist notwendig für die Berechnung von Besamungsportionen (ROOT KUSTRITZ, 2007).

Farbe und Konsistenz eines Ejakulates werden durch die Spermienanzahl, die Beschaffenheit des Sekrets der akzessorischen Drüsen sowie der Beimengungen beeinflusst und subjektiv bewertet (ROOT KUSTRITZ, 2007). Die Konsistenz wird in rahmig, milchig, molkig und wässrig differenziert. Die Trübung kann bei Vorliegen von physiologischem Sperma ein direkter Indikator der Spermienkonzentration darstellen. Die Farbe wird in elfenbeinfarben, weißlich, weißlich-gelb, gelblich und weißlich-grau unterschieden. Verfärbungen können auf eine Kontamination mit Urin oder Blut hindeuten (FRESHMAN, 2002). Die teilweise gelbliche Farbe des Bullenejakulates beruht auf dem Vorhandensein von Riboflavin (WHITE & LINCOLN, 1960).

Die Messung des pH-Wertes erfolgt mithilfe von Indikatorpapier (FRESHMAN, 2002) oder wird durch ein pH-Meter bestimmt (BARTLETT, 1962).

Für Tiefgefriersperma beschränkt sich dieser Untersuchungsabschnitt auf die Ablesung des Volumens einer Spermaprobe. Referenzwerte für Frischsperma von Rüden und Bullen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

**Tabelle 2.1** Referenzbereiche für Haustierejakulate (Makroskopische Untersuchung)  
nach Busch, 1991, Aurich et al., 1995, Riesenbeck et al., 2001  
In Hoffmann (2003): „Andrologie – Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung“

Tierart	Volumen (ml)	Farbe	Konsistenz	pH-Bereich
<b>Bulle</b>	2-10	Elfenbeinfarben - gelb	Wässrig - rahmig	6,2 - 6,8
<b>Rüde</b>	5-30	Weißlich	Wässrig - milchig	6,7 - 6,8

## **2.2.2 Mikroskopische Spermauntersuchung**

Anschließend an die makroskopische Spermauntersuchung wird das Sperma mit Hilfe des Mikroskops auf weitere Parameter untersucht. Dabei werden die Motilität, die Intaktheit der Plasmamembran, die Spermienkonzentration und die Morphologie der Spermien evaluiert. Referenzwerte für die genannten Parameter sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

### **2.2.2.1 Beurteilung der Spermienmotilität**

Unter Motilität versteht man die Bewegungsaktivität der Spermien. Die Bestimmung erfolgt immer direkt im Anschluss an die Spermagewinnung (FRESHMAN, 2002). Die konventionelle Motilitätsschätzung beruht auf der subjektiven Beurteilung des Untersuchers und ist einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen (JOHNSTON, 1991). Als Nachteil dieser Methode ist der Einfluss des Untersuchers zu nennen (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001). Eine objektivere Beurteilung ermöglichen moderne Techniken wie die computergestützte Spermienanalyse (CASA). Dabei können verschiedene Bewegungsparameter evaluiert werden (GRAHAM & MOCE, 2005). Voraussetzung für die Bewegungsfähigkeit stellt eine funktionale und strukturelle Kompetenz des Spermiums dar (PEÑA-MARTINEZ, 2004). Daher korreliert die progressive Motilität mit der Morphologie (ELLINGTON et al., 1993) und der Membranintegrität (KUMI-DIAKA, 1993). Eine Vorwärtsbeweglichkeit ist notwendig für die effektive Fortbewegung des Spermiums bis zur Eizelle und eine erfolgreiche Fertilisation. Hierfür ist auch eine ausreichende Energieproduktion durch die Mitochondrien Voraussetzung (RUIZ-PESINI et al., 1998).

Zur Beurteilung der Motilität wird die Einzelbewegung differenziert nach vorwärtsbeweglichen, ortsbeweglichen und unbeweglichen Spermien. Die Untersuchung wird mit einem Phasenkontrastmikroskop mit eingebautem Heiztisch durchgeführt. Hierzu werden ca. 2µl Sperma auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckglas bei 200- bis 400-facher Vergrößerung beurteilt. Bei Frischsperma des Bullen kann bei sehr hoher Konzentration und guter Motilität zusätzlich eine Massenbewegung erfasst werden. Dazu wird ein Tropfen Sperma ohne Deckglas bei 80- bis 100-facher Vergrößerung im Hellfeld betrachtet.

### **2.2.2.2 Beurteilung der Spermienkonzentration**

Unter der Spermienkonzentration versteht man die Spermienanzahl pro Raumeinheit. Sie wird auch Dichte genannt und in der Regel in Millionen pro Milliliter angegeben. Damit ist die Konzentration der einzige Parameter, der nicht die Qualität, sondern die Quantität bestimmt. Vor allem bei der künstlichen Besamung ist die Kenntnis über die Gesamtspermienzahl hilfreich, um ausreichende Inseminationsdosen sicherzustellen. Als Goldstandard zur Bestimmung der Spermienkonzentration wird die Zählkammer unter Verwendung eines Lichtmikroskops angesehen (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2010). Diese Methode benötigt keine kostspielige Ausstattung, beinhaltet jedoch sehr arbeitsintensive und zeitaufwendige Schritte, welche für Routinemessungen nicht praktikabel sind. Voraussetzungen, um ein genaues und reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, sind sowohl eine gute Durchmischung und Verdünnung des Ejakulats, als auch Routine in der Auswertung. Einige Studien lassen daher an der Genauigkeit der Methode zweifeln (CHRISTENSEN et al., 2005; HU et al., 2006; JOHNSON et al., 1996; SEAMAN et al., 1996).

### **2.2.2.3 Beurteilung der Spermiovitalität**

Unter Spermiovitalität oder Membranintegrität versteht man den Zustand der Plasmamembran. Die Intaktheit der Membran ist essentiell für die Funktion der Samenzelle (VAZQUEZ et al., 1997).

Zur Differenzierung von lebenden und toten Samenzellen können Vitalfärbungen eingesetzt werden. Durch den Tod eines Spermiums ändert sich der kolloidale Zustand der Zellmembran, wodurch Farbstoffe eindringen und das Spermium anfärben können. Die Integrität der Plasmamembran ist eine essentielle Bedingung für eine generelle Zellfunktion und somit für die Befruchtungskompetenz (GRAHAM & MOCE, 2005; PEÑA et al., 1998; RIJSSELAERE et al., 2005). Für die Auswertung wird ein Ausstrichpräparat mit einer Mischung aus Farbstoff und Ejakulat angefertigt und mindestens 200 Spermien bei Hellfeldbeleuchtung ausgezählt. Dabei werden gefärbte Spermien als tot und ungefärbte Spermien als lebend beurteilt. Die Vorteile von Vitalfärbungen liegen in der einfachen und kostengünstigen Durchführung. Ein Nachteil stellt die subjektive Beurteilung des Färbezustandes von jedem einzelnen

Spermium sowie die geringe Anzahl an untersuchten Spermien dar (JOHANSSON et al., 2008). Ebenso beinhaltet die Anfertigung viele manuelle Schritte, woraus eine Verminderung der Reproduzierbarkeit resultieren kann. Gründe dafür sind unter anderem eine ungleiche Verteilung der Spermien im Präparat und unterschiedlich lange Färbezeiten (BJÖRNDAHL et al., 2004).

Eine weitere Methode zur Evaluierung des physiologischen Membranzustandes stellt der hypoosmolare Schwelltest (HOS-Test) dar, mit dessen Hilfe die biochemische Aktivität und somit die Intaktheit der Plasmamembran überprüft werden kann. Angewendet wird hierbei das Prinzip der Osmose. Die Spermien werden in eine hypoosmolare Lösung verbracht und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Eine intakte Samenzelle reagiert auf die veränderte Umgebung und versucht ein osmotisches Gleichgewicht zu erreichen, indem sie Wasser aufnimmt und dadurch anschwillt. Da dies nur begrenzt möglich ist, wird die Reaktion durch das Einrollen des Spermiumschwanzes für den Untersucher mikroskopisch sichtbar und prozentual ausgewertet (JEYENDRAN et al., 1984). Ursprünglich wurde dieser Test für humane Spermien entwickelt (JEYENDRAN et al., 1984), er wird inzwischen aber auch bei verschiedenen Haustierarten erfolgreich angewandt (CORREA & ZAVOS, 1994; ENGLAND & PLUMMER, 1993; KUMI-DIAKA, 1993; LECHNIAK et al., 2002; VAZQUEZ et al., 1997). Die Fähigkeit der Spermien anzuschwellen steht mit der Funktionsfähigkeit und chemischen Aktivität ihrer Plasmamembran in Zusammenhang (SCHRADER et al., 1986). Veränderungen der Spermienmembran können dadurch zuverlässig und mit guter Reproduzierbarkeit erkannt werden, da membrangeschädigte und tote Spermien reaktionslos bleiben (ENGLAND & PLUMMER, 1993). Der HOS-Test ist einfach in seiner Durchführung und kann daher ergänzend zu den anderen Untersuchung durchgeführt werden (JEYENDRAN et al., 1992). Die Eignung des HOS-Tests hinsichtlich der Fertilitätsprognose wird kontrovers diskutiert. Einige Forscher konnten in ihren Untersuchungen nur eine geringe Korrelation zwischen HOS-Test und Motilität, Morphologie oder Plasmamembranintegrität feststellen (BRITO et al., 2003; ENGLAND & PLUMMER, 1993; JEYENDRAN et al., 1984). In anderen Studien wiederum konnten Korrelationen zwischen verschiedenen Untersuchungsparametern mit einer entsprechenden prognostischen Aussagekraft nachgewiesen werden (CORREA & ZAVOS, 1994; KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994; VAZQUEZ et al., 1997).

Die herkömmlichen Methoden basierend auf einem Lichtmikroskop werden zunehmend ergänzt durch eine Vielzahl an Fluoreszenzfärbungen, die auch eine Beurteilung der Plasmamembranintegrität ermöglichen (PEÑA et al., 2001; RIJSSELAERE et al., 2005). Diese Färbungen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Prinzip der Fluoreszenzfärbung wird auch beim NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) eingesetzt.

Ein weiteres Analyseverfahren stellt die Durchflusszytometrie dar. Auch hier werden die Spermien mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes angefärbt und die Fluoreszenz-Emission der Samenzellen nach Laseranregung in einer Suspension gemessen. Dadurch können die Spermien hinsichtlich ihrer Quantität und Vitalität untersucht werden, wobei nur eine geringe Probenmenge benötigt wird (CHRISTENSEN et al., 2004a). Die SYBR-14/PI-Färbung ist hierfür eine der gängigsten Methoden. Dabei stellt Propidiumiodid (PI) eine Membran-impermeable Färbung dar, während SYBR-14 eine membrangängige Färbung ist (GARNER & JOHNSON, 1995; GILLAN et al., 2005). Die Vorteile liegen in der Reproduzierbarkeit und der Möglichkeit, eine Vielzahl an Spermien in kurzer Zeit zu analysieren (GILLAN et al., 2005; PEÑA et al., 1998; RIJSSELAERE et al., 2005). Als Nachteil sind die hohen Anschaffungskosten und die nötige Erfahrung des Untersuchers in der korrekten Bedienung des Gerätes zu nennen (GILLAN et al., 2005). Die Durchflusszytometrie wird in Bezug auf die Genauigkeit der Messungen hoch angesehen (CHRISTENSEN et al., 2004; EUSTACHE et al., 2001; PRATHALINGAM et al., 2006).

#### **2.2.2.4 Beurteilung der Spermienmorphologie**

Durch eine morphologische Untersuchung wird versucht den prozentualen Anteil von Spermien mit Formveränderungen zu erfassen und dabei die Anomalien genauer zu benennen. Diese werden in primäre, sekundäre und tertiäre Defekte differenziert. Primäre Defekte lassen sich auf eine fehlerhafte Spermatogenese zurückführen. Sekundäre Defekte beruhen auf pathologischen Vorgängen während der Reifung im Nebenhoden oder der Passage durch den Ductus deferens und die Urethra (FRESHMAN, 2002). Tertiäre Defekte entstehen erst nach der Spermagewinnung. Ein Schema zur Klassifizierung von Anomalien in der Tiermedizin haben LEIDL et al. (1971) entworfen. Liegt der Prozentsatz an Anomalien bei einem Tier nicht im Referenzbereich für die Art, so spricht man von einer Teratozoospermie. Die

einfachste subjektive Untersuchungsmöglichkeit bietet die konventionelle Lichtmikroskopie oder Phasenkontrastmikroskopie mit oder ohne Hilfe von Vitalfärbungen (ROOT KUSTRITZ et al., 1998).

**Tabelle 2.2** Referenzbereiche für Haustierejakulate (Mikroskopische Untersuchung) nach Busch, 1991, Aurich et al., 1995, Riesenbeck et al., 2001  
In Hoffmann (2003): „Andrologie – Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung“

<b>Tierart</b>	<b>Dichte <math>10^6/\mu\text{l}</math></b>	<b>vorwärtsbewegliche Spermien</b>	<b>Vitalität</b>	<b>Morphologie</b>
<b>Bulle</b>	1,2	70%	>70%	<20%
<b>Rüde</b>	0,2-1,0	70%	>70%	<30%

## 2.3 Vitalfärbungen

Für Färbemethoden zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen sind die Ausdrücke Vitalfärbung, Supravitalfärbung, Differentialfärbung oder Lebend-Tot-Färbung gebräuchlich. Schon früh wurden Vitalfärbungen bei Hefen (DEVEREUX & TANNER, 1927; FRASER, 1919) und Bakterien (GAY & CLARK, 1934; KNAYSI, 1935) verwendet. Seit dem ersten Einsatz von Vitalfärbungen an Spermien 1942 (LASLEY et al.) wurden in den vergangenen Jahrzehnten Versuche zu weiteren Farbstoffen an Spermien verschiedener Tierarten durchgeführt. Im Folgenden soll eine Übersicht über die bisher beschriebenen Färbemethoden gegeben werden.

### 2.3.1 Einsatz von Vitalfärbungen in Nativsperma

#### 2.3.1.1 Vitalfärbungen mit Eosin

Eosin gehört der Gruppe der Xanthenfarbstoffe an. Es wird Eosin-B und Eosin-Y unterschieden. Eosin-Y besitzt einen Gelbstich (Y für engl. yellowish), Eosin-B dagegen einen Blaustich (B für engl. bluish). Eosin-B besitzt im Vergleich zu Eosin-Y zwei Nitrogruppen statt zweier Bromatome. Eosin lässt sich vom Fluoreszein ableiten und ist ein wasserlösliches halogeniertes Derivat.

#### ***Eosin-Opalblau***

Eosin-Opalblau war die erste Färbemethode, die an Spermien eingesetzt wurde. Dazu verwendeten LASLEY et al. (1942) eine 2%ige Eosin-Lösung in isotonischen Phosphatpuffer bei Spermien vom Schafbock. Opalblau diente hierbei lediglich als Hintergrundfärbung, um den Kontrast zu verbessern. Die Farbmischung hatte einen pH-Wert von 6,7. Als optimale Temperatur stellte sich 25° Celsius heraus, da bei 0° Celsius und 40° Celsius ein signifikant höherer Prozentsatz an Spermien angefärbt war. Bei einer durchgeführten Positivkontrolle färbten sich alle Spermien zuverlässig an, wenn sie vor der Anfertigung der Ausstriche zum Beispiel durch Alkohol abgetötet wurden. Um Bakterienwachstum zu verhindern, musste die Färbelösung gekühlt gelagert werden.

Eine Färbelösung aus Opalblau (12,5%) und Eosin (0,5%) prüften auch EMIK und SIDWELL (1947) beim Schafbock. Sie bewerteten sie als eine einfache und schnelle

Methode, die auch für eine morphologische Auswertung herangezogen werden kann. Sie konnten Unterschiede je nach Farbstoffkonzentration und pH-Wert feststellen. Der beste Farbkontrast ergab sich bei einem pH-Wert von 7,15. Signifikant mehr gefärbte Spermien waren bei pH-Werten von 5 und 9 zu verzeichnen. Die Farbstofflösung selbst war ohne Lichtschutz über 4 Jahre brauchbar. Sie wurde jährlich erwärmt und gefiltert. Eine Einwirkzeit von 30 Sekunden wurde als optimal befunden. Bis zu diesem Zeitpunkt ergaben sich keine Änderungen in Bezug auf die Anzahl toter Spermien. Die Qualität der Ausstriche war bei einer Lagerung in Aufbewahrungsboxen über 4 Jahre gleichbleibend.

### ***Eosin***

Die ersten Versuche zu einer reinen Eosin-B-Färbung werden von MAYER et al. (1951) mit Schafbocksperma und BOGUTH und MÜLLER (1951) mit Bullensperma beschrieben. In Bezug auf die zu verwendende Eosin-Konzentration findet man in der Literatur verschiedenen Angaben. Bei MAYER et al. (1951) stellte sich eine 0,4%ige Lösung als beste Konzentration heraus. Bei einem Vergleich von Eosin-B und Eosin-Y zeigte sich, dass durch Eosin-B die Spermien tiefer rot gefärbt wurden als mit Eosin-Y. BOGUTH und MÜLLER (1951) empfahlen eine 5%ige Eosin-Y-Lösung. Laut Autoren ist die Geschwindigkeit, in der die Spermien absterben von der Temperatur und der Farbstoffkonzentration, sowie von dem untersuchten Sperma abhängig. Vor allem unter Verwendung eines Blaufilters war es Ihnen möglich, die Auswertung zu vereinfachen, da dadurch der Kontrast gesteigert wurde. PLÖTHNER (1954) wiederum sprach sich beim Bullen für eine 2%ige Lösung (Eosin-Y) und ÖNCÜL (1956) für eine 5%ige Lösung (Eosin-B und -Y) aus, da mit einer 1%igen Lösung signifikant weniger Spermien gefärbt waren. ELIASSON und TREICHL (1971, zitiert nach BJÖRNDAHL et al., 2004) veröffentlichten eine Eosin-Y-Färbung für humane Ejakulate und verwendeten zur Auswertung eine negative Phasenkontrast-Einstellung. Sie fanden heraus, dass ein Eosin-Gehalt von mehr als 7g/l den Prozentsatz an toten Spermien anstiegen lies, wenn die Inkubationszeit länger als 15 Sekunden betrug. Bei Untersuchungen zu verschiedenen Eosin-Konzentrationen von 1, 2,5 und 5% mit humanem Sperma stellten DOUGHERTY et al. (1977) fest, dass die Ausstriche mit der 5%igen Lösung qualitativ am besten waren und auch die Ergebnisse der Auswertung sehr gut mit der Motilitätsschätzung korrelierten. Allerdings wurde die Beobachtung gemacht, dass Eosin mit der Zeit in

ungefärbte Zellen diffundiert und somit die Ausstriche auf Dauer unbrauchbar macht (EMMENS & BLACKSHAW, 1956). Auch RAUHAUS (1990) erwähnt als Nachteil des Eosins seine zytotoxische Wirkung, die laut BONADONNA (1954) stärker sei als beispielsweise die des Bromphenolblaus.

MAYER et al. (1951) konnten durch ihre Untersuchungen zeigen, dass der pH-Wert der Eosin-Färbung (B) zwischen 6,8 und 7,8 liegen sollte. Bei einem pH-Wert unter 6,4 und über 8,5 waren alle Spermien gefärbt. Eine lange Verwendungsdauer der Färbelösung wurde in der Arbeit von PLÖTHNER (1954) bestätigt. In Ausstrichen mit Bullensperma von frisch hergestellten Lösungen wurde im Vergleich zu Präparaten mit 12 Monate alten, lichtgeschützt aufbewahrten Lösungen kein Einfluss durch die Lagerungszeit auf die Ergebnisse festgestellt.

### ***Eosin-Fast-Green***

MAYER et al. (1951) überprüften Fast-Green auf seine Eigenschaften als Hintergrundfarbe. Eine Mischung aus 2g Fast-Green und 0,8g Eosin-B, gelöst in 199ml Phosphatpuffer stellte sich bei Schafbock, Hengst, Bulle, Rammler und Mann als geeignet heraus. Der pH-Wert dieser Lösung lag bei 7,25. Auch ÖNCÜL (1956) erzielte mit dieser Farbstoffkombination brauchbare Ergebnisse bei Spermien des Bullen. Die verwendete Lösung setzte sich aus 0,5g Eosin und 1g Fast-Green zusammen. Ebenfalls gute Erfahrungen machte BARTMANN (1959) mit einer Färbelösung aus 5% Eosin und 10% Fast-Green. Die verwendete Menge des Fast-Greens hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis. Die angefertigten Ausstriche mit Bullensperma zeigten bei einer Aufbewahrung bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 4 Monaten hinsichtlich ihres Aussehens und der Zählergebnisse keine Veränderungen. Der Einsatz von drei verschiedenen Lösungsmitteln (Spermasol N, Natriumcitrat, Phosphatpuffer) für die Farbstoffe ergab gleichbleibende Ergebnisse.

### ***Eosin-Anilinblau***

Der Farbstoff Eosin wurde auch in Kombination mit Anilinblau durch SHAFFER und ALMQUIST (1948, zitiert nach ÖNCÜL, 1956) beim Bullen eingesetzt. Die Lösung setzte sich aus 1% Eosin (B oder Y) und 4% Anilinblau zusammen und stellte sich als geeignet heraus. Auch CASCARRETT (1953, zitiert nach HACKETT und MACPHERSON, 1965) erhielt hiermit zufriedenstellende Ergebnisse bei Spermien

von Mann und Rüde. Als Nachteil dieser Färbemethode nennt ÖNCÜL (1956) den sehr dunklen Ausstrichhintergrund durch das Anilinblau und den schwachen Farbunterschied zwischen lebenden und toten Spermien.

### ***Eosin-Nigrosin***

Nigrosin als Kontrastfarbstoff zum Eosin wurde erstmals von BLOM (1950, zitiert nach HACKETT und MACPHERSON, 1965) beim Bullen und von WILLIAMS und POLLAK (1950, zitiert nach HACKETT und MACPHERSON, 1965) beim Menschen verwendet. Zum Einsatz kam diese Kombination von Farbstoffen beim Bullen mit 5% Eosin-B und 10% Nigrosin. Durch den Einsatz von Nigrosin als Hintergrundfarbe konnte eine einheitliche Helligkeit des mikroskopischen Gesichtsfeldes erreicht werden, jedoch wurde der Kontrast zwischen lebenden und toten Spermien dadurch nicht verstärkt. Die Färbeschritte wurden zunächst nacheinander durchgeführt. Die Lösung war jahrelang haltbar, wenn die Farbstoffe getrennt aufbewahrt wurden. Auch eine morphologische Beurteilung war hiermit möglich.

HANCOCK (1951) und CAMPBELL et al. (1953) modifizierten Blom's Technik später und verwendeten Eosin-Y mit verschiedenen Verdünnungen. Hierbei wurden die Farbstoffe vorab gemischt und somit keine getrennten Färbeschritte durchgeführt. Die Anfertigung eines Ausstriches mit einer Eosin-Nigrosin-Färbung (0,67g Eosin-Y und 5g Nigrosin + 100ml H<sub>2</sub>O) beschreiben DOTT und FOSTER (1972). Wurden dagegen 10g Nigrosin verwendet, so wurde die Färbelösung Nigrosin-Eosin genannt. Sie gaben 1 Tropfen Sperma zu 8 Tropfen Färbelösung (auf 30°C erwärmt) und inkubierten diese Mischung für 5 Minuten bei 30° Celsius. Laut SWANSON und BEARDEN (1951) machte es bei Spermaproben vom Bullen keinen Unterschied, ob bei der Eosin-Nigrosin-Färbung die Färbeschritte getrennt durchgeführt wurden oder mit einer Mischung der Farbstoffe. BJÖRNDAHL et al. (2004) dagegen konnten durchaus einen Unterschied zwischen einem einstufigem und zweistufigem Färbeprotokoll beim Menschen feststellen. Der Anteil toter Spermien lag bei der zweistufigen Technik höher.

Eosin-Nigrosin wurde auch für weitere Untersuchungen bei verschiedenen Tierarten wie Eber, Bulle, Schafbock und Hengst (DOTT & FOSTER, 1975), sowie bei Vögeln (KLIMOWICZ-BODYS et al., 2012) und Rammlern (BEATTY, 1958) eingesetzt.

WALES (1959) empfahl die Eosin-Nigrosin-Färbung auch für den routinemäßigen Einsatz beim Menschen und war der Meinung, dass beim Rüden die Eosin-Nigrosin-Färbung gegenüber der Kongorot-Nigrosin-Färbung vorzuziehen sei. Ebenso stufte BAMBA (1988) diese Färbung als brauchbar für die Beurteilung von Eberspermien ein.

Bei einem Vergleich verschiedener Farbstoffkonzentrationen von Nigrosin (Eosin-Nigrosin-Lösung mit 5g Nigrosin und einer Nigrosin-Eosin-Lösung mit 10g Nigrosin) waren mehr Spermien mit der Eosin-Nigrosin-Lösung gefärbt als mit der Nigrosin-Eosin-Lösung (DOTT & FOSTER, 1972). SWANSON und BEARDEN (1951) fanden bei einem Vergleich einer 2,5%, 5% und 10%igen Lösung, dass der Prozentsatz toter Spermien beim Bullen unabhängig von der Konzentration des Nigrosins in der Farblösung ist. Mehr als 5% waren nicht notwendig um einen guten Hintergrundkontrast zu erreichen. Bei Tauben findet eine Farbmischung bestehend aus 5%-Nigrosin und 4%-Eosin-Y in einem Verhältnis von 3:1 erfolgreich Verwendung (KLIMOWICZ-BODYS et al., 2012).

Vergleiche zwischen verschiedenen Einwirkzeiten der Eosin-Nigrosin-Färbung bei Schafbock (CAMPBELL et al., 1956), Eber (BAMBA, 1988), Rüde und Mann (WALES, 1959) ergaben signifikante Unterschiede. So waren bei Mann und Rüde nach einer Färbezeit von 15 Minuten mehr Spermien angefärbt als bei einer Färbezeit von 5 Minuten. Auch beim Schafbock nahm der Anteil an gefärbten Spermien mit der Inkubationszeit von Eosin-Nigrosin zu. Eine Inkubationszeit von 5 Minuten hat sich hierbei als passend herausgestellt. Dagegen führte eine verlängerte Einwirkzeit von bis zu 10 Minuten bei den Versuchen von GEISLER (1990) zu keiner signifikanten Änderung im Anteil gefärbter Spermien (Rüde, Bulle, Hengst, Schaf- und Ziegenbock). Auch BJÖRNDAHL et al. (2003) konnten beim Menschen keine Zunahme an gefärbten Spermien mit steigender Inkubationszeit feststellen (30-300 Sekunden). Eine tabellarische Übersicht über die bisher beschriebenen Färbungen mit Eosin und Eosin-Nigrosin beim Menschen geben BJÖRNDAHL et al. (2004).

Weitere Untersuchungen zu pH-Werten und Mischverhältnissen führten SWANSON und BEARDEN (1951) durch. Sie konnten keine Abhängigkeit der Eosin-Nigrosin-Färbung vom pH-Wert bei Bullensperma feststellen. Der beste Farbkontrast ergab

sich bei einem pH-Wert von 8,7. Ebenfalls konnten Sie keinen signifikanten Unterschied bei verschiedenen Mischverhältnissen zwischen Färbelösung und Sperma finden. Um eine bestmögliche Konzentration auf dem Objektträger für die Auswertung zu erreichen, stellte sich eine Mischung von 1:10 bis 1:15 bei Frischsperma und 1:1 bis 1:2 bei verdünntem Sperma als passend heraus. Laut Autoren eignete sich insgesamt eine Farblösung aus 1% Eosin und 5% Nigrosin in 100ml 3% Natriumzitat am besten. Diese Mischung war über 1 Jahr lang ohne Kühlung stabil. Eine kühle Lagerung konnte jedoch einem Bakterienwachstum entgegen wirken.

### **2.3.1.2 Vitalfärbungen mit Bromphenolblau**

#### ***Bromphenolblau***

Die Brauchbarkeit des Bromphenolblaus wurde erstmals von BOGUTH (1951, zitiert nach RAUHAUS, 1990) bei Spermien vom Bullen (0,2g Bromphenolblau, 0,4g Natrium-Zitrat, Aqua dest.) belegt. Nennenswerte Vorteile des Bromphenolblaus waren eine leichtere Differenzierung und die geringere Toxizität im Vergleich zum Eosin. Ebenso bestätigte PLÖTHNER (1954) die Verwendbarkeit und Haltbarkeit des Bromphenolblaus bei Bullenspermien. Später wurde diese Färbetechnik von SCHERK (1963) auch bei Eberspermien angewandt. Er verwendete eine 0,1%ige Bromphenolblau-Lösung in einer 3%igen Natrium-Zitratlösung für die Färbung der spermienreichen Fraktion. Die Ausstriche wiesen eine gute Lichtdurchlässigkeit und einen sauberen Hintergrund auf. Die Konturen der Spermien waren klar abgezeichnet, gefärbte und ungefärbte Spermien waren deutlich zu unterscheiden. Dabei bezeichnete SCHERK die Phasenkontrasteinstellung als unbedingt erforderlich, da im Hellfeld die lebenden Spermien sonst nur schwer erkennbar waren. Die Haltbarkeit der Ausstriche beschränkte sich auf 1-2 Tage, danach zeigte sich der Untergrund zunehmend rissig und körnig. Dagegen war die Haltbarkeit der Farbstofflösung sehr gut.

Bei Untersuchungen von GEISLER (1990) zu verschiedenen Einwirkzeiten, fiel bei der Bromphenolblau-Färbung schon ab 2 Minuten ein drastischer Abfall an ungefärbten Spermien auf. Diese Beobachtung war bei allen untersuchten Tierarten (Bulle, Schaf- und Ziegenbock, Hengst, Eber) außer beim Rüden zu verzeichnen. Im

Gegensatz zu den Untersuchungen von SCHERK (1963) waren bei GEISLER die Ergebnisse der hergestellten Ausstriche über 6 Monate konstant. Es konnte kein Einfluss durch die Lagerung vermutet werden.

### ***Bromphenolblau-Nigrosin***

Eine weitere Zusammenstellung an Farbstoffen zur Unterscheidung von lebenden und toten Spermien entwickelte BONADONNA (1954). Er ersetzte das Eosin in der Eosin-Nigrosin-Färbung durch Bromphenolblau und testete diese Mischung ebenfalls an Bullensperma (2g Bromphenolblau, 10g Nigrosin, 100ml Aqua bidest.). Durch das Bromphenolblau konnte ein kontrastreicheres Bild erzeugt werden als mit der Eosin-Nigrosin-Färbung.

KAMAR (1959) gelang im Gegensatz zu Bonadonna 1958 der Einsatz dieser Farbmischung auch beim Geflügel. Er verwendete 0,2g Nigrosin und 0,1g Bromphenolblau in 100ml Pufferlösung zusammengesetzt aus Kaliumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat mit einem pH von 7,5. Die Auswertung war über einen langen Zeitraum konstant, wenn die Ausstriche trocken gelagert wurden. Lösungen mit einem höheren oder niedrigerem pH-Wert als 7,5 ergaben keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Bei der Überprüfung des Einflusses der Einwirkzeit auf die Anzahl gefärbter Spermien konnte ein leichter Anstieg gefärbter Spermien mit der Färbedauer von bis zu 10 Minuten beobachtet werden. Dieser Anstieg war beim Rüden schwächer ausgeprägt als beim Bullen (GEISLER, 1990). Bei einer Lagerungszeit von 6 bis 12 Monaten konnten keine Veränderungen bei der Auswertbarkeit beobachtet werden (GEISLER, 1990; RAUHAUS, 1990).

RAUHAUS (1990) beschreibt außerdem, dass auch eine Flüssigfixierung von frischen Spermaproben vom Bullen nach Hancock mit einer nachfolgenden Anfertigung der Ausstriche möglich sei. Bei einem Vergleich von frischen und fixierten Proben traten keine wesentlichen Unterschiede auf. Dies ermöglicht demnach eine räumlich und zeitlich getrennte Auswertung.

RIVEROS (1953, zitiert nach ÖNCÜL, 1956) verglich die Toxizität verschiedener Farbstoffe. Als Resultat zeigte sich, dass die Eosin-Nigrosin-Färbung nach Blom und die Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (2g B, 10% N) annähernd gleiche Ergebnisse erbrachten. Bei der Eosin-Färbung nach Boguth dagegen wurden mehr tote Spermien gezählt.

Die Studie von GEISLER (1990) ergab, dass bei einem Vergleich der Färbungen Eosin-Nigrosin, Bromphenolblau-Nigrosin und Bromphenolblau meistens keine einheitliche Tendenz zu erkennen war. Die maximale Differenz, die zwischen den Färbungen beobachtet werden konnte, betrug beim Bullen 18,3 Prozentpunkte. Dabei war der größte Anteil an gefärbten Spermien mit der Bromphenolblau-Färbung aufzufinden. Auch beim Schafbock und Ziegenbock zeigten sich große Schwankungsbreiten. Dagegen traten beim Eber, Hengst und Rüde keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Färbemethoden in einem Ejakulat auf.

### **2.3.1.3 Weitere Farbstoffe**

Des Weiteren sind in der Literatur eine 0,5% Erythrosin - 5% Nigrosin-Färbung bei Mann und Rüde (WALES, 1959) und eine 3% Kongorot - 5% Nigrosin-Färbung beim Bullen (HACKETT & MACPHERSON, 1965; WALES, 1959) beschrieben. Bei zuletzt genannter Färbung schien der Kontrast im Vergleich zur Eosin-Färbung etwas vermindert zu sein. Dafür bietet Kongorot laut BLACKSHAW (1955) den Vorteil, dass es nicht in lebende Zellen diffundiert. Auch MARTIN und EMMENS (1958, zitiert nach HACKETT und MACPHERSON, 1965) erhoben gute Ergebnisse mit der Kombination dieser beiden Farbstoffe. Im Vergleich zur Kongorot-Nigrosin-Färbung zeigte die Eosin-Nigrosin-Färbung beim Rüden weniger gefärbte Spermien. Dabei variierten die Ergebnisse der Kongorot-Nigrosin-Färbung, je nachdem ob die Probe Prostatasekret enthielt oder nicht. Die Eosin-Nigrosin-Färbung dagegen zeigte diese Abhängigkeit nicht. Bei Ejakulaten des Mannes wurden durch die Trypanblau-Färbung mehr Spermien angefärbt als vergleichsweise durch die Erythrosin-Nigrosin-Färbung. Ein Ergebnis zwischen diesen beiden Färbungen lieferte die Eosin-Nigrosin-Färbung (WALES, 1959).

Ebenfalls eine Vitalfärbung mit Kongorot erprobten MAYER et al. (1951) bei Spermien von Bulle, Schafbock, Hengst, Rammler und Mann. Sie verwendeten 0,8g Kongorot und 2g Fast-Green in 100ml Phosphatpuffer und beschrieben diese Kombination als brauchbare Methode mit vergleichbaren Ergebnissen zur Eosin-Opalblau-Färbung. Der pH-Wert dieser Lösung lag bei 7,25. Bei späteren Untersuchungen durch ENTWISTLE (1972) zu verschiedenen Farbstoffkonzentrationen bei Spermien von Bulle und Schafbock waren bei einer 3%igen Kongorot Lösung weniger Spermien angefärbt als in einer 1,5%igen Lösung. Der Farbkontrast war bei der 3%igen Lösung stärker.

Eine weitere Blaufärbung prüften SUTTIYOTIN und THWAITES (1991) an Schafbocksperma. Sie verwendeten eine Trypanblau-Lösung mit einem pH-Wert von 7,0. Mit steigender Trypanblau-Konzentration von 1-5% wurde eine sinkende Motilität festgestellt, sowie eine steigende Anzahl gefärbter Spermien. Ebenso sank die Motilität mit steigender Einwirkdauer von 5-60 Minuten und die Anzahl gefärbter Spermien stieg an. Je höherprozentig die Färbelösung war, desto schneller fiel der Anstieg an gefärbten Spermien aus. Eine Abhängigkeit zeigte sich auch von der Temperatur der Farblösung. Mit steigender Temperatur von 30°C auf 40°C färbten sich mehr Spermien an. Bei einem Vergleich der Trypanblau-Färbung mit der Eosin-Nigrosin-Färbung nach Hancock konnte jeweils ein höherer Prozentsatz toter Spermien mit der Trypanblau-Färbung als mit der Eosin-Nigrosin-Färbung festgestellt werden (Differenz 7,7%). Aufgrund dieser Erkenntnisse empfehlen die Autoren beim Schafbock eine 1%ige Lösung mit einer 1 minütigen Inkubationszeit bei 37°C einzusetzen. Vor allem für Untersucher mit einer Rotschwäche soll sich diese Färbung anbieten. VIGANO et al. (1990) fanden einen niedrigeren Prozentsatz toter Spermien mit der Trypanblau-Färbung im Vergleich zu einer Eosin-Y-Färbung.

### **2.3.2 Einsatz von Vitalfärbungen in Tiefgefriersperma**

Unter Kryokonservierung versteht man die zeitlich unbegrenzte Haltbarmachung von Spermaproben bei -196°C in flüssigem Stickstoff (GÜNZEL, 1986). Dabei kommt es zum Stillstand des Stoffwechsels. Die Samenzellen treten in den Zustand der Anabiose ein (HOFFMANN, 2003). Als wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist die langfristige Lagerung von Sperma zu nennen (PEÑA et al., 2006). Außerdem entfällt der Transport lebender Tiere. Allerdings weist Tiefgefriersperma im Vergleich zu

Frischsperma aufgrund einer verkürzten Lebensspanne eine reduzierte Befruchtungsfähigkeit auf (SULLIVAN, 2004). Die verminderte Fruchtbarkeit von Tiefgefriersperma lässt sich aber auch auf die morphologischen und biochemischen Schäden und die damit einhergehenden Veränderungen der Membranstruktur und -funktion zurückführen. Es kommt zu einer Umstrukturierung von Membranlipiden, Reduzierung der Membranfluidität, Veränderung der Membranintegrität und Zunahme der Membranpermeabilität (PARKS & GRAHAM, 1992), da insbesondere die Zellmembranen während des Einfrier- und Auftauprozesses im Temperaturbereich zwischen  $-15^{\circ}\text{C}$  bis  $-60^{\circ}\text{C}$  (MAZUR, 1985) verschiedenen Stressfaktoren (Volumenänderung, Dehydratation, intrazelluläre Eisbildung usw.) ausgesetzt sind (PARKS & GRAHAM, 1992). Es konnten große individuelle Unterschiede bezüglich der Einfriertauglichkeit beobachtet werden (EILTS, 2005; FARSTAD, 2009). Als Ursache werden genetische Unterschiede in der Zusammensetzung der Membranen diskutiert, wodurch die Wasserpermeabilität der Membran differiert (EILTS, 2005).

Die artifizielle Insemination von Tiefgefriersperma ist beim Rind schon seit den 50-iger Jahren zunehmend gängige Praxis. Mittlerweile sind die Konzeptionsraten vergleichbar oder sogar besser als im Natursprung (VISHWANATH, 2003; WATSON, 2000). Die ersten Hundewelpen wurden nach einer Besamung mit kryokonserviertem Sperma erstmals 1969 in den USA geboren (FARSTAD, 2000).

Um die Spermien vor Schäden durch den Einfrierprozess zu bewahren, kommen verschiedene Verdünner zum Einsatz. Der Verdünner erfüllt hierbei mehrere Funktionen. Einerseits hilft er die Samenprobe soweit zu verdünnen, dass die gewünschte Konzentration erreicht wird, andererseits wird er zur Ernährung und zum Schutz vor äußeren Einflüssen für die Spermien benötigt. Spermien haben keine anabolischen Kapazitäten und sind daher auf exogene Energiezufuhr in Form von Fructose und Glucose angewiesen. Für die Stabilisierung des pH-Wertes werden Puffer wie Tris, Natriumcitrat oder Natriumphosphat verwendet. Als Schutz gegen den Kälteschock werden Kryoprotektiva eingesetzt. Diese lassen sich in zellpenetrierende (Glycerin, Dimethylsulfoxid) und nicht-penetrierende Stoffe (Milchprotein, Eigelb) klassifizieren (SENGER, 2003). Um das Wachstum von Bakterien zu vermeiden werden außerdem Antibiotika zugesetzt (HOFFMANN,

2003). In der wissenschaftlichen Literatur findet sich eine große Anzahl an verschiedenen Verdünnerkompositionen, die meist aus Variationen einiger Standardrezepturen hervorgingen.

Die Hauptunterschiede in der Anfärbung von Spermaproben nach dem Auftauen im Vergleich zu Frischsamen stellen daher die verschiedenen Komponenten des jeweils verwendeten Verdünners und die schlechtere Vitalität aufgrund der Membranschäden dar. Bei Untersuchungen mit einer Eosin-Fast-Green-Färbung von MIXNER und SAROFF (1954) zu verschiedenen Glycerin-Gehalten von 2,5-12,5% in Verdünnern konnte beobachtet werden, dass bei über 4% der Anteil an toten Spermien zunahm und die Relation zur Motilitätsschätzung deutlich abnahm. Dies lässt vermuten, dass Glycerin die Permeabilität der Spermien für Farbstoffe erhöht.

DYRENDAHL (1954) berichteten über erste positive Ergebnisse bei Einsatz einer Eosin-Nigrosin-Färbung bei Tiefgefriersperma vom Bullen und auch BLACKSHAW (1955) verzeichnete Erfolge mit einer Kongorot-Nigrosin und Eosin-Nigrosin-Färbung beim Bullen und Schafbock. ULLNER (1955) konnte zwar die Eosin-Färbung nach Boguth und Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung nach Bonadonna bei Frischsperma ohne Probleme, nicht jedoch bei tiefgekühltem Sperma einsetzen. ÖNCÜL (1956) testete die Eosin-Fast-Green-Färbung bei Tiefgefriersperma, die sich beim Bullen als brauchbar herausstellte. Dagegen traten bei der Eosin- und Bromphenolblau-Färbung aufgrund des Glycerins (20%) „Tropfinseln“ mit zu stark angefärbten Stellen auf, da Glycerin die Oberflächenspannung erhöhte. Es war schwierig, die Proben gleichmäßig auszustreichen und die Färbezeit verlängerte sich durch eine verzögerte Antrocknung der Tropfinseln. Eine Differenzierung gestaltete sich dadurch ebenfalls als unsicher, weil die Spermien sich in unterschiedlichen Farbtönungen präsentierten. Daher bezeichnete ÖNCÜL diese beiden Färbungen bei Tiefgefriersperma für die routinemäßige Untersuchung als unbrauchbar. DOTT und FOSTER (1972) konnten über eine gute Anwendbarkeit der Eosin-Nigrosin-Färbung beim Bullen und Eber und ENTWISTLE (1972) über die Kongorot-Fast-Green-Färbung beim Bullen und Schafbock berichten.

Seit diesen anfänglichen Versuchen werden mehrere Vitalfärbungen zur Evaluation von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen verwendet. In einer neueren Studie von

OLIVEIRA et al. (2009) wurde ein Vergleich zwischen der Eosin-Nigrosin- und der Bromphenolblau-Färbung an Tiefgefriersperma des Ziegenbocks durchgeführt. Die Herstellung und Auswertung der Ausstriche war problemlos möglich. Es gab keine signifikanten Differenzen in der Anzahl der toten Spermien zwischen den beiden Färbungen. Die Evaluierung der Morphologie war mit beiden Färbungen sowohl bei Frisch- als auch bei Tiefgefriersperma möglich. Allerdings war die Auswertung der Ausstriche mit Bromphenolblau leichter, da ein besserer Kontrast vorlag. Außerdem wurde inzwischen die Eosin-Nigrosin-Färbung in Tiefgefrierspermaproben bei Rüde (GEISLER, 1990), Bulle (BRITO et al., 2003; GEISLER, 1990) und Hengst (MERKIES et al., 2000) eingesetzt. Eine Kombination aus dieser Färbung mit Giemsa beschreiben PINTADO et al. (2000). Zudem verwendete GEISLER (1990) die Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung bei Spermaproben des Rüden und Bullen und BRITO et al. (2003) die Trypanblau-Färbung bei Bullenspermien.

### **2.3.3 Klassifizierung der Spermien**

SWANSON und BEARDEN (1951) bemerkten erstmals bei Ihren Untersuchungen, dass einige Bullenspermien in der Eosin-Nigrosin-Färbung nur im hinteren Kopfbereich gefärbt waren und nahmen als mögliche Ursache an, dass gerade erst abgestorbene Spermien noch resistenter sind als Spermien, die schon längere Zeit tot sind. Seitdem wurden auch in anderen Studien mit verschiedenen Färbungen teilgefärbte Spermien beim Bullen (BARTMANN, 1959; GEISLER, 1990), Schafbock (CAMPBELL et al., 1956; GEISLER, 1990; SUTTIYOTIN und THWAITES, 1991), Ziegenbock (GEISLER, 1990), Eber (GEISLER, 1990), Hengst (GEISLER, 1990), Rüde (GEISLER, 1990) beobachtet. In der Literatur sind verschiedene Begründungen und Wertungen zu finden.

BOGUTH und MÜLLER (1951) klassifizierten die halbgefärbten Spermien als tot, da sie eine verzögerte Anfärbung der Kopfkappe vermuteten. BROCHART (1953, zitiert nach RAUHAUS, 1990) war der Meinung, dass dieses Phänomen mit dem Reifungsstadium der Spermien zusammenhängt. So soll die Membranpermeabilität für Eosin mit zunehmender Reifung im Nebenhoden bei Spermien von Schafbock und Bulle abnehmen. Zudem äußerte der Autor die Meinung, dass die Anwesenheit von Seminalplasma die Permeabilität bei reifen Spermien senkt.

BARTMANN (1959) konnte bei seiner Positivkontrolle beobachten, dass sich die Kopfkappe eines Spermiums langsamer anfärbt als die übrigen Bereiche und dass keine halbgefärbten Spermien auftraten, wenn bereits vorher alle Spermien tot waren. Er versetzte Sperma mit destilliertem Wasser und stellte jeweils ein Deckglaspräparat mit der Farbmischung Eosin-Fast-Green her. Erst nachdem ein Spermium keine Bewegungsaktivität mehr zeigte nahm es den Farbstoff auf. Bei verdünntem Sperma stieg der Prozentsatz halbgefärbter Spermien mit der Dauer der Aufbewahrung und sank gegen Ende der Lebensfähigkeit, wenn fast alle Spermien gefärbt waren, wieder ab. Daraus wurde die Überlegung abgeleitet, dass es sich bei den halbgefärbten Spermien um geschwächte Spermien handelt, welche als lebende Spermien zu werten sind.

Eine andere mögliche Erklärung für die teilgefärbten Spermien liefern HOLT und NORTH (1984). Die biologischen Eigenschaften der Plasmamembran differieren zwischen der akrosomalen und postakrosomalen Region am Spermienkopf. Daher scheint ein unterschiedliches Fortschreiten der Schädigung der Plasmamembran an verschiedenen Stellen natürlich zu sein und wäre eine Begründung, die halbgefärbten Spermien als Spermien mit verminderter Fertilität anzusehen (BAMBA, 1988).

Ein speziesspezifisches Auftreten in unterschiedlichem Maß von teilgefärbten Spermien beobachtete GEISLER (1990). Bei einem Vergleich verschiedener Tierarten mit den Färbungen Bromphenolblau, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin fielen bei Eber, Schaf- und Ziegenbock immer mehr halbgefärbte Spermien auf. Dabei nahm die Anzahl mit steigender Einwirkdauer ab. Bei Bulle, Hengst und Rüde dagegen war der Anteil halbgefärbter Spermien so gering, dass das Ergebnis dadurch nicht nennenswert verändert wurde.

Auch mit der Trypanblau-Färbung stellten SUTTIYOTIN und THWAITES (1991) das Vorkommen von halbgefärbten Spermien beim Schafbock fest. Diese waren jedoch unabhängig von der Inkubationszeit und beeinflussten die Ergebnisse nicht signifikant. Je höher der Prozentsatz toter Spermien war, desto niedriger fiel die Anzahl halbgefärbter Spermien aus. Bei einem Vergleich mit der Eosin-Nigrosin-Färbung nach Hancock war der Anteil halbgefärbter Spermien ungefähr gleich.

### 2.3.4 Nachfärbungen von Spermien

Unter Nachfärbung ist die zusätzliche Anfärbung von zunächst ungefärbten Spermien mit der Lagerungszeit der angefertigten Ausstriche zu verstehen, sodass der Prozentsatz toter Spermien zunehmend ansteigt bis schließlich keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Spermien mehr möglich ist.

Bei BOGUTH und MÜLLER (1951) traten mit der Eosin-Y-Färbung bereits nach 2 Tagen Nachfärbungen auf. Auch bei Versuchen von ÖNCÜL (1956) mit Tiefgefriersperma des Bullen stellte sich die Haltbarkeit der Ausstriche mit der Eosin- und Bromphenolblau-Färbung als sehr kurz heraus. Schon 10 Minuten nach der Anfertigung konnten mehr gefärbte Spermien gezählt werden. Mit der Eosin-Fast-Green-Färbung traten zumindest über 180 Minuten nach der Anfertigung keine Nachfärbungen auf. Das Phänomen der Nachfärbung beobachteten ebenfalls BUTTLE et al. (1965) nach einer Woche an Eosin-Nigrosin-Ausstrichen (Tiefgefriersperma des Bullen mit Eigelb und Glycerin). Auch SCHERK (1963) fand heraus, dass mit der Bromphenolblau-Färbung beim Eber eine Auswertung nur innerhalb 1-2 Tage nach der Anfertigung der Ausstriche möglich war. Mit der Eosin-Opalblau-Färbung bestand dieses Problem jedoch nicht. Ebenso stellte BARTMANN (1959) mit der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung beim Bullen keine Veränderungen mit der Zeit fest. GEISLER (1990) konnte bei verschiedenen Tierarten (Bulle, Schaf- und Ziegenbock, Hengst, Eber, Rüde) keinen Einfluss der Lagerungszeit auf den Anteil gefärbter Spermien mit der Bromphenolblau-, Eosin-Nigrosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung über einen Zeitraum von 6 Monaten finden.

### 2.3.5 Reproduzierbarkeit der Beurteilung und Einfluss des Untersuchers

Mit der Fragestellung, wie viele Ausstriche angefertigt und wie viele Spermien ausgezählt werden müssen, um mit ausreichender Sicherheit ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten, befassten sich schon CAMPBELL, HANCOCK und ROTHSCHILD (1953). Hierfür verwendeten sie eine Eosin-Nigrosin-Färbung.

GEISLER (1990) überprüfte in Ihrer Studie mit verschiedenen Tierarten die Reproduzierbarkeit bei wiederholter Auswertung desselben Ausstriches. Dabei konnten nach 10maliger Auswertung derselben Eosin-Nigrosin-, Bromphenolblau-

Nigrosin- und Bromphenolblau-Ausstriche durch dieselbe Person nur geringe Abweichungen ermittelt werden. Die Variationskoeffizienten dieser drei Färbungen lagen mit unter 7% nahe zusammen. In Einzelfällen kam es bei Proben mit einem Anteil gefärbter Spermien von über 50% zu höheren Variationskoeffizienten von bis zu 28%. Vor allem Proben vom Schaf- und Ziegenbock waren mit der Bromphenolblau-Färbung davon betroffen. Ebenso gibt es Untersuchungen zu dieser Fragestellung mit der Eosin-Nigrosin-Färbung von BUTTLE et al. (1965), FOSTER et al. (2011) und CAMPBELL et al (1956).

Die Ergebnisse bei der Auswertung mehrerer Ausstriche einer Probe mit Spermaproben des Schafbocks (LASLEY et al., 1942), Rüden (WALES, 1959), Ebers (SCHERK, 1963) und Mannes (WALES, 1959) deuten auf eine gute Reproduzierbarkeit bei der Eosin-Opalblau- (LASLEY et al., 1942), Trypanblau- (WALES, 1959), Eosin-Nigrosin- (WALES, 1959), Erythrosin-Nigrosin- (WALES, 1959) und Bromphenolblau-Färbung (SCHERK, 1963) hin. Wurden die Ergebnisse von zehn verschiedenen Präparaten derselben Probe von Bulle, Schaf- und Ziegenbock, Hengst, Eber und Rüde verglichen (GEISLER, 1990) zeigten sich größere Variationskoeffizienten als bei der wiederholten Zählung desselben Präparates. Auch zwischen den einzelnen Ejakulaten innerhalb einer Tierart traten große Unterschiede auf. Die Bromphenolblau-Färbung schnitt dabei schlechter ab als die Bromphenolblau-Nigrosin- oder Eosin-Nigrosin-Färbung. Beim Rüden konnte ein maximaler Variationskoeffizient von 22,3% ermittelt werden.

### **2.3.6 Vitalfärbungen im Vergleich zu anderen Parametern**

#### ***Vitalfärbungen im Vergleich zur Motilität***

LASLEY (1951) untersuchte den Zusammenhang zwischen Motilität und Konzeptionsrate bei 78 Ejakulaten vom Bullen und verglich dabei auch die Ergebnisse der Motilitätsschätzung mit denen einer Eosin-Opalblau-Färbung. Zur Bestimmung der Motilität verwendete er die Methode nach Brady und Gildow (1939). Es zeigte sich, dass immer mehr lebende als motile Spermien vorhanden waren. Jedoch waren diese Ergebnisse signifikant korreliert. Ebenfalls ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen Konzeptionsrate und Prozentsatz motiler Spermien. Bei einer Motilitätssteigerung von 10% stieg die Fertilität um 4,6%.

Die ermittelte Differenz zwischen den Ergebnissen einer Vitalfärbung mit denen einer Motilitätsschätzung betrug in Untersuchungen an Bullensperma mit einer Eosin-, Bromphenolblau- und Erythrosin-Färbungen im Durchschnitt 8,5%. Nur bei 23% der Proben lag die Differenz bei unter 3% und bei 63% zwischen 4-12%. Trotz dieser Abweichungen ließ sich aber ein weitgehender Zusammenhang erkennen. Dabei schnitt Eosin am besten ab, gefolgt von Bromphenolblau und zuletzt Erythrosin (PLÖTHNER, 1954).

Auch ÖNCÜL (1956) verglich seine Zählergebnisse der Ausstriche mit denen der Motilitätsschätzung. Dabei betrug der höchste abweichende Prozentsatz bei der Eosin- und Bromphenolblau-Färbung +6% bis -7%. Bei der Eosin-Fast-Green-Färbung war der Unterschied kleiner. Außerordentlich größere Unterschiede zeigten sich dagegen bei Tiefgefriersperma mit Abweichungen von +17% bis -15%. Diese Tatsache führte ÖNCÜL auf die Schwierigkeit der Schätzung auch für den geübten Untersucher zurück.

Als Begründung für den häufig höheren Prozentsatz an lebenden als an motilen Spermien gibt BARTMANN (1959) an, dass die Bewegungsaktivität durch die Lebensfähigkeit der Spermien überdauert wird. Auch FOSTER (2009) konnte nach ihren Versuchen an Hengstsperma bestätigen, dass mit der Zeit die Motilität schneller abnimmt als der Prozentsatz lebender Spermien mit der Vitalfärbung. Zu einer ähnlichen Erkenntnis kam SCHERK (1963) bei der Bromphenolblau-Färbung mit Ebersperma.

Gegenteilige Ergebnisse dazu erhielt LICHTENSTERN (1995). Er verglich seine Motilitätsschätzung mit den Ergebnissen einer Bromphenolblau-Färbung bei Proben von Bulle, Schafbock und Eber. Dabei war der Prozentsatz ungefärbter Spermien um 5 – 10% niedriger als die Schätzung motiler Spermien.

### ***Vitalfärbungen im Vergleich zur Morphologie***

Eine kombinierte Auswertung aus Färbezustand und Morphologie einer Eosin-Färbung führte PLÖTHNER (1954) durch. Alle Bullenspermien mit Kopfkappenveränderungen färbten sich rot an. Spermien mit Kopfveränderungen waren in der Mehrzahl gefärbt, jene mit Halsveränderungen (v.a. Halsbrüche) durchschnittlich zu 70%. Spermien mit Mittelstückveränderungen waren zur Mehrzahl

ungefärbt, jene mit Schwanzveränderungen zur Hälfte gefärbt. Bei Vorliegen von persistierenden Zytoplasmatröpfchen waren weniger als 5% der Spermien gefärbt.

### ***Vitalfärbungen im Vergleich zum HOS-Test***

Bei Untersuchungen zum hypoosmolaren Schwelltest im Vergleich zur Eosin-Färbung konnte mit Rüdensperma (KUMI-DIAKA & BADTRAM, 1994) und humanem Sperma (JEYENDRAN et al., 1984) keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Ein Vergleich beim Eber zeigte ebenfalls, dass die Ergebnisse des HOS-Tests signifikant niedriger (25%) waren als die der Eosin-Färbung (VAZQUEZ et al., 1997). Als Begründung führen die Autoren an, dass mit Vitalfärbungen die toten Spermien mit einer geschädigten Membran identifiziert werden, mit dem HOS-Test dagegen Spermien, die eine intakte, aber nicht funktionale Membran aufweisen. Daher könnte die Differenz zwischen den Untersuchungsmethoden eine subvitale Spermienpopulation klassifizieren. Andererseits könnte das Auseinanderweichen der Ergebnisse auch daher resultieren, dass der HOS-Test die Membran des Spermischwanzes, die Vitalfärbung dagegen die Membran des Spermienkopfes evaluiert (VAZQUEZ et al., 1997). In einer weiteren Studie von BRITO et al. (2003) waren mit der Eosin-Nigrosin- und Trypanblau-Färbung mehr lebende Spermien zu eruieren als mit dem HOS-Test.

## 2.4 Der NucleoCounter SP-100<sup>®</sup>

Der NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) besitzt ein integriertes Fluoreszenzmikroskop und ermöglicht die Messung der Spermienkonzentrationen und die Bestimmung der Anzahl an toten Spermien in einer Spermaprobe. Die Größe des Gerätes liegt bei 38 x 26 x 22 cm (W x H x D) und das Gewicht bei 3kg. Als DNA-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff kommt Propidiumiodid zum Einsatz, welcher nach Laseranregung rot (~600nm) fluoresziert (GRAHAM & MOCE, 2005). Propidiumiodid wird oft genutzt, um die Membranintegrität von Spermien zu beurteilen. Aufgrund seiner Molekülgröße ist Propidiumiodid impermeabel für intakte Membranen und kann nur beschädigte Membranen passieren (GARNER et al., 1986; HARRISON & VICKERS, 1990). Nach der Penetration interagiert Propidiumiodid mit der zellulären DNA und färbt somit den Zellkern an. Die nach Anregung mit ~540nm (Grünlicht) emittierte Lichtmenge wird von dem Fluoreszenzmikroskop erfasst und mit einer internen Kamera und Bildanalyse verarbeitet.

### 2.4.1 Bedienung und Einsatzbereich

Zur Bestimmung der Spermienkonzentration wird die Samenprobe mit einem Lysispuffer gemischt, um freie Zellkerne zu erhalten. Diese Mischung wird gut geschwenkt und 60µl in die NucleoCassette geladen, die wiederum intern mit Propidiumiodid ausgekleidet ist. Es werden etwa 1500 Zellen je Messung ausgewertet (JOHANSSON et al., 2008). Die Dauer des Messvorgangs beträgt etwa 30 Sekunden. Der NucleoCounter<sup>®</sup> zählt die in der Messkammer vorhandenen rot emittierenden Spermienköpfe in ca. 1µl Volumen und berechnet anschließend die Konzentration, welche im Display als Anzahl pro Milliliter angezeigt wird.

Zur Bestimmung der Anzahl an toten Spermien pro Milliliter wird die Probe mit PBS statt Lysispuffer verdünnt, sodass nur die Zellen mit einer beschädigten Membran durch Propidiumiodid angefärbt werden können. Der weitere Vorgang ist identisch zur Messung der Spermienkonzentration. Die Messdauer beträgt ca. 80 Sekunden. Aus den Ergebnissen kann der Prozentsatz an toten Spermien berechnet werden.

Die Hauptvorteile liegen in der Analyse von mehr als tausend Spermien in kürzester Zeit, der Objektivität und dem geringen Einfluss von Probenfehlern. Die Durchführung der Messvorgänge ist unkompliziert (ANZAR et al., 2009). Eine Kalibrierung für verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Größen und Morphologien ist nicht notwendig. Der NucleoCounter<sup>®</sup> ist sehr handlich für den Transport und im Vergleich zu anderen Geräten relativ kostengünstig zu erwerben. Die laufenden Kosten pro Messung belaufen sich auf ca. 2 Euro für die verwendete Kassette (MORRELL et al., 2010).

Der NucleoCounter<sup>®</sup> wurde bereits an Spermien mehrerer Tierarten getestet und bei Bulle (ANZAR et al., 2009), Hengst (COMERFORD, 2009; FOSTER et al., 2011; MORRELL et al., 2010) und Eber (CAMUS et al., 2011; HANSEN et al., 2006), sowie bei Fischen (NYNCA und CIERESZKO, 2009) und beim Mann (EGEBERG et al., 2013) als brauchbare Methode erachtet.

#### **2.4.2 Reproduzierbarkeit der Messungen**

Bis dato konnte eine gute Reproduzierbarkeit der Messungen für die Bestimmung der Spermienkonzentration von Ejakulaten des Bullen (ANZAR et al., 2009) und des Ebers (CAMUS et al., 2011; HANSEN et al., 2006) nachgewiesen werden. HANSEN et al. (2006) ermittelten einen Variationskoeffizient von 3,1%. CAMUS et al. (2011) erhielten einen mittleren Unterschied zwischen zwei Messungen von  $8 \times 10^6$  Spermien/ml. Eine intra- oder intermaschinelle Variation konnte nicht festgestellt werden (ANZAR et al., 2009). Auch die Reproduzierbarkeit bei Verwendung von Hengstsperma wurde bereits in mehreren Studien untersucht. FOSTER (2009) gibt einen Variationskoeffizient für die Konzentration von 4,89% mit Frischsperma an. COMERFORD (2009) verwendete Nebenhodenspermien des Hengstes für die Konzentrationsmessungen. Es wurden Messungen mit NaCl- und Seminalplasma-Verdünnungen angestellt, die einen Variationskoeffizient von 1,46% bzw. von 2,78% ergaben. MORRELL et al. (2010) geben für wiederholte Messungen für Frischsperma des Hengstes folgende Mittelwerte mit Standardabweichung getrennt für geringe und hohe Spermienkonzentrationen bzw. Anteile an toten Spermien an (Hohe Konzentration:  $195 \pm 15 \times 10^6$ /ml, niedrige Konzentration:  $75 \pm 4 \times 10^6$ /ml; Hoher Anteil toter Spermien:  $73,2 \pm 3,2\%$ , niedriger Anteil toter Spermien:  $25,2 \pm$

4,8%). Für wiederholte Messungen der Spermienkonzentration und des Anteils toter Spermien in Zellkulturen konnten SHAH et al. (2006) eine Genauigkeit von 98% vorweisen.

Durch Einsatz eines Vortexers vor dem Laden der Kassette konnte COMERFORD (2009) den Variationskoeffizienten im Vergleich zu einer von Hand geschwenkten Probe verringern. Auch der Genauigkeit der Dosierung des von Chemometec mitgelieferten Dispensers für den SP-100 Lysispuffer widmete COMERFORD (2009) Ihre Aufmerksamkeit. Es konnten keine Differenzen bei der Dosierung von 2 und 5 Millilitern gemessen werden, bei 1, 4, 10 und 20 Millilitern dagegen schon.

### **2.4.3 Vergleich des NucleoCounters<sup>®</sup> mit anderen Methoden zur Bestimmung der Spermienkonzentration**

MORRELL et al. (2010) konnten bei Ihren Versuchen mit Hengstsperma zeigen, dass der NucleoCounter<sup>®</sup> bei Messung der Spermienkonzentration eine Korrelation zur Bürker-Zählkammer aufweist. Zudem ließ sich eine signifikante Korrelation bei der Beurteilung des Membranzustandes der Spermien zwischen NucleoCounter<sup>®</sup> und Flowzytometer erkennen. Häufig waren die Ergebnisse des NucleoCounters<sup>®</sup> niedriger als die des Flowzytometers. Von COMERFORD (2009) wurden ebenfalls Vergleiche zu Konzentrationsmessungen bei Hengstsperma angestellt. Dabei zeigte der NucleoCounter<sup>®</sup> eine größere Übereinstimmung zum Flowzytometer und zur Zählkammer als zu photometrischen Systemen wie dem Densimeter oder Spermacue. Auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war der NucleoCounter<sup>®</sup> besser als die Photometer. In Abhängigkeit von dem Verdünnungsmedium zeigte der NucleoCounter<sup>®</sup> eine bessere Übereinstimmung zum Flowzytometer bei Verwendung von NaCl als von Seminalplasma. Eine Überschätzung der Konzentration um 15,7% durch den NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zum Flowzytometer wurde beim Einsatz von verschiedenen Verdünnern festgestellt. Im Vergleich zur Zählkammer waren es nur 7,5%.

Eine sehr gute Korrelation zwischen dem Flowzytometer und dem NucleoCounter<sup>®</sup> konnte auch bei Spermaproben des Ebers festgestellt werden. Die Differenz zwischen den Geräten war dabei von der vorliegenden Spermienkonzentration

abhängig. Die größten Abweichungen traten bei verdünnten Samenproben auf (HANSEN et al., 2006).

In einer weiteren Studie von ANZAR et al. (2009) mit Spermaproben des Bullen waren die Ergebnisse von Zählkammer, Flowzytometer und NucleoCounter<sup>®</sup> signifikant korreliert, jedoch die Ergebnisse der Zählkammer niedriger als bei den beiden anderen Methoden. Die Konzentrationsbestimmung von Tiefgefriersperma ergab eine signifikante Beziehung zwischen Zählkammer und NucleoCounter<sup>®</sup>. Bei Messung der Anzahl toter Spermien von Tiefgefriersperma war eine signifikante Beziehung zwischen Flowzytometer und NucleoCounter<sup>®</sup> ersichtlich. Aufgrund dieser Ergebnisse können die beiden Methoden zur Bestimmung der Konzentration und Anzahl toter Spermien bei Sperma von Haussäugetieren und Menschen laut Autor als gleichwertig angesehen werden. Im Vergleich bietet der NucleoCounter<sup>®</sup> den Vorteil, dass er günstiger und benutzerfreundlicher zu bedienen ist. Als Regressionskoeffizient, das heißt die minimale Änderung der Spermienanzahl, die das Gerät erfassen kann, gibt der Autor 1,15 Mio Spermien/ml an.

Bei einem Vergleich des NucleoCounters<sup>®</sup> mit dem Flowzytometer bei tierischen Zellkulturen konnten SHAH et al. (2006) nachweisen, dass der Standardfehler sowohl bei der Bestimmung der Dichte als auch der Vitalität beim NucleoCounter<sup>®</sup> signifikant niedriger war als beim Flowzytometer. Dies spricht für eine niedrigere Untersucherabhängigkeit, eine bessere Reproduzierbarkeit und eine größere Objektivität beim NucleoCounter<sup>®</sup>.

In einer Studie mit Spermien der Bachforelle wurde der NucleoCounter<sup>®</sup> einem Photometer gegenüber gestellt. Das Ergebnis ergab eine signifikante Regression zwischen den beiden Methoden. Die Differenzen waren nicht signifikant (NYNCA und CIRESZKO, 2009).

EGEBERG et al. (2013) verglichen die Ergebnisse der Konzentrationsmessungen von NucleoCounter<sup>®</sup> und Bürker-Türk-Zählkammer bei Ejakulaten des Mannes und konnten eine gute Übereinstimmung feststellen.

#### 2.4.4 Vergleich von Vitalfärbungen mit Fluoreszenzfärbungen

Fluoreszenzfärbungen zur Bestimmung der Membranintegrität wurden bereits bei mehreren Spezies angewendet (CHRISTENSEN et al., 2004; GARNER & JOHNSON, 1995; A. I. PEÑA et al., 1998). Einige Studien deuten an, dass die Vitalfärbungen den Anteil an Spermien mit geschädigter Membran im Vergleich zu Propidiumiodid alleine oder in Kombination mit anderen Fluoreszenzfärbungen unterschätzen (BRITO et al., 2003; CHALAH & BRILLARD, 1998; JOHANSSON et al., 2008; MERKIES et al., 2000; PINTADO et al., 2000; TAMULI & WATSON, 1994).

MERKIES et al. (2000) untersuchten sowohl Frisch- als auch Tiefgefriersperma des Hengstes mit dem Flowzytometer und der Eosin-Nigrosin-Färbung. Sie erhielten Ergebnisse mit signifikanter Korrelation bei Frischsperma. Dagegen traten größere Variationen bei Tiefgefriersperma auf. Die Eosin-Nigrosin-Färbung ergab vergleichsweise mehr lebende Spermien als der Flowzytometer. Ein Grund dafür könnte Glycerin darstellen, aber auch die Anwesenheit von Milchpartikeln des Extenders kann die Auswertung der Spermien erschweren.

PINTADO et al. (2000) führten einen Vergleich zwischen Propidiumiodid und Eosin-Nigrosin (0,7g Eosin-Y, 10g Nigrosin, Färbezeit 30 Sekunden) in Kombination mit Giemsa (TAMULI & WATSON, 1994) bei Frischsperma des Ebers und Tiefgefriersperma des Bullen durch. Die halbgefärbten Spermien wurden zu dem Anteil toter Spermien gerechnet und es wurden 200 Spermien mit einem Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskop ausgewertet. Der Prozentsatz toter Spermien war mit Propidiumiodid höher als mit der Eosin-Nigrosin-Färbung. Die Differenz war umso größer, je höher der Prozentsatz an toten Spermien in der Probe war.

In einer weiteren Studie von BRITO et al. (2003) mit Bullenspermien konnte eine hohe Korrelation zwischen der Eosin-Nigrosin- bzw. Trypanblau-Färbung und Propidiumiodid-basierenden Fluoreszenzfärbungen (CFDA/PI und SYBR/PI) festgestellt werden. Dabei war der Anteil an membranintakten Spermien mit den beiden Vitalfärbungen größer als mit den Fluoreszenzfärbungen. Als mögliche Ursache führen die Autoren an, dass die Färbezeit bei den Vitalfärbungen nur bei wenigen Sekunden liegt, bei den Fluoreszenzfärbungen mit Propidiumiodid dagegen bei 10-30 Minuten.

KLIMOWICZ-BODYS et al. (2012) führten einen Methodenvergleich zwischen Flowzytometer (SYBR-14/PI) und Eosin-Nigrosin-Färbung (Phasen-Kontrast-Einstellung) bei Spermien der Taube durch. Zum Zeitpunkt 0 waren die Ergebnisse vergleichbar. Nach einer Lagerung von 6-24 Stunden wichen dagegen die Ergebnisse auseinander und ein niedrigerer Prozentsatz lebender Spermien wurde durch den Flowzytometer im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung festgestellt. Ebenfalls einen Versuch mit Spermien des Geflügels stellten CHALAH und BRILLARD (1998) an. Sie verglichen ebenfalls die Fluoreszenzfärbung SYBR-14/PI mit der Eosin-Nigrosin-Färbung. Die Fluoreszenzfärbung wurde dabei mit einem Spectrophotometer ausgewertet. Bei Frisch- und Tiefgefriersperma wurden keine signifikanten Differenzen evaluiert. Wurde die Tiefgefrierprobe dagegen erst 4 Stunden nach dem Auftauen untersucht, so wurden mit der Fluoreszenzfärbung signifikant mehr tote Spermien festgestellt als mit der Eosin-Nigrosin-Färbung.

Dagegen beschreiben GRAHAM et al. (1990) in Ihrer Veröffentlichung, dass Sie zwischen der Propidiumiodid-Färbung mittels Flowzytometer und Eosin-Nigrosin-Färbung mit Spermproben des Bullen äquivalente Ergebnisse bei der Vitalitätsbestimmung erhalten haben. Die halbgefärbten Spermien wurden hier zu dem Prozentsatz toter Spermien gewertet.

Die einzigen Studien, die für die Vitalitätsbestimmung den NucleoCounter<sup>®</sup> direkt mit einer Vitalfärbung (Eosin-Nigrosin) verglichen haben, stammen bis dato von JOHANSSON et al. (2008) und FOSTER et al. (2011). Bei Versuchen zur Vitalität bei Hengstsperma durch JOHANSSON et al. (2008) zeigte sich, dass der Prozentsatz toter Spermien bei der Eosin-Nigrosin-Färbung in 97,1% der Fälle niedriger war als beim NucleoCounter<sup>®</sup>. Die mittlere Abweichung lag bei 12,5%. Als mögliche Begründung führen die Autoren die Subjektivität bei den Vitalfärbungen an. Ebenso war der Unterschied zwischen gefärbten und ungefärbten Spermien sehr dezent, so dass die Klassifizierung deutlich erschwert wurde. Einen ähnlichen Versuchsansatz wie diesen führten FOSTER et al. (2011) mit Hengstsperma durch und verglichen den Flowzytometer mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> und der Eosin-Nigrosin-Färbung. Dabei lag der Mittelwert der Eosin-Nigrosin-Färbung um 2% höher als der des Flowzytometers und der des Flowzytometers wiederum 6% höher als der des NucleoCounters<sup>®</sup>. Außerdem zeigte sich eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der

Vitalität. Daher wurden für den besseren Vergleich 3 Untergruppen gebildet mit <20%, 21-50% und > 50% an toten Spermien. So konnte beobachtet werden, dass mit steigendem Anteil an toten Spermien in der Probe, die Übereinstimmungen der Methoden auseinander wichen. Dies war beim Flowzytometer und bei der Eosin-Nigrosin-Färbung bei mehr als 20% an toten Spermien der Fall und beim Flowzytometer und NucleoCounter<sup>®</sup>, wenn mehr als 70% an toten Spermien in der Probe vorhanden waren. Die Eosin-Nigrosin-Färbung ergab weniger tote Spermien als der Flowzytometer, wohingegen der NucleoCounter<sup>®</sup> mehr tote Spermien als der Flowzytometer maß. Als mögliche Ursache für den höheren Prozentsatz an toten Spermien beim Flowzytometer als bei der Eosin-Nigrosin-Färbung geben die Autoren an, dass die Permeabilität nicht ein „Alles-oder-Nichts-Event“, sondern ein Prozess über eine gewisse Zeitspanne ist. Daher könne es sein, dass der Flowzytometer mit seiner Doppelfärbung (SYBR-14/PI) Spermien in einer Membranzustandsübergangsphase erkennt und der NucleoCounter<sup>®</sup> diese Spermien jedoch bereits dem Anteil toter Spermien zuordnet. Zudem hat der NucleoCounter<sup>®</sup> einen gewissen „treshhold level“ für Fluoreszenz um Membranschäden zu identifizieren. Als Schlussfolgerung kann der NucleoCounter<sup>®</sup> beim Hengst problemlos eingesetzt werden, solange der Anteil lebender Spermien in der Probe über 30% liegt. Die Eosin-Nigrosin-Färbung dagegen gab nur verlässliche Ergebnisse bei qualitativ gutem Sperma mit einer Vitalität von über 80%, da sie sonst bei schlechteren Proben ein falschpositives Ergebnis angibt.

## 3 Material und Methoden

In der Zeit vom 01.03.2012 bis 31.03.2014 wurden Untersuchungen an zwei Tierarten (Rind, Hund) und jeweils zwei Spermaarten (Frischsperma und Tiefgefriersperma) durchgeführt.

Somit ergeben sich 4 untersuchte Gruppen:

- 1: Rüde Frischsperma (HRF)
- 2: Rüde Tiefgefriersperma (HRT)
- 3: Bulle Frischsperma (RBF)
- 4: Bulle Tiefgefriersperma (RBT)

Innerhalb jeder Gruppe wurden jeweils 40 Ejakulate für die eigenen Untersuchungen herangezogen. In der Durchführung des Versuches und Auswertung der Proben waren drei Untersucher involviert.

- Untersucher 1 (U1)
- Untersucher 2 (U2)
- Untersucher 3 (U3)

### 3.1 Untersuchte Tiere und Probengewinnung

#### 3.1.1 Frischsperma

##### ***3.1.1.1 Probanden und Spermagewinnung beim Rüden***

Die für die Untersuchungen verwendeten 40 Rüdenejakulate stammten von Patienten der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München und wurden mittels manueller Stimulation des Bulbus glandis des Penis im Beisein einer läufigen Hündin über einen Zeitraum vom 21.12.2011 bis 21.10.2013 gewonnen. Die erste, zweite und dritte Fraktion wurden mittels steriler Auffangtrichter (Samenauffangtrichter zum Einmalgebrauch, Minitüb GmbH, Tiefenbach) jeweils getrennt aufgefangen.

Bei den Rüden handelte es sich um 30 geschlechtsreife Tiere 23 verschiedener Rassen (2 große Schweizer Sennenhunde, 2 Chesapeake Bay Retriever, 1 Labrador Retriever, 2 Rottweiler, 2 Australian Shepherds, 1 Mops, 1 Deutsch Langhaar, 1 Mischling, 1 Rhodesian Ridgeback, 3 Neufundländer, 1 Malinois, 2 kleine Münsterländer, 1 Border Collie, 2 Golden Retriever, 1 Saluki, 1 Havaneser, 2 Deutsche Schäferhunde, 1 Berger des Pyrenees, 1 Beagle, 1 Tervueren, 1 Wolfshund). Das Alter der Patienten lag im Mittel bei  $4,7 \pm 2,4$  Jahren (Min 0,8, Max 10,8). Zwanzig Rüden wurden einmalig zur Spermagewinnung verwendet und von 10 Rüden wurden zwei Ejakulate gewonnen. Alle Rüden waren zum Zeitpunkt der Gewinnung klinisch gesund und zeigten eine gute Libido. Das äußere Genitale war jeweils ohne besonderen Befund.

Für die weiteren Untersuchungen wurde nur die spermienreiche Fraktion verwendet.

### **3.1.1.2 Probanden und Spermagewinnung beim Bullen**

Die 40 Bullen-Ejakulate wurden von Mitarbeitern der Besamungsstation Grub (Bayern-Genetik GmbH) mittels auf  $42^{\circ}\text{C}$  vorgewärmter, künstlicher Scheide im Zeitraum vom 07.02.2012 bis 26.02.2013 gewonnen. Das Sperma wurde in Einweg-Kunststoffröhrchen (Cellstar Tubes 15ml, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) aufgefangen, welche an der künstlichen Scheide befestigt waren. Als Deckpartner dienten gleichgeschlechtliche Tiere, welche im Deckstand fixiert waren.

Es kamen 20 verschiedene Bullen der Rassen Fleckvieh ( $n=16$ ) und Angus ( $n=4$ ) zum Einsatz. Von 7 Bullen wurde ein Ejakulat verwendet. Von 8 Bullen wurden zwei Ejakulate, von 3 Bullen drei Ejakulate und von 2 Bullen vier Ejakulate von verschiedenen Sprungtagen für die Untersuchungen eingesetzt. Das Allgemeinbefinden und die Sexualfunktion aller Tiere waren ungestört.

Direkt anschließend an die Gewinnung wurde das Auffangröhrchen gekennzeichnet und vom Samenentnahmetechniker per Durchreiche ins Spermalabor gebracht. Dort wurden  $100\mu\text{l}$  Sperma für die eigenen Untersuchungen separiert bevor es im Routinebetrieb der Besamungsstation weiterverarbeitet wurde.

### **3.1.2 Tiefgefriersperma**

#### **3.1.2.1 Gewinnung von Tiefgefriersperma beim Rüden**

Alle 40 Tiefgefrier-Proben wurden in der Chirurgischen und Gynäkologischen Kleintierklinik der LMU München nach Zusatz eines Verdünners (CaniPlus Freeze, TG-Medium für Hundesamen, 30ml, Minitüb, Tiefenbach) in 0,5ml Pailletten (EcoPaillett 0,5ml, Minitüb GmbH, Tiefenbach) im Zeitraum zwischen dem 28.12.2012 und 31.01.2014 kryokonserviert und in Containern mit flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Bei den Rüden handelte es sich um 28 geschlechtsreife Tiere 21 verschiedener Rassen (1 großer Schweizer Sennenhund, 4 Rottweiler, 1 Australian Shepherd, 2 Rhodesian Ridgebacks, 1 Neufundländer, 1 Tervueren, 2 Golden Retriever, 1 Saluki, 1 Havaneser, 1 Berger de Picardie, 2 Beagle, 1 Wolfshund, 1 Irischer Wolfshund, 1 Mischling, 2 Beauceron, 1 Greyhound, 1 Bernhardiner, 1 Sibirischer Husky, 1 Malinois, 1 Deutscher Pinscher, 1 Boxer). Sechzehn Rüden wurden einmalig abgesamt und von 12 Rüden wurden jeweils zwei Ejakulate gewonnen. Alle Rüden waren zum Zeitpunkt der Gewinnung klinisch gesund und zeigten eine gute Libido. Das äußere Genitale war ohne Besonderheiten.

Nach unterschiedlich langer Lagerungsdauer wurde zur Qualitätskontrolle jeweils eine Paillette in einem Wärmebad (Cito Auftaegerät, 37°C, Minitüb, Tiefenbach) bei 37°C für eine Minute aufgetaut. Vor dem Abfüllen in ein 1,5ml Reaktionsgefäße (Safe Seal Gefäß, weiß, Sarstedt, Nümbrecht) wurden die Pailletten sorgfältig mit einem Zellstofftuch abgetrocknet. Die eigenen Untersuchungen wurden anschließend ohne Zusatz eines Auftaumediums durchgeführt.

#### **3.1.2.2 Gewinnung von Tiefgefriersperma beim Bullen**

Als Tiefgefrier-Proben dienten 0,25ml Pailletten, welche von den Besamungsstationen Grub (n=22) und Neustadt Aisch (n=18) zwischen 1996 und 2001 hergestellt wurden. Als Verdünner wurde Triladyl verwendet. Es kamen 21 verschiedene Bullen der Rassen Fleckvieh (n=16), Holstein (n=3) und Braunvieh (n=2) zum Einsatz. Von 3 Bullen wurde nur eine Paillette verwendet. Von 17 Bullen

wurden jeweils zwei Pailletten und von einem Bullen drei Pailletten von unterschiedlichen Sprungtagen eingesetzt. Diese wurden in einem Wärmebad (Cito Auftaegerät, 37°C, Minitüb, Tiefenbach) bei 37°C für 20 Sekunden aufgetaut.

## **3.2 Verarbeitung der Spermaproben**

Direkt im Anschluss an die Spermagewinnung bzw. nach dem Auftauen der Proben erfolgten die NucleoCounter<sup>®</sup>-Messungen (Dichte und Vitalität) und die Anfertigung der Färbeausstriche.

### **3.2.1 Messungen mit dem NucleoCounter<sup>®</sup>**

Alle Proben wurden 1:100 verdünnt. Nur im Falle von vier Frischsamenproben beim Bullen war es aufgrund der hohen Spermienkonzentration (jeweils über 1800 Mill. Spermien/ml) notwendig eine Messung mit einer Verdünnung von 1:200 durchzuführen. Bei Proben der Gruppen „Rüde Frischsperma“, „Rüde Tiefgefriersperma“ und „Bulle Tiefgefriersperma“ wurde der NucleoCounter<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) immer durch Untersucher 3 bedient, bei Proben der Gruppe „Bulle Frischsperma“ hingegen durch Untersucher 1 oder 2. Alle Untersucher führten die Messungen gemäß den Angaben des Herstellers durch. Die Messkassetten (SP1-Cassette, Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) wurden verschlossen bei Raumtemperatur für höchstens 2 Wochen nach Anbruch gelagert.

#### ***Spermienkonzentration***

Die Bestimmung der Spermienkonzentration erfolgte mit dem NucleoCounter<sup>®</sup>. Hierzu wurde das entsprechende Programm „DF“ eingestellt. Es wurden jeweils 10µl Sperma und 1ml Reagent S-100 (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Safe Seal Gefäß, weiß, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Nach sorgfältigen Schwenken wurden ca. 60µl dieser Mischung in die Einweg-SP1-Kassette (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) mittels Betätigung des Füllkolbens durch ein Flow System geladen. Die Messkassette wurde in die Messkammer eingeführt und der Messvorgang nach Angaben des Herstellers gestartet. Es wurde darauf geachtet, das klare Messfenster der Kassette nicht zu berühren. Nach ca. 30 Sekunden wurde das Ergebnis im LCD-Display in der Einheit „Millionen Spermien/ml“

angezeigt und notiert. Anschließend wurde die verbrauchte Kassette entfernt und das Programm auf Vitalitätsmessung (DF2) umgestellt.

### ***Vitalität***

Zur Bestimmung der Anzahl an toten Spermien pro Milliliter wurde eine Mischung aus 10µl Sperma und 1 ml phosphatgepufferte Salzlösung nach DULBECCO (DPBS, Lonza, Verviers, Belgien) hergestellt. Der weitere Vorgang gleicht dem der Konzentrationsmessung. Die Dauer bis zur Ergebnisanzeige lag bei ca. 80 Sekunden.

### ***Berechnung des Prozentsatzes an toten Spermien***

Darauffolgend wurde der Prozentsatz an toten Spermien durch die beiden Messungen wie folgt berechnet:

$$\text{Vitalität} / \text{Dichte} \times 100$$



**Abbildung 3.1** Der NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) mit eingesetzter Messkassette

### **3.2.2 Einsatz der Vitalfärbungen**

Für den Vergleich von Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> wurden die Eosin-Färbung, die Eosin-Nigrosin-Färbung und die Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung ausgewählt. Die Rezepturen der drei Färbungen befinden sich im Anhang (Tabelle 11.1-11.3). In den Abbildungen 3.2-3.5 sind Fotos der Vitalfärbungen aufgezeigt.

### **3.2.2.1 Anfertigung der gefärbten Ausstriche**

Alle Ausstriche der vier Gruppen wurden durch Untersucher 3 angefertigt. Die Anfertigung erfolgte auf einer Wärmeplatte (HT200, Minitüb, Tiefenbach) bei 38°C. Mit Hilfe einer sterilen Pipette wurde zur Anfertigung der Eosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche jeweils ein 10µl Tropfen von einer vorher geschwenkten Spermaprobe auf einen gereinigten und entfetteten sowie vorgewärmten Objektträger (Roth, Karlsruhe) gebracht. Neben den Probentropfen (ohne Kontakt) wurde mit einer zweiten sterilen Pipette ein Tropfen Färbelösung (20µl) aufgebracht (Gruppen „Rüde Frischsperma“, „Rüde Tiefgefriersperma“, „Bulle Tiefgefriersperma“). Anschließend wurde die Kante eines Deckglases (18x18mm, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) in die nebeneinander gesetzten Tropfen eingetaucht und zur Mischung kurz hin und her gekippt. Der anhängende Tropfen wurde nach Art der Anfertigung eines Blutausstriches auf einem zweiten vorgewärmten Objektträger mit Mattrand (Roth, Karlsruhe) im Winkel von 45° ausgestrichen und nach einmaligem Anblasen auf der Wärmeplatte luftgetrocknet. Die Zeit vom Vermischen des Farbstoffes mit dem Sperma bis zur vollständigen Trocknung der Präparate betrug ca. 15-20 Sekunden. Der Mattrand wurde zur Beschriftung des Objektträgers mit einer Kodierung verwendet.

Im Falle der Gruppe „Bulle Frischsperma“ wurde das Ausstrichverfahren aufgrund der hohen Spermiedichte modifiziert. Es wurde jeweils ein 100µl Tropfen Färbelösung auf einen Objektträger pipettiert und in diesen ein 10µl Tropfen der Probe gegeben. Probe und Färbelösung wurden durch Umrühren mit der Pipettenspitze vermischt und anschließend der Färbeausstrich mittels Deckglas wie bereits beschrieben auf einem zweiten Objektträger angefertigt.

Die Ausstriche der Eosin-Nigrosin-Färbung wurden nach der Beschreibung im Laborhandbuch der WORLD HEALTH ORGANISATION (2010) angefertigt. Demzufolge wurden im Falle der Gruppen „Rüde Frischsperma“, „Rüde Tiefgefriersperma“, „Bulle Tiefgefriersperma“ jeweils 10 µl Färbelösung in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend 10 µl Probe hinzugefügt. Nach einer Zeitspanne von 30 Sekunden wurden aus dem Gefäß jeweils 10 µl entnommen und auf zwei Objektträger pipettiert. Diese zwei Tropfen wurden ebenfalls nach Art der Anfertigung eines Blutausstriches ausgestrichen und luftgetrocknet. Im Falle der

Gruppe „Bulle Frischsperma“ wurde anfänglich 50 $\mu$ l statt 10 $\mu$ l Farbe in die Reaktionsgefäße pipettiert.

Von jeder der 160 Proben wurden jeweils sechs Ausstriche angefertigt (zwei Ausstriche je Färbung) und die Auswertbarkeit unter dem Mikroskop (Olympus CX41, Tokyo, Japan) beurteilt. Bei unzureichender Qualität des Ausstriches wurde ein neuer Ausstrich angefertigt.

### **3.2.2.2 Lagerung der Ausstriche und der Farbstofflösungen**

Die angefertigten Ausstriche wurden über den Zeitraum der Auswertung von höchstens 9 Monaten in verschlossenen Objektträgerkästen (Rotilabo-Objektträgerkästen, farbig, Roth, Karlsruhe) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die drei Farbstofflösungen wurden in dunklen Glasbehältern mit festschließenden Deckeln bei Zimmertemperatur aufbewahrt und einmal jährlich filtriert.

### **3.2.2.3 Auswertung der gefärbten Ausstriche**

Die Auswertung jedes Ausstriches erfolgte an einem Mikroskop (Olympus CX41, Tokyo, Japan) unter Ölimmersion (Immersionöl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) im Hellfeld bei 1000facher Vergrößerung. Die Ausstriche wurden durch drei Untersucher ausgewertet. Jeder Untersucher wies bereits Erfahrung in der Auswertung von gefärbten Spermienausstrichen auf. Zum Zeitpunkt der Auswertung waren den Untersuchern die Ergebnisse der NucleoCounter<sup>®</sup>-Messungen sowie die Identität der Probe nicht bekannt. Für die quantitative Evaluierung wurden pro Ausstrich 200 Spermien ausgewertet, wobei das Präparat mäanderförmig durchgemustert wurde. Die Anzahl der ungefärbten, halbgefärbten und vollständig gefärbten Spermien wurde getrennt mit einem Zählgerät (Counter AC-12, Minitüb, Tiefenbach) erfasst. Der entsprechende Prozentsatz wurde errechnet und notiert.



**Abbildung 3.2** gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Eosin-Färbung, Frischsperma Rüde (1000x)



**Abbildung 3.3** gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Eosin-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Rüde (1000x)



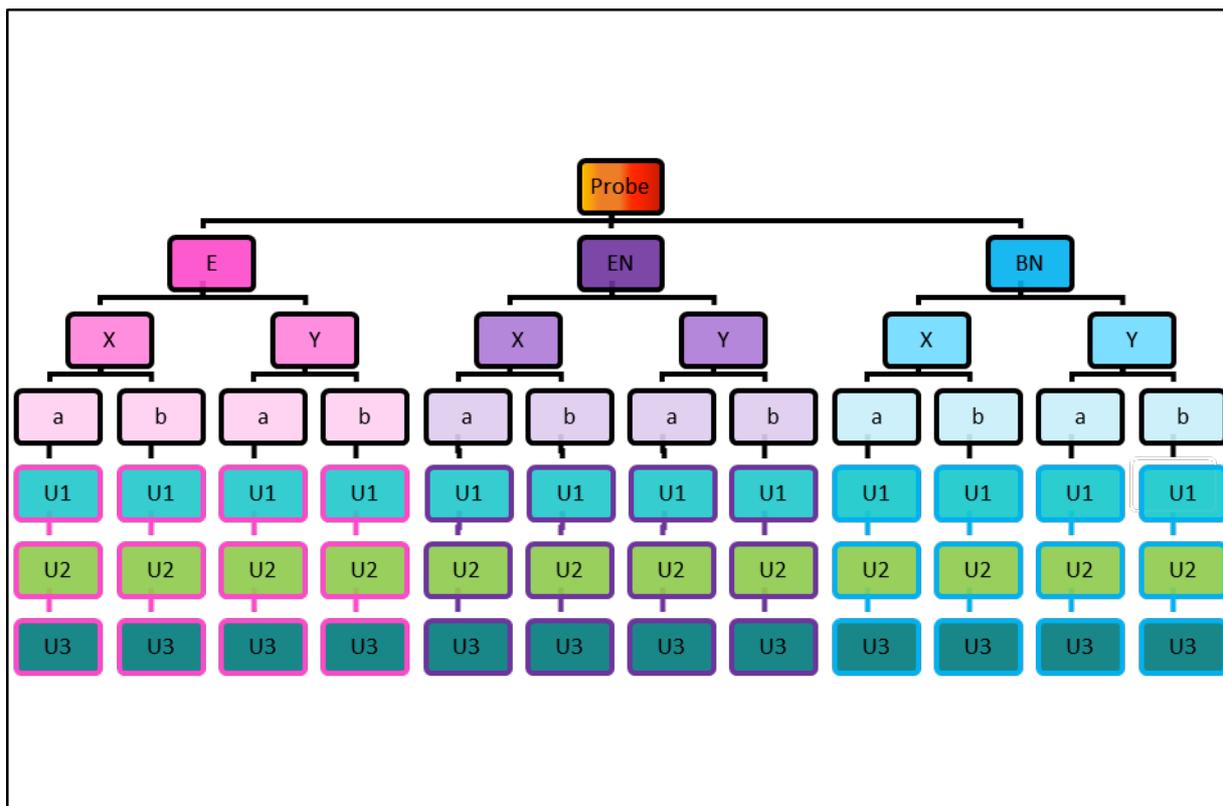
**Abbildung 3.4** gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Bulle (1000x)



**Abbildung 3.5** gefärbtes und halbgefärbtes Spermium mit der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Bulle (1000x)

### 3.3 Versuchsaufbau

Insgesamt wurden 160 Ejakulate von 2 Tierarten (Hund und Rind) untersucht. Dabei handelte es sich je Tierart jeweils um 40 Proben Frischsperma und 40 Proben Tiefgefriersperma. Der Versuchsaufbau mit den Vitalfärbungen ist in Abbildung 3.6 aufgezeigt. Die eigenen Untersuchungen über Vitalfärbungen von Spermien gliederten sich in mehrere Abschnitte. Zum einen sollte überprüft werden, inwiefern die zweifache Auswertung (a und b) desselben Ausstriches differiert und wie sich die Ergebnisse von der Auswertung zweier Ausstriche (X und Y) derselben Probe unterscheiden. Zum anderen wurde dabei der Einfluss verschiedener Untersucher (U1, U2, U3) überprüft und nachfolgend die Ergebnisse mit denen des NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) verglichen.



**Abbildung 3.6** Grafische Darstellung des Versuchsaufbaus mit den drei Vitalfärbungen

Färbungen: E: Eosin, EN: Eosin-Nigrosin, BN: Bromphenolblau-Nigrosin  
 Anfertigung von 2 Ausstrichen je Färbung: X und Y  
 Zweimalige Auswertung eines Ausstriches: a und b  
 Auswertung durch 3 Untersucher: U1, U2 und U3

Von jedem Ejakulat wurden mit jeder der drei Färbungen zwei Ausstriche hergestellt ( $3 \times 2 = 6$ ) und diese jeweils zweimalig durch drei Untersucher ausgewertet ( $6 \times 2 \times 3 = 36$ ). Somit wurden von jeder Probe 36 Ergebnisse erzielt (12 Ergebnisse je Färbung und 12 Ergebnisse je Untersucher). Die Ausstriche wurden innerhalb von neun Monaten nach ihrer Herstellung beurteilt.

#### ***Reproduzierbarkeit bei mehrfacher Beurteilung eines Ausstriches***

Um die Reproduzierbarkeit der Auswertung zu überprüfen, wurde jeder der sechs Ausstriche einer Probe von jedem der drei Untersucher zweimal ausgezählt (a, b).

#### ***Reproduzierbarkeit bei Anfertigung mehrerer Ausstriche einer Probe***

Um die Differenz zwischen verschiedenen Ausstrichen der gleichen Färbung zu überprüfen, wurden von jeder der drei Färbungen jeweils zwei Ausstriche (X, Y) pro Probe angefertigt und von jedem der drei Untersucher zweimal ausgewertet.

#### ***Vergleich der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern***

Um den Einfluss des Untersuchers zu evaluieren, wurden die angefertigten Ausstriche von drei Untersuchern zweimal ausgewertet. Den Untersuchern war während des gesamten Zeitraums weder das NucleoCounter<sup>®</sup>-Ergebnis, noch das Ergebnis der anderen Untersucher oder ihrer eigenen vorherigen Auswertungen bekannt.

#### ***Einfluss von halbgefärbten Spermien***

Bei jeder Auszählung wurden die halbgefärbten Spermien als gesonderte Kategorie getrennt von den gefärbten und ungefärbten Spermien erfasst. Die halbgefärbten Spermien wurden anschließend bei der Auswertung einmal zum Anteil lebender und einmal zum Anteil toter Spermien gezählt.

#### ***Vergleich der Ergebnisse mit dem NucleoCounter<sup>®</sup>***

Anschließend wurden die Ergebnisse der drei Vitalfärbungen mit denen des NucleoCounters<sup>®</sup> verglichen.

## **3.4 Versuchskontrollen**

### **3.4.1 Kontrollmessungen mit dem NucleoCounter®**

Um die Reproduzierbarkeit der eigenen NucleoCounter®-Messungen zu evaluieren, wurden von jeder der vier Gruppen die Konzentration und Vitalität von jeweils 10 Proben zweimal gemessen.

### **3.4.2 Wöchentliche Verlaufsauswertung der vitalgefärbten Ausstriche**

Über den Versuchszeitraum wurden durch einen Untersucher (U3) Kontrollzählungen durchgeführt, um die Haltbarkeit der Ausstriche zu überprüfen. Von jeder der vier Gruppen wurde von 10 Proben jeweils ein Ausstrich jeder Färbung (X) sofort nach der Anfertigung, sowie über die folgenden 12 Wochen jeweils einmal wöchentlich ausgewertet.

## **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit den Programmen MedCalc® und Microsoft Excel®. Der Vergleich der Vitalfärbungen untereinander wurde durch Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen vorgenommen. Die relativen Abweichungen der Vitalfärbungen zum NucleoCounter® wurden durch Anwendung des Bland-Altman-Plot ermittelt (BLAND & ALTMAN, 1986). Die Streuung jeder Methode wurde durch Berechnung der Variationskoeffizienten berechnet. Die Verlaufskontrolle wurde mit dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

In Tabelle 4.1 sind die für die Darstellung der Ergebnisse verwendeten Abkürzungen und Farben zusammengefasst.

**Tabelle 4.1** Verwendete Abkürzungen und Farben im Ergebnis- und Diskussionsteil

	<b>Abkürzung</b>	<b>Farbe</b>
Gruppe 1: Rüde Frischsperma	HRF	gelb
Gruppe 2: Rüde Tiefgefriersperma	HRT	orange
Gruppe 3: Bulle Frischsperma	RBF	rot
Gruppe 4: Bulle Tiefgefriersperma	RBT	braun
Untersucher 1	U1	türkis
Untersucher 2	U2	hellgrün
Untersucher 3	U3	dunkelgrün
Eosin-Färbung	E	pink
Eosin-Nigrosin-Färbung	EN	lila
Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung	BN	blau
NucleoCounter <sup>®</sup>	NC	
halbgefärbte Spermien = lebend	T	
halbgefärbte Spermien = tot	T+H	
Mittelwert	MW	
Standardabweichung	SD	
Minimalwert	Min	
Maximalwert	Max	
Variationskoeffizient	VK	
1. Ausstrich	X	
2. Ausstrich	Y	
1. Auswertung	a	
2. Auswertung	b	
Mittlere Abweichung	MA	

## **4.1 Messungen mit dem NucleoCounter®**

### **4.1.1 Dichte und Vitalität**

Die Durchführung der beiden NucleoCounter®-Messungen (Dichte und Vitalität) war mit jeder Probe der vier Gruppen möglich. Die Mittelwerte und deren Standardabweichung für die gemessenen Parameter Dichte und Vitalität sowie der errechnete Prozentsatz toter Spermien sind in Tabelle Nr. 4.2-4.5 zusammengefasst. Der Prozentsatz toter Spermien wurde mit der Formel wie in Kapitel 3.2.2 angegeben berechnet.

**Tabelle 4.2** Rüde Frischsperma: NucleoCounter®-Messungen (MW  $\pm$  SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechneter Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40

HRF	MW $\pm$ SD	Min	Max
Dichte (Mio./ml)	207,7 $\pm$ 159,9	19,3	886,2
Tote Spermien (Mio./ml)	26,9 $\pm$ 27,6	1,7	134,1
%-Tot	13,4 $\pm$ 7,6	2,5	42,5

**Tabelle 4.3** Rüde Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Messungen (MW  $\pm$  SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40

HRT	MW $\pm$ SD	Min	Max
Dichte (Mio./ml)	244,7 $\pm$ 98,3	73,9	545,6
Tote Spermien (Mio./ml)	100,5 $\pm$ 52,7	32,1	304,7
%-Tot	41,1 $\pm$ 12,4	20,7	70,2

**Tabelle 4.4** Bulle Frischsperma: NucleoCounter®-Messungen (MW  $\pm$  SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40

RBF	MW $\pm$ SD	Min	Max
Dichte (Mio./ml)	1282,0 $\pm$ 491,7	90,5	1909,0
Tote Spermien (Mio./ml)	319,8 $\pm$ 193,9	32,4	809,8
%-Tot	25,9 $\pm$ 12,3	6,5	53,2

**Tabelle 4.5** Bulle Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Messungen (MW  $\pm$  SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40

RBT	MW $\pm$ SD	Min	Max
Dichte (Mio./ml)	88,0 $\pm$ 23,3	57,2	157,8
Tote Spermien (Mio./ml)	40,2 $\pm$ 13,4	21,5	80,1
%-Tot	46,0 $\pm$ 10,5	31,6	75,0

### 4.1.2 Kontrollmessungen

Bei jeweils 10 Proben jeder Gruppe wurde die Messung für die Dichte und Vitalität mit dem NucleoCounter® wiederholt. Die ermittelten Variationskoeffizienten für die Doppelmessungen sind in Tabelle Nr. 4.6-4.9 dargestellt. Die Variationskoeffizienten lagen für die Konzentrationsmessung zwischen 3,19% und 8,32% und für die Vitalitätsmessung zwischen 4,14% und 9,17%. In allen vier Gruppen war der Variationskoeffizient für die Konzentrationsmessung kleiner als für die Vitalitätsmessung.

**Tabelle 4.6** Rüde Frischsperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW ± SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10

HRF	MW ± SD	Variationskoeffizient (%)
Dichte (Mio./ml)	291,2 ± 17,8	6,1
Tote Spermien (Mio./ml)	35,9 ± 2,3	6,5

**Tabelle 4.7** Rüde Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW ± SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10

HRT	MW ± SD	Variationskoeffizient (%)
Dichte (Mio/ml)	261,1 ± 9,7	3,7
Tote Spermien (Mio/ml)	123,9 ± 5,1	4,1

**Tabelle 4.8** Bulle Frischsperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW ± SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10

RBF	MW ± SD	Variationskoeffizient (%)
Dichte (Mio/ml)	1448,4 ± 46,3	3,2
Tote Spermien (Mio/ml)	348,3 ± 17,4	5,0

**Tabelle 4.9** Bulle Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW ± SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10

RBT	MW ± SD	Variationskoeffizient (%)
Dichte (Mio/ml)	80,1 ± 6,7	8,3
Tote Spermien (Mio/ml)	35,7 ± 3,3	9,2

## 4.2 Auswertung der vitalgefärbten Ausstriche

In allen Fällen war es möglich, Ausstrichpräparate der drei Färbelösungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin herzustellen. Die Ausstriche wurden nach der in Kapitel 3.2.2.3 beschriebenen Vorgehensweise ausgewertet und der Anteil gefärbter, halbgefärbter und ungefärbter Spermien getrennt erfasst.

### 4.2.1 Alter der Ausstriche zum Zeitpunkt der Auswertung

Da es aufgrund der großen Probenanzahl nicht möglich war, alle Ausstriche zeitnah auszuwerten, ist das mittlere Alter der Ausstriche zum Zeitpunkt der Auswertung in Tagen für jede Gruppe in Tabelle 4.10 angegeben. Es wurden alle Untersucher (U1, U2, U3) und alle Auszählungen (X/Y, a/b) zusammengefasst.

**Tabelle 4.10** Alter der Ausstriche (MW  $\pm$  SD, Min/Max) in Tagen zum Zeitpunkt der Auswertung in den vier Gruppen

	<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>HRF</b>	37,2 $\pm$ 54,2	0	239
<b>HRT</b>	19,0 $\pm$ 22,7	0	83
<b>RBF</b>	154,5 $\pm$ 61,4	0	232
<b>RBT</b>	5,0 $\pm$ 9,9	0	79

### 4.2.2 Vorkommen von nicht auswertbaren Ausstrichen

Bei einigen Ausstrichen konnte keine Auswertung erfolgen, da alle Spermienköpfe rot (E-Färbung) bzw. blau (BN-Färbung) gefärbt waren. In diesem Fall wurden die Proben für die Berechnung der nachfolgenden Auswertungen ausgeschlossen. Das Vorkommen dieser Ausstriche trat nach unterschiedlichen Lagerungszeiten auf (zwischen 1 und 70 Tagen nach der Anfertigung) und nur bei den Tiefgefrierproben beider Tierarten. Mit der E-Färbung waren 12 Rüden- und 6 Bullenproben und mit der BN-Färbung jeweils 2 Proben jeder Tierart nicht auswertbar, während die EN-Färbung immer eine Differenzierung zwischen gefärbten und ungefärbten Spermien erlaubte. Teilweise war nur einer der beiden Ausstriche nicht auswertbar. Ein Einfluss des Probenspenders konnte nicht beobachtet werden.

### 4.2.3 Vorkommen von halbgefärbten Spermien

Der prozentuale Anteil an halbgefärbten Spermien wurde getrennt von den vollgefärbten und ungefärbten Spermien erfasst. Wie häufig Präparate mit halbgefärbten Spermien auftraten, wurde als Prozentsatz errechnet, indem jeweils die Ergebnisse aller Untersucher je Färbung zusammen betrachtet wurden (X/Y, a/b). Zudem wurde der Anteil an halbgefärbten Spermien evaluiert, indem der Mittelwert und die Standardabweichung mit Minimal- und Maximalwerten errechnet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.11 - 4.14 zusammengefasst.

Mit allen Färbungen wurden in der Gruppe RBF am häufigsten Präparate mit halbgefärbten Spermien gefunden (94%-100%). In jeder Gruppe traten mit der EN-Färbung am seltensten Präparate mit halbgefärbten Spermien (27%-94%) auf.

Der prozentuale Anteil an halbgefärbten Spermien in den Präparaten mit halbgefärbten Spermien war bei den drei Vitalfärbungen unterschiedlich. Der Mittelwert war am geringsten bei der EN-Färbung in der Gruppe HRF (1,8%). Die meisten halbgefärbten Spermien wurden durchschnittlich mit allen Färbungen bei der Auswertung von Bullenspermien gefunden (8,1%-24,6%). Die höchsten Maximalwerte kamen mit der E- und EN-Färbung in der Gruppe RBF vor (69% bzw. 61,5%) und mit der BN-Färbung in der Gruppe HRT (61,5%).

**Tabelle 4.11** Rüde Frischsperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW  $\pm$  SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien

HRF	Präparate (%)	MW $\pm$ SD	Min	Max
<b>E</b>	82	4,0 $\pm$ 3,4	0,5	22
<b>EN</b>	36	1,8 $\pm$ 1,9	0,5	14
<b>BN</b>	53	2,0 $\pm$ 1,7	0,5	10,5

**Tabelle 4.12** Rüde Tiefgefriersperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW  $\pm$  SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien

HRT	Präparate (%)	MW $\pm$ SD	Min	Max
<b>E</b>	83	9,8 $\pm$ 9,2	0,5	56,5
<b>EN</b>	27	2,3 $\pm$ 3,4	0,5	25
<b>BN</b>	72	3,9 $\pm$ 5,2	0,5	61,5

**Tabelle 4.13** Bulle Frischsperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW  $\pm$  SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien

RBF	Präparate (%)	MW $\pm$ SD	Min	Max
<b>E</b>	100	24,6 $\pm$ 12,9	2,0	69
<b>EN</b>	94	9,4 $\pm$ 7,0	0,5	61,5
<b>BN</b>	96	8,1 $\pm$ 7,1	0,5	47

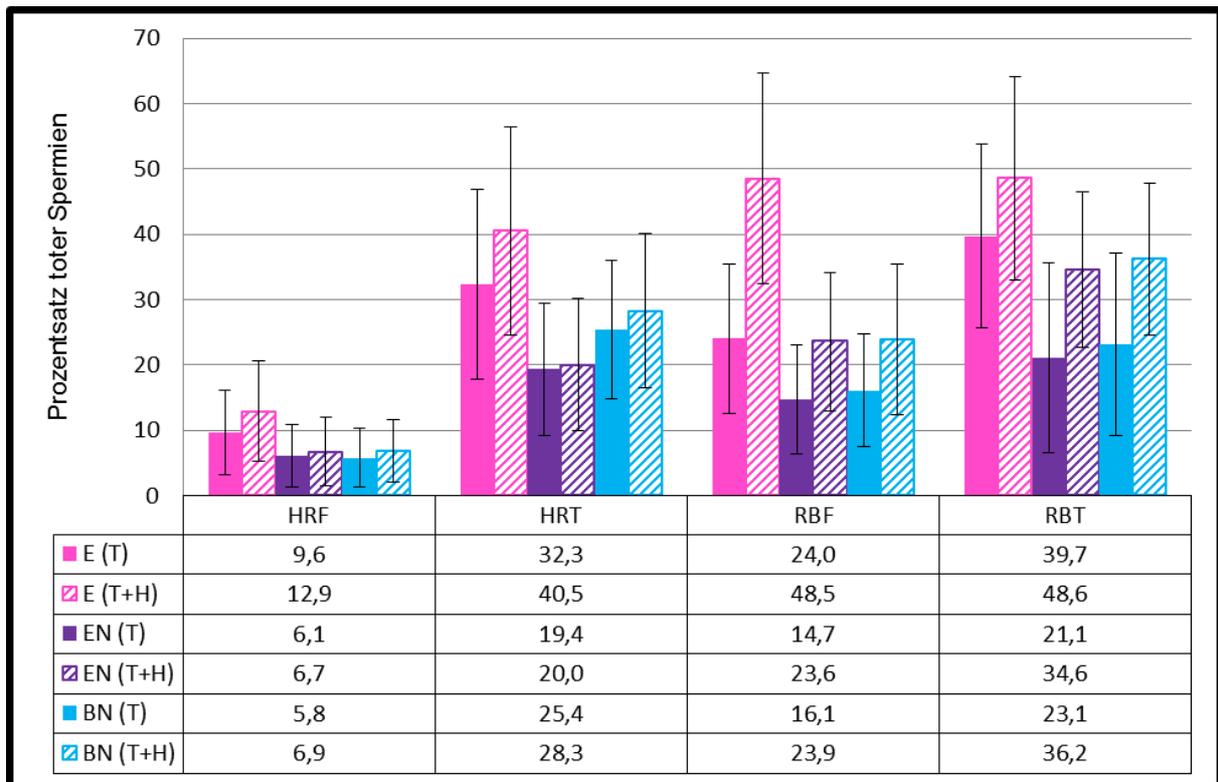
**Tabelle 4.14** Bulle Tiefgefriersperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW  $\pm$  SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien

RBT	Präparate (%)	MW $\pm$ SD	Min	Max
<b>E</b>	82	10,8 $\pm$ 9,5	0,5	41,5
<b>EN</b>	69	19,5 $\pm$ 10,8	0,5	58,5
<b>BN</b>	87	15,1 $\pm$ 9,6	0,5	48,5

#### 4.2.4 Vergleich der drei Vitalfärbungen untereinander

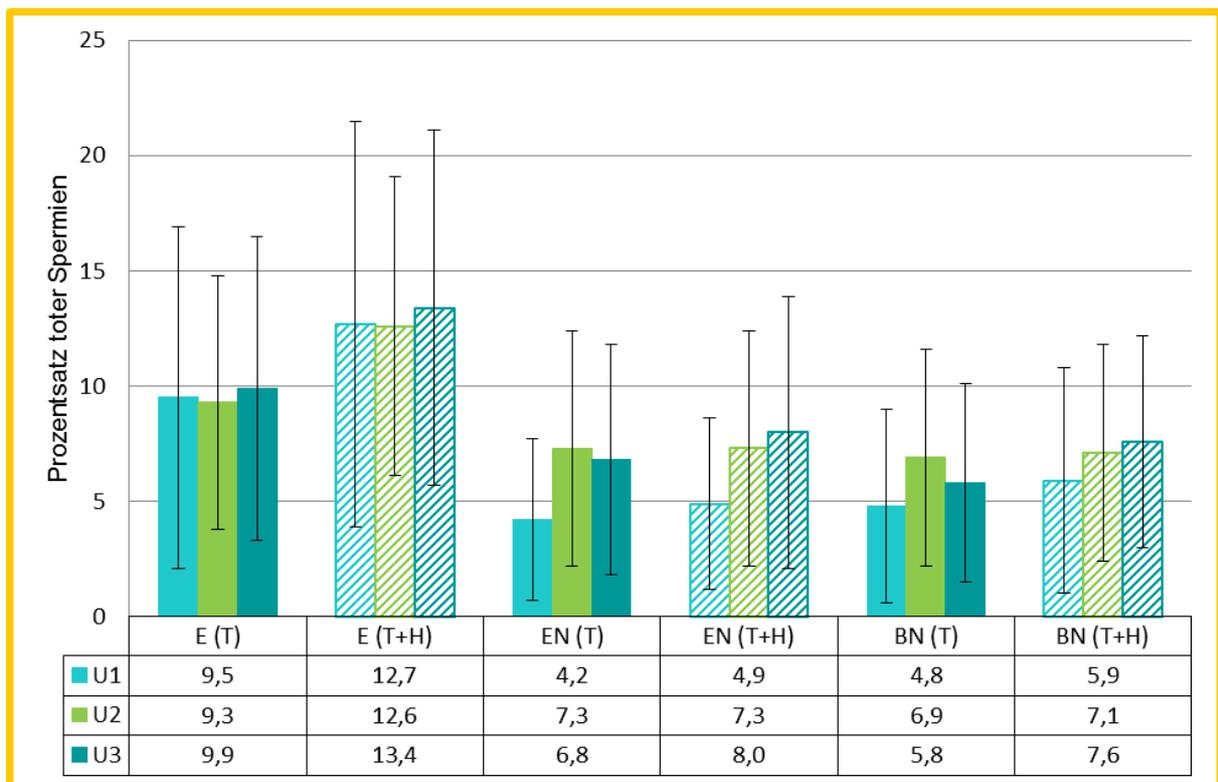
Um einen Vergleich der drei Vitalfärbungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin untereinander vorzunehmen, wurden für die drei Färbungen in jeder Gruppe (T und T+H) der Mittelwert (MW  $\pm$  SD) aus allen Auswertungen (X/Y, a/b, U1/U2/U3) berechnet. Die Ergebnisse sind grafisch in der Abbildung 4.1 für die vier untersuchten Gruppen dargestellt. Die Mittelwerte (a/b, X/Y) wurden auch getrennt für jeden Untersucher berechnet und sind in den Abbildungen 4.2-4.5 veranschaulicht.

Die geringsten Abweichungen zwischen den drei Färbungen wurden bei Frischsamenproben des Rüden (HRF) festgestellt. Mit der E-Färbung wurde in allen Gruppen immer der höchste Prozentsatz toter Spermien festgestellt während die EN- und BN-Färbung im Mittel immer ähnliche Ergebnisse in den Gruppen HRF, RBF und RBT ergaben.

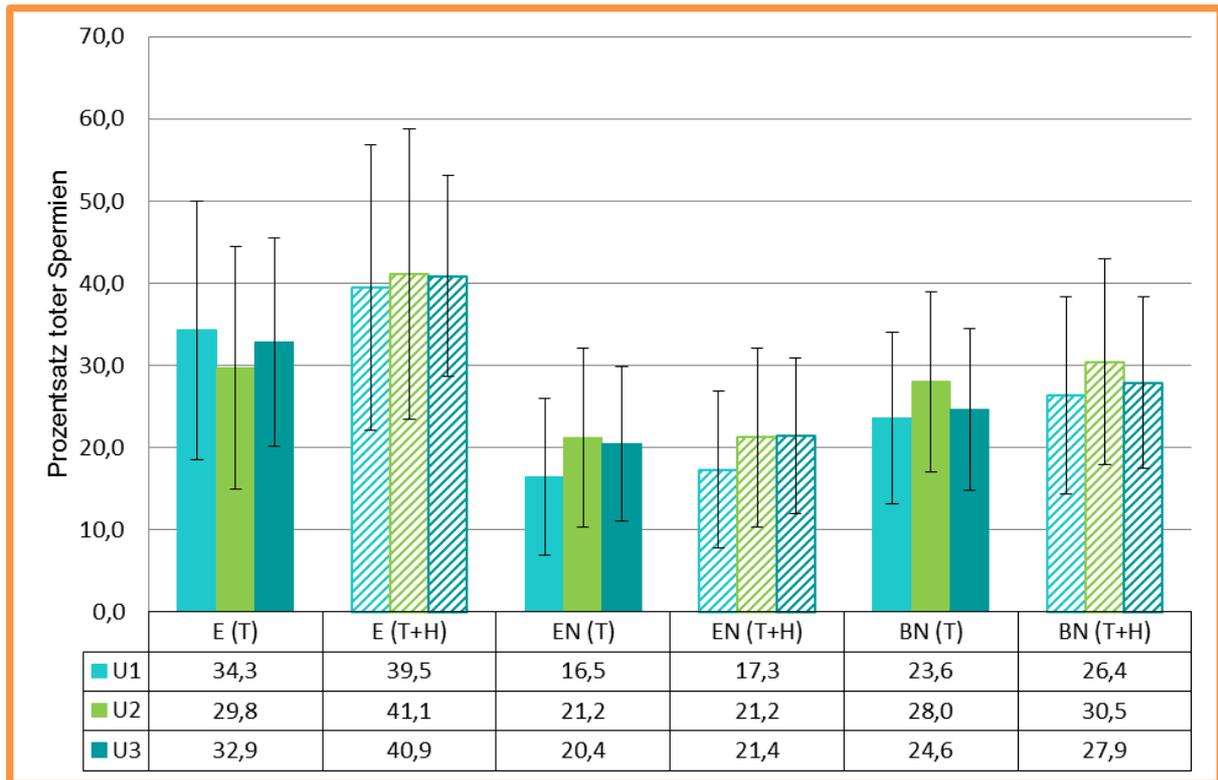


**Abbildung 4.1** Vergleich der drei Vitalfärbungen (MW  $\pm$  SD) in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

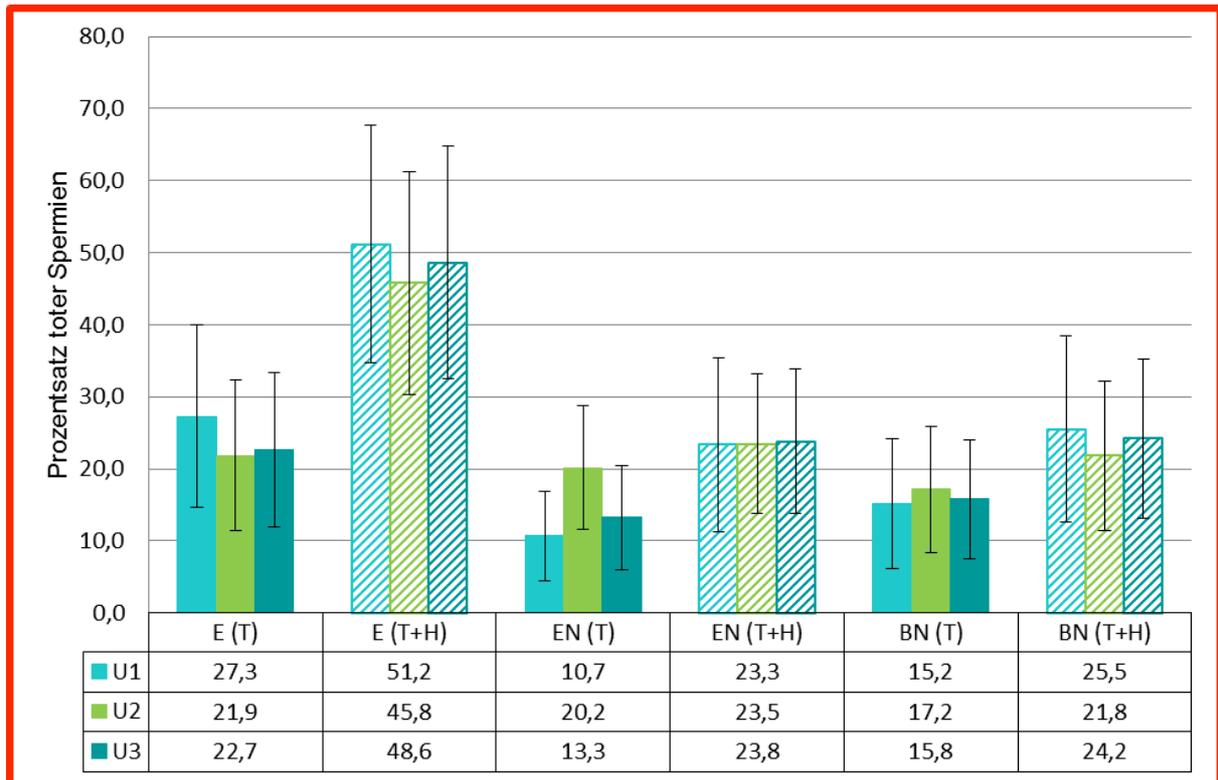
Kleinere Unterschiede zwischen den Untersuchern (maximale Differenz im Mittel 8,3%) ergaben sich zumeist, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet wurden. Am geringsten sind die Differenzen mit der E-Färbung in der Gruppe HRF (<1%). Bei Proben des Rüden (HRF und HRT) liegen die Differenzen der EN- und BN-Färbung unter 5%. Die größten Untersucherunterschiede waren in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma mit der EN- und BN-Färbung zu beobachten, wenn nur ganz gefärbte Spermien gewertet wurden (maximale Differenz im Mittel 28,3% bzw. 23,3%).



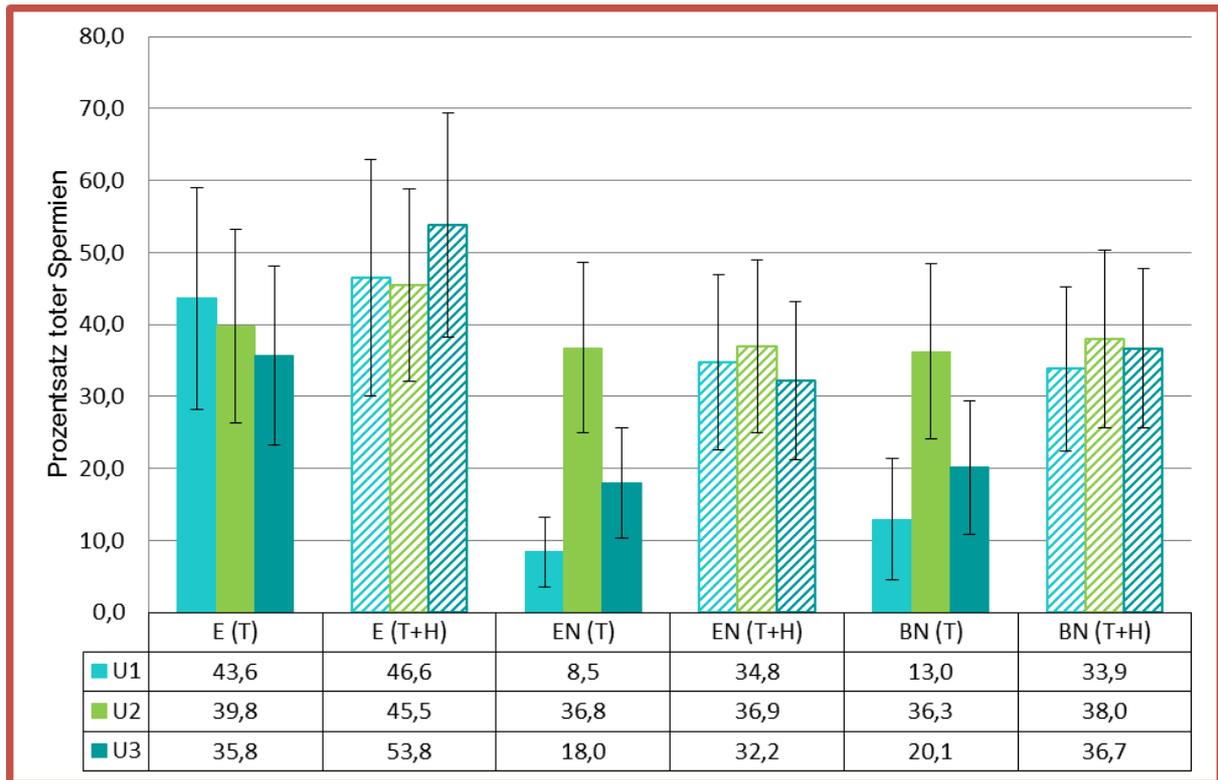
**Abbildung 4.2** Rüde Frischsperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW  $\pm$  SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.3** Rüde Tiefgefriersperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW  $\pm$  SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



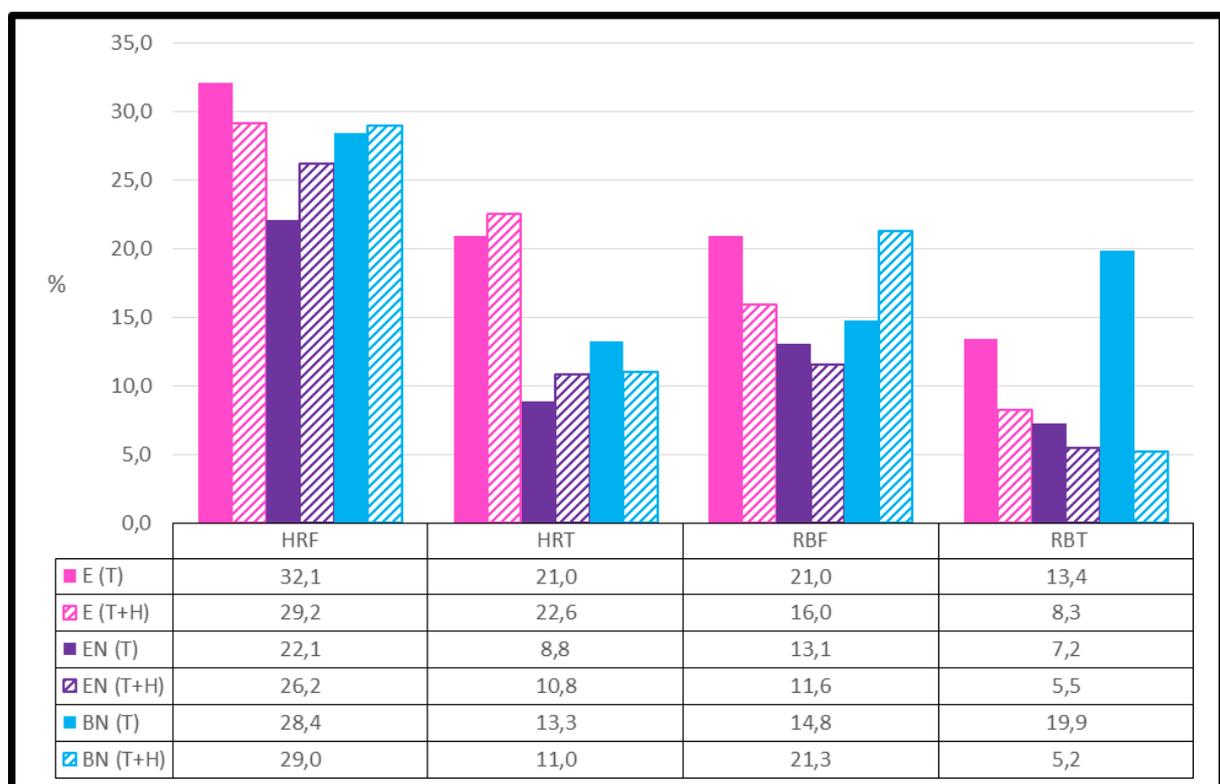
**Abbildung 4.4** Bulle Frischsperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW  $\pm$  SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.5** Bulle Tiefgefriersperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW  $\pm$  SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

Außerdem wurden jeweils die Variationskoeffizienten als Maß für die Streuung ermittelt. Hierzu wurden zunächst aus den Ergebnissen aller Untersucher für jede Färbung in den vier Gruppen die Mittelwerte von X-ab und Y-ab gebildet und diese miteinander verglichen. Die Variationskoeffizienten sind in Prozent angegeben und in Abbildung 4.6 aufgezeigt.

Die größten Variationskoeffizienten traten mit allen Färbungen (T und T+H) in der Gruppe HRF (22,14%-32,14%) auf. Den kleinsten Variationskoeffizienten weist in jeder Gruppe die EN-Färbung (T und T+H) auf (5,25%-26,24%). In der Gruppe RBT sind die Variationskoeffizienten mit jeder Färbung kleiner, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet werden.



**Abbildung 4.6** Variationskoeffizienten (%) der drei Vitalfärbungen in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

#### 4.2.5 Reproduzierbarkeit bei mehrfacher Beurteilung eines Ausstriches

Für den Vergleich der zweifachen Auswertung (a/b) eines Ausstriches wurde nur der X-Ausstrich für die Auswertung herangezogen. Die ermittelten Variationskoeffizienten für jede Färbung, jede Gruppe und jeden Untersucher sind in den Abbildungen 4.7 - 4.9 dargestellt.

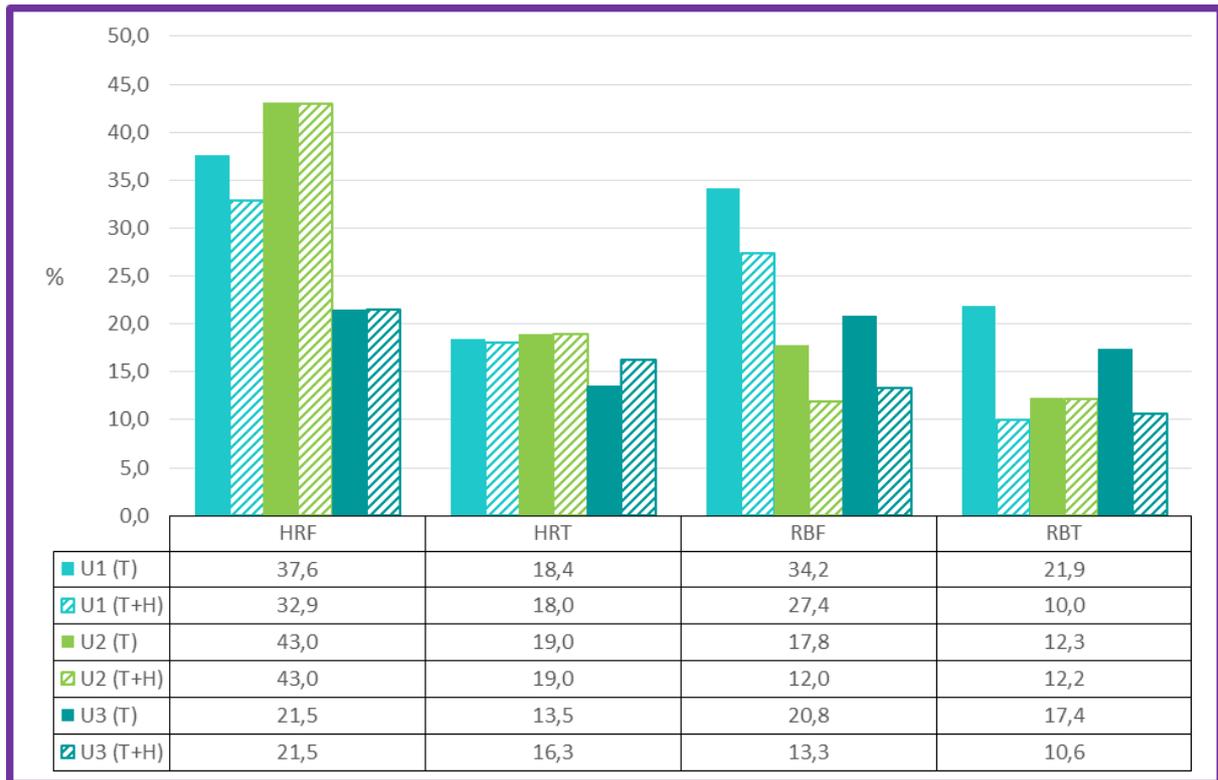
Insgesamt wurde der größte Variationskoeffizient bei Untersucher 2 mit der EN-Färbung (T und T+H) in der Gruppe HRF (43%) beobachtet, gefolgt von der E-Färbung (T) bei Untersucher 1 ebenfalls in der Gruppe HRF (40,4%). Die drei kleinsten Variationskoeffizienten waren bei allen Untersuchern mit der BN-Färbung (T+H) in der Gruppe RBT (9,7% - 10,2%) zu notieren. Betrachtet man die kleinsten und größten Variationskoeffizienten eines jeden Untersuchers, so zeigt sich, dass mit jeder Färbung einheitlich bei jedem Untersucher die größten Variationskoeffizienten bei HRF zu finden sind und die kleinsten bei RBT.

Die größte Diskrepanz der Variationskoeffizienten zwischen den Untersuchern ist bei der EN-Färbung (T und T+H) in der Gruppe HRF zu finden (Differenz 21,5%). Die kleinste Differenz (0,5%) zwischen den Untersuchern ist bei der BN-Färbung (T+H) in den Gruppen HRT und RBT anzutreffen. Eine Verringerung der Differenzen zwischen den Variationskoeffizienten der drei Untersucher kann mit der EN- und BN-Färbung in der Gruppe RBT um 7,4% bzw. 15,8% erreicht werden, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet werden.

Nach Gruppen betrachtet liegen die kleinsten Untersucherunterschiede in den Gruppen HRF, HRT und RBT mit der BN-Färbung (T+H) und in der Gruppe RBF mit der E-Färbung (T) vor. Nach Färbung sortiert ist die kleinste Differenz zwischen den Untersuchern mit der E-Färbung (T) bei der Gruppe HRF und mit der EN- und BN-Färbung (T+H) bei der Gruppe HRT und RBT zu erzielen.



**Abbildung 4.7** Eosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.8** Eosin-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



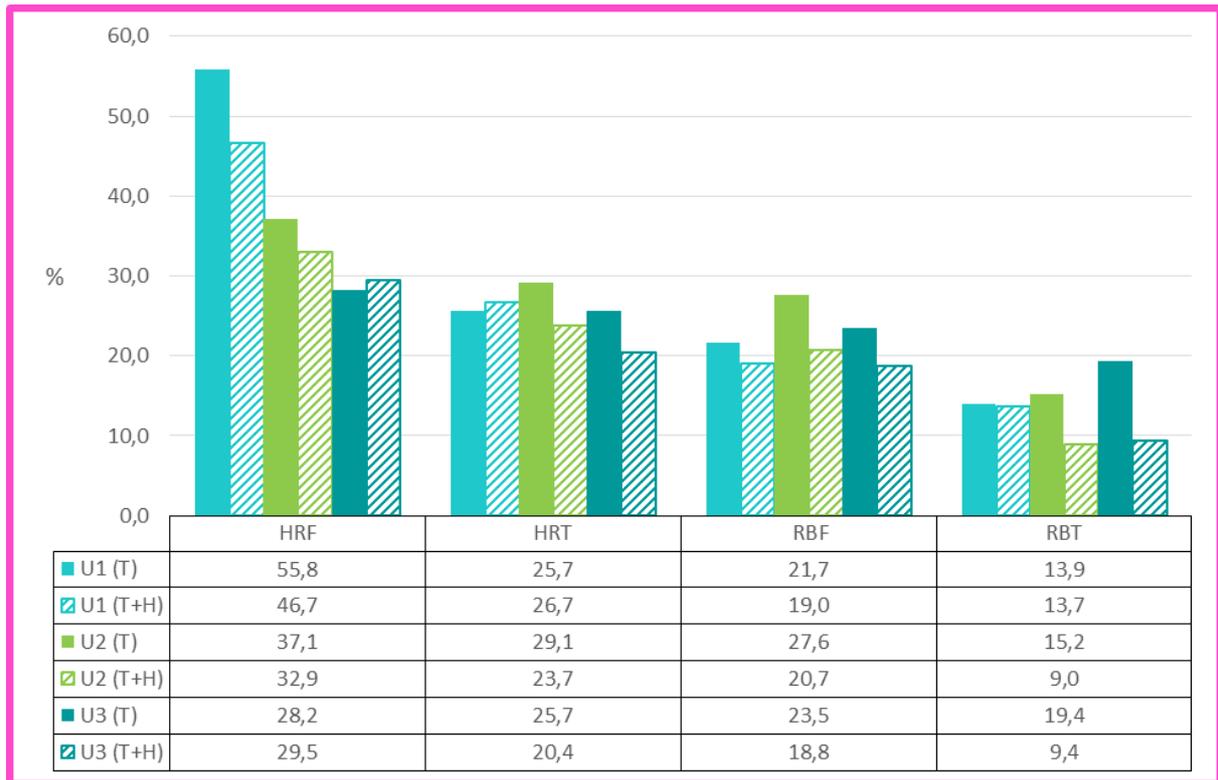
**Abbildung 4.9** Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

#### 4.2.6 Reproduzierbarkeit bei Anfertigung mehrerer Ausstriche einer Probe

Für den Vergleich verschiedener Ausstriche wurden von jeder Probe jeweils zwei Ausstriche mit jeder Färbung hergestellt und diese wiederum von drei Untersuchern zweimal ausgewertet. Für die Berechnung des Variationskoeffizienten wurden zunächst für jeden Untersucher die Mittelwerte aus X-ab und Y-ab gebildet und diese miteinander verglichen. Die ermittelten Variationskoeffizienten für jede Färbung, jede Gruppe und jeden Untersucher sind in den Abbildungen 4.10 - 4.12 dargestellt.

Insgesamt wurden die größten Variationskoeffizienten bei Untersucher 1 mit der E- und BN-Färbung (T und T+H) in der Gruppe HRF (46,7% - 56,6%) nachgewiesen. Die kleinsten Variationskoeffizienten waren bei allen Untersuchern mit allen Färbungen (T+H) in der Gruppe RBT (6,5% - 13,7%) zu notieren. Betrachtet man die kleinsten und größten Variationskoeffizienten eines jeden Untersuchers, so zeigt sich, dass mit jeder Färbung einheitlich bei jedem Untersucher die größten Variationskoeffizienten bei HRF zu finden sind und die kleinsten mehrheitlich bei RBT.

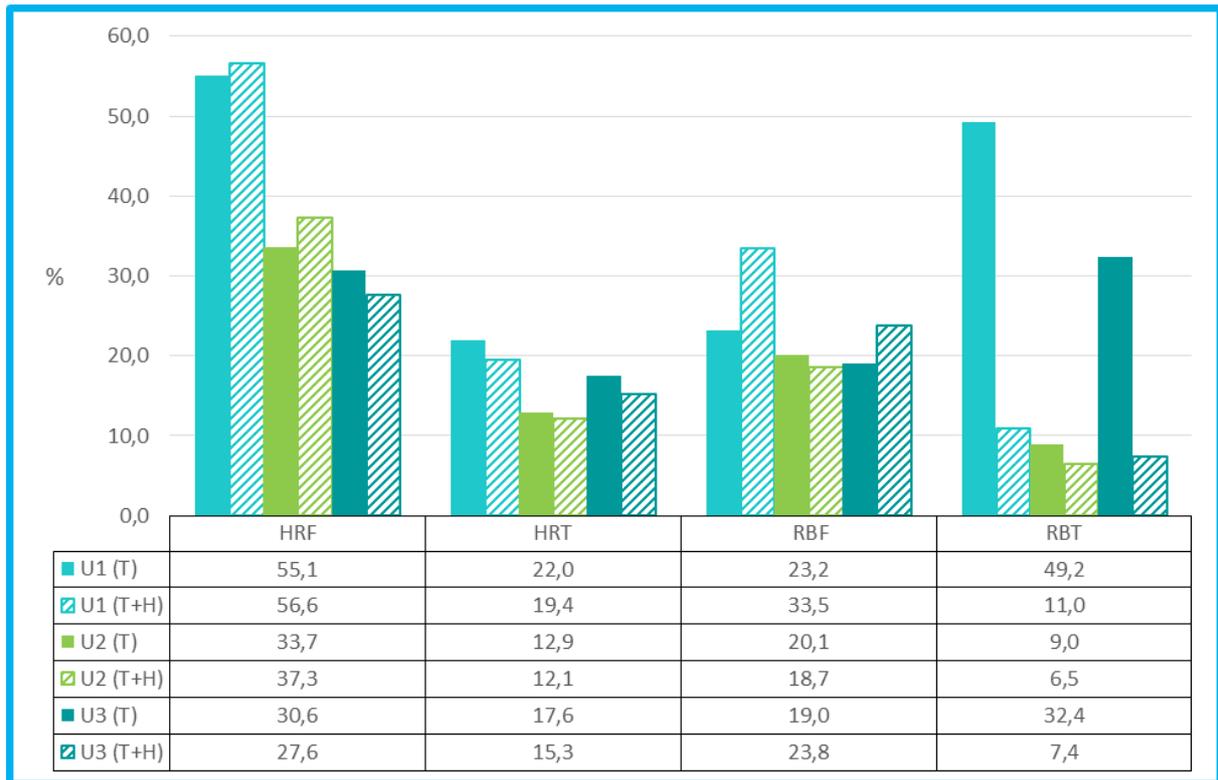
Die größte Diskrepanz der Variationskoeffizienten zwischen den Untersuchern ist in der Gruppe HRF mit der E- und BN-Färbung (T und T+H) (Differenz 17,2%-19%) und in der Gruppe RBT mit der EN- und BN-Färbung (T+H) (Differenz 26,1%-40,2%) zu finden. Die größte Übereinstimmung zwischen den Untersuchern ist bei der E-Färbung (T+H) in der Gruppe RBF anzutreffen (Differenz 1,9%). Bei der EN- und BN-Färbung in der Gruppe RBT kann eine größere Übereinstimmung des Variationskoeffizienten zwischen den Untersuchern um 21,8% bzw. 35,7% erreicht werden, wenn die halbgefärbten Spermien zum Anteil toter Spermien gewertet werden.



**Abbildung 4.10** Eosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.11** Eosin-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.12** Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

Stellt man nun einen Vergleich der beiden Ergebnisteile 4.2.5 und 4.2.6 an, so fallen unterschiedliche Tendenzen je nach Färbung und Untersucher auf. Bei der E-Färbung (T und T+H) sind bei allen Untersuchern mehrheitlich die Variationskoeffizienten bei wiederholter Auswertung desselben Ausstriches (a/b) kleiner als bei Auswertung zweier Ausstriche derselben Probe (X/Y). Bei der EN-Färbung (T und T+H) dagegen waren bei der Auswertung zweier Ausstriche derselben Probe (X/Y) niedrigere Variationskoeffizienten zu finden. Ein Untersucherunterschied tritt bei der BN-Färbung (T und T+H) auf. Hier sind bei Untersucher 1 und 3 die Variationskoeffizienten beim Vergleich a/b mehrheitlich kleiner, bei Untersucher 2 dagegen bei X/Y (außer bei HRT). Die größte Differenz zwischen den Variationskoeffizienten von a/b und X/Y ist bei Untersucher 1 mit der BN-Färbung (T und T+H) in Gruppe HRF (26,6% bzw. 28,5%) festzustellen. Sehr einheitliche Variationskoeffizienten kommen dagegen zum Beispiel bei Untersucher 3 mit der EN-Färbung (T und T+H) in der Gruppe HRT und RBT vor.

#### 4.2.7 Wöchentliche Verlaufsauswertung der vitalgefärbten Ausstriche

Die Auswertung von zehn Ausstrichen jeder Färbung in jeder Gruppe unmittelbar nach der Anfertigung und nachfolgend einmal wöchentlich über eine Zeitspanne von 3 Monaten (13 Auswertungen) ergab, dass statistisch betrachtet über den untersuchten Zeitraum ein Einfluss auf die Anzahl gefärbter Spermien bei folgenden Gruppen und Färbungen durch die Lagerung der Präparate auftrat:

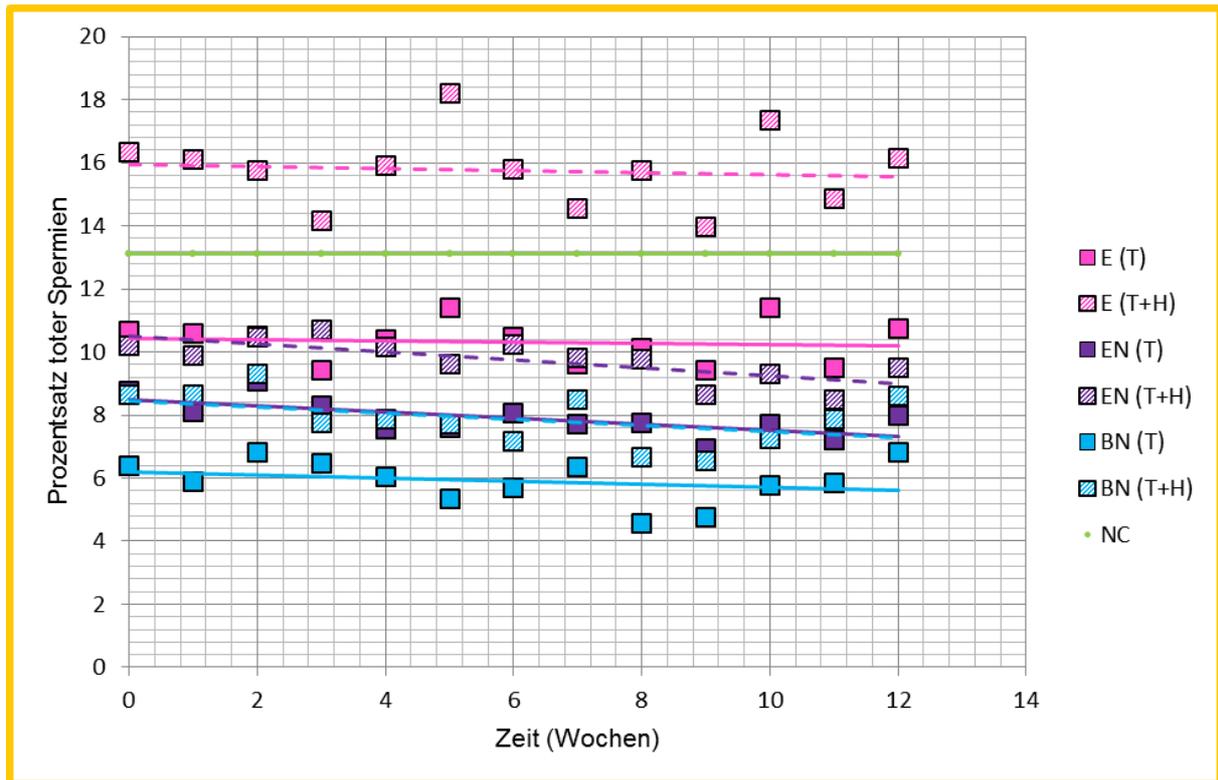
- HRF: EN (T), EN (T+H), BN (T), BN (T+H)
- HRT: E (T), EN (T), EN (T+H)
- RBF: E (T+H), EN (T+H), BN (T)
- RBT: E (T+H), EN (T+H), BN (T), BN (T+H)

Dabei ist die Veränderung des Prozentsatzes toter Spermien mit der Zeit bei der BN-Färbung (T) in der Gruppe RBF und bei der E-Färbung (T+H) in der Gruppe RBT ansteigend, bei den anderen Kombinationen fallend.

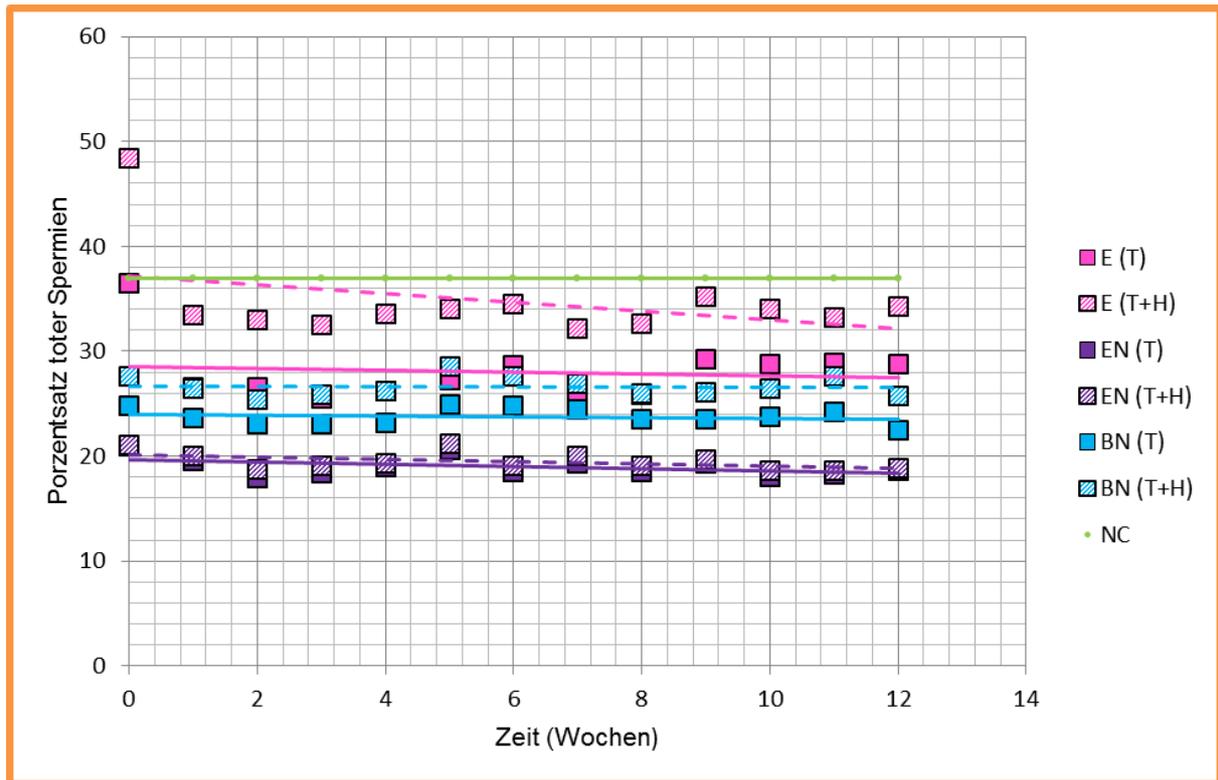
In Tabelle 4.15 sind dazu die Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) für die Verlaufskontrollen in den vier Gruppen aufgezeigt. Die Abbildungen 4.13-4.16 zeigen grafisch den Verlauf der Mittelwerte des prozentualen Anteils toter Spermien (T und T+H) der jeweils 10 Proben jeder Färbung in den vier Gruppen.

**Tabelle 4.15** Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) für die Verlaufsauswertung über 12 Wochen mit den drei Vitalfärbungen in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

$r_s$	HRF	HRT	RBF	RBT
<b>E (T)</b>	-0,09	0,26	0,06	0,12
<b>E (T+H)</b>	-0,13	0,05	-0,24	0,63
<b>EN (T)</b>	-0,63	-0,35	0,14	0,03
<b>EN (T+H)</b>	-0,79	-0,53	-0,52	-0,58
<b>BN (T)</b>	-0,30	-0,11	0,63	-0,25
<b>BN (T+H)</b>	-0,48	-0,10	0,28	-0,47



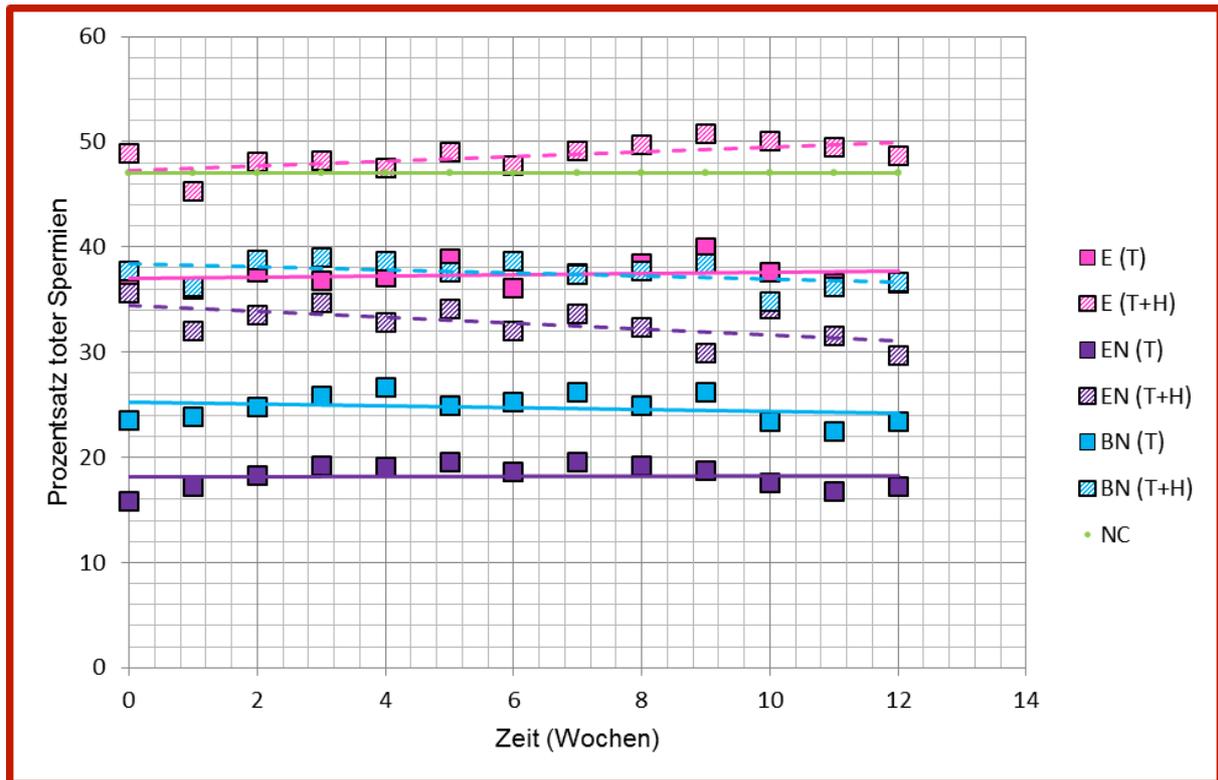
**Abbildung 4.13** Rüde Frischsperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10



**Abbildung 4.14** Rüde Tiefgefriersperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, excl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10



**Abbildung 4.15** Bulle Frischsperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes totter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbfärbter Spermien, n=10



**Abbildung 4.16** Bulle Tiefgefriersperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes totor Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10

### 4.3 Vergleich der Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter®

#### 4.3.1 Vergleich der Ergebnisse

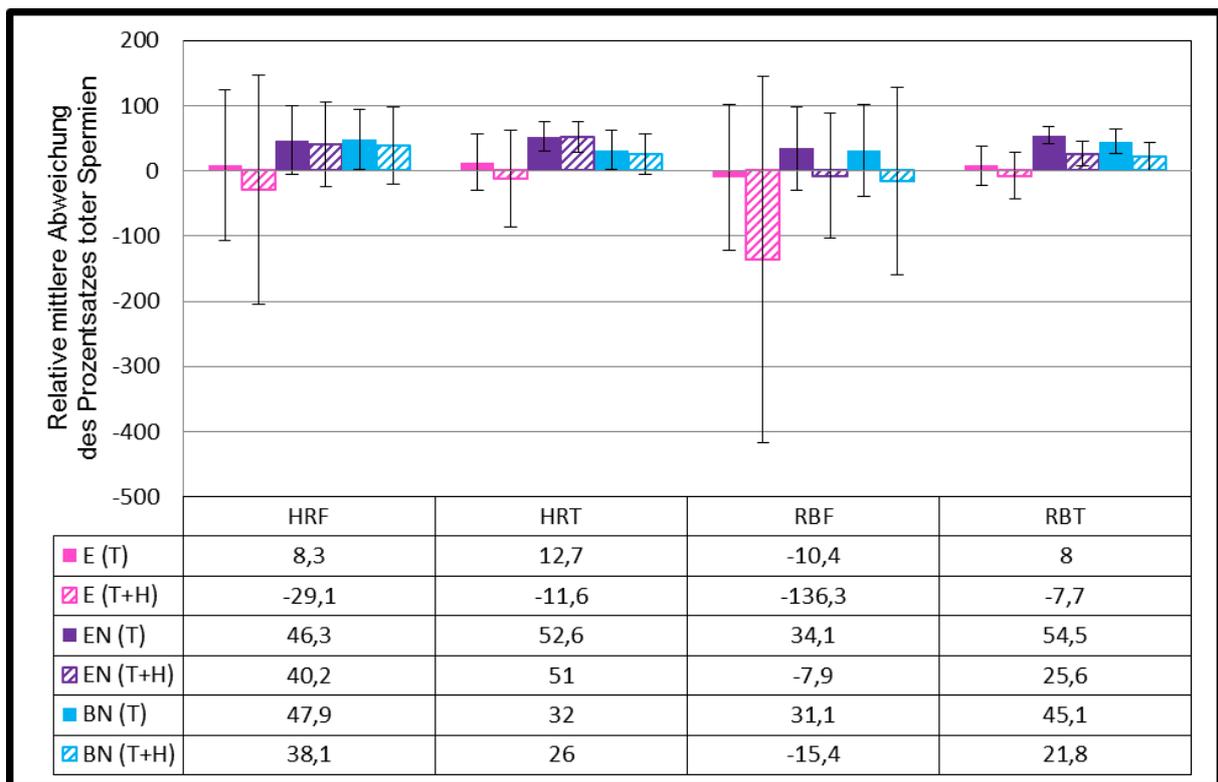
Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit dem NucleoCounter® erzielt wurden, lagen die Ergebnisse der Vitalfärbungen EN und BN bezüglich des Anteils toter Spermien fast immer unter denen des NucleoCounters®. Mit der E-Färbung lag der Anteil toter Spermien im Vergleich zum NucleoCounter® auch öfters höher. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.16 zusammengefasst.

**Tabelle 4.16** Häufigkeit der Unterschätzung (%) des Prozentsatzes toter Spermien durch die drei Vitalfärbungen im Vergleich zum NucleoCounter® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

	<b>E (T)</b>	<b>E (T+H)</b>	<b>EN (T)</b>	<b>EN (T+H)</b>	<b>BN (T)</b>	<b>BN (T+H)</b>
<b>HRF</b>	77	55	93	89	94	89
<b>HRT</b>	71	50	100	100	96	91
<b>RBF</b>	64	5	90	64	89	65
<b>RBT</b>	73	47	99	97	98	93

Für den Vergleich der Ergebnisse zwischen dem NucleoCounter® und den Vitalfärbungen wurde der Bland-Altman-Plot verwendet. Hierzu wurden vorerst die Ergebnisse aller Untersucher von X-a und X-b zusammengefasst und jeweils der Mittelwert gebildet. Der NucleoCounter® wurde als Goldstandard gewertet. Die mittleren relativen Abweichungen werden in Prozent angegeben und sind grafisch in Abbildung 4.17 zusammengefasst (T und T+H). Positive Werte sprechen für eine durchschnittliche Unterschätzung der Vitalfärbungen im Vergleich zum NucleoCounter®. Die dazugehörigen Bland-Altman-Plots sind in im Anhang (Abb. 11.1-11.24) zu finden.

Die E-Färbung hat, wenn nur die ganz gefärbten Spermien berücksichtigt wurden (T), bei allen 4 Gruppen die geringste relative Abweichung zum NucleoCounter® (NC). Zählt man bei der E-Färbung die halbgefärbten Spermien zu dem Prozentsatz toter Spermien dazu (T+H), so lagen die Werte im Mittel bei allen Gruppen höher als die des NC. Bei der EN- und BN-Färbung ist im Mittel in allen Gruppen eine kleinere Abweichung zum NC festzustellen, wenn die halbgefärbten Spermien zum Anteil toter Spermien gewertet wurden (T+H).



**Abbildung 4.17:** Mittlere relative Abweichung mit 95% Konfidenzintervall des Prozentsatzes toter Spermien der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

Außerdem wurde die Abweichung in Bezug auf den NucleoCounter® zwischen den Färbungen auf signifikante Unterschiede überprüft. Hierfür wurde jeweils die Differenz aus NC und Färbung (X-ab aller Untersucher) gebildet. Für die Trendbeurteilung wurden die Mittelwerte  $\pm$  SD der Differenzen herangezogen (Tabelle 4.17).

Die E-Färbung (T) hat im Vergleich immer eine signifikant geringere Abweichung zum NC als die EN- und BN-Färbung. Zwischen der EN- und BN-Färbung (T und T+H) besteht bei Frischspermaproben von Rüden und Bullen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Differenz zum NC. Bei den Tiefgefrierspermagruppen der beiden Tierarten weist die BN-Färbung eine signifikant kleinere Abweichung zum NC auf als die EN-Färbung.

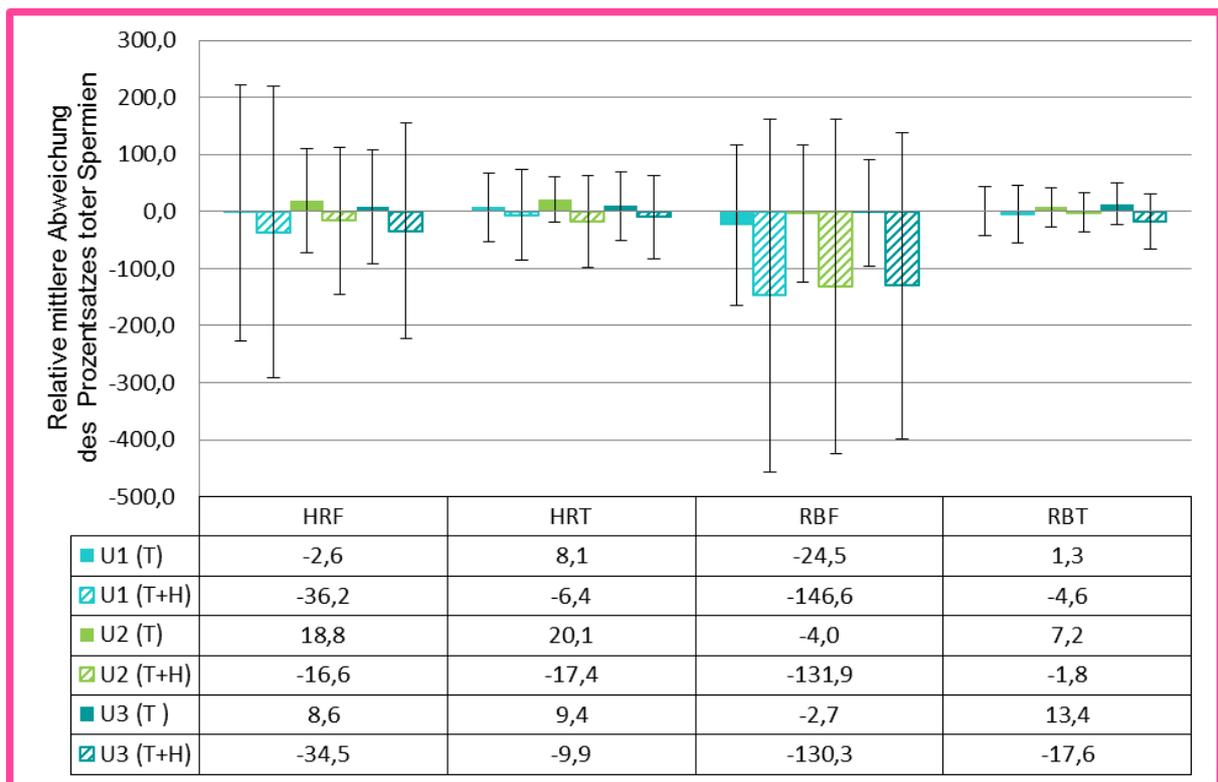
**Tabelle 4.17** Differenzen des Prozentsatzes toter Spermien (MW  $\pm$  SD) zwischen den drei Vitalfärbungen und dem NucleoCounter® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

	<b>HRF</b>	<b>HRT</b>	<b>RBF</b>	<b>RBT</b>
<b>E (T)</b>	2,9 $\pm$ 6,9	6,4 $\pm$ 8,5	0,8 $\pm$ 9,1	3,9 $\pm$ 7,0
<b>E (T+H)</b>	-0,7 $\pm$ 7,9	-2,7 $\pm$ 13,5	-22,3 $\pm$ 13,1	-3,0 $\pm$ 7,9
<b>EN (T)</b>	7,0 $\pm$ 6,3	21,4 $\pm$ 7,5	10,6 $\pm$ 9,0	24,8 $\pm$ 5,1
<b>EN (T+H)</b>	6,3 $\pm$ 6,6	20,8 $\pm$ 7,7	1,1 $\pm$ 8,7	11,5 $\pm$ 4,5
<b>BN (T)</b>	7,2 $\pm$ 6,8	13,2 $\pm$ 7,0	9,4 $\pm$ 8,4	20,3 $\pm$ 4,5
<b>BN (T+H)</b>	6,2 $\pm$ 7,0	10,8 $\pm$ 6,7	0,7 $\pm$ 10,2	9,7 $\pm$ 4,7

#### 4.3.2 Einfluss des Untersuchers

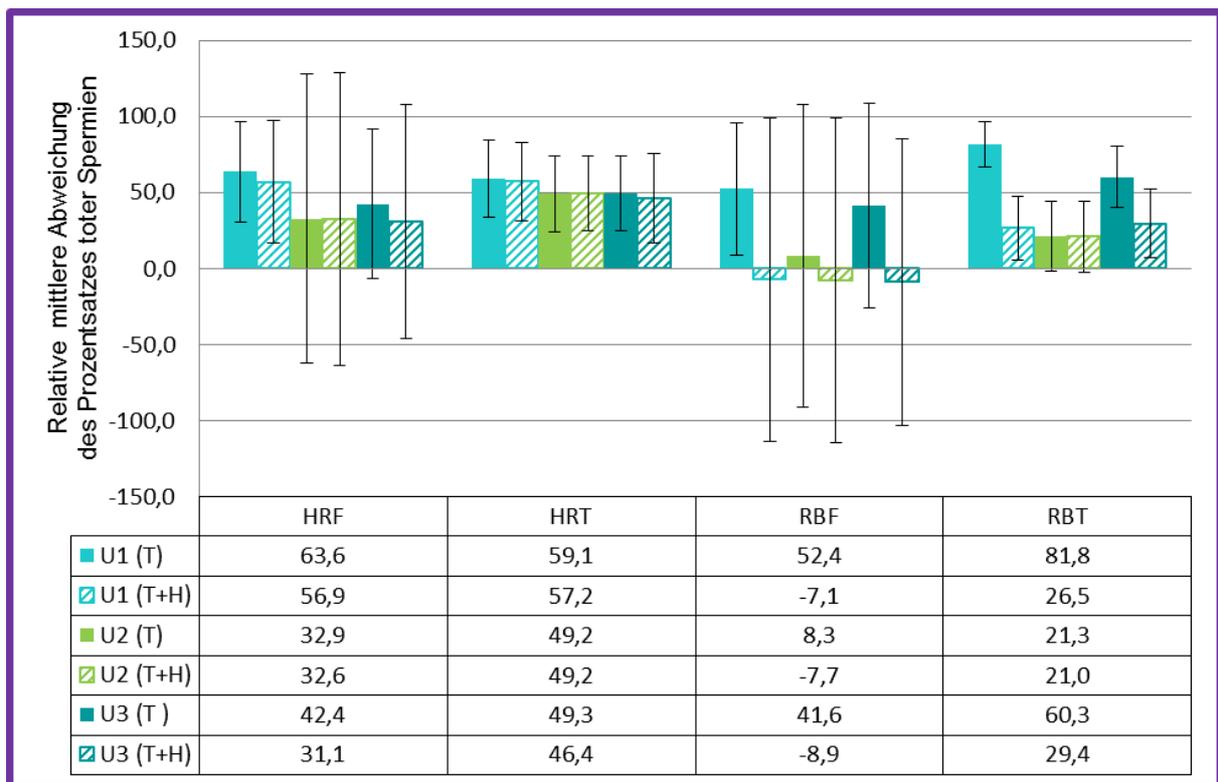
Für den Vergleich der Ergebnisse eines jeden Untersuchers zwischen dem NucleoCounter® und den Vitalfärbungen wurde ebenfalls der Bland-Altman-Plot verwendet. Hierzu wurde aus den Ergebnissen von X-a und X-b eines jeden Untersuchers der Mittelwert gebildet. Der NucleoCounter® wurde als Goldstandard gewertet. Die relativen mittleren Abweichungen werden in Prozent angegeben und sind grafisch in Abbildung 4.18–4.20 dargestellt. Die dazugehörigen Bland-Altman-Plots sind in den Abbildungen 11.25-11.96 im Anhang zu finden.

Bei der E-Färbung (T) sind die Differenzen der relativen mittleren Abweichungen zum NC zwischen den Untersuchern bei HRT und RBT (12% bzw. 12,1%) kleiner als bei HRF und RBF (21,6% bzw. 21,8%). Bei der E-Färbung (T+H) liegen die Differenzen der Abweichung zwischen 11% und 19,6%. Bei allen Untersuchern liegen die Werte der E-Färbung (T+H) im Mittel über denen des NC in allen Gruppen. Insgesamt lässt sich keine einheitliche Tendenz erkennen, dass ein Untersucher immer näher am NC liegt als die anderen beiden.



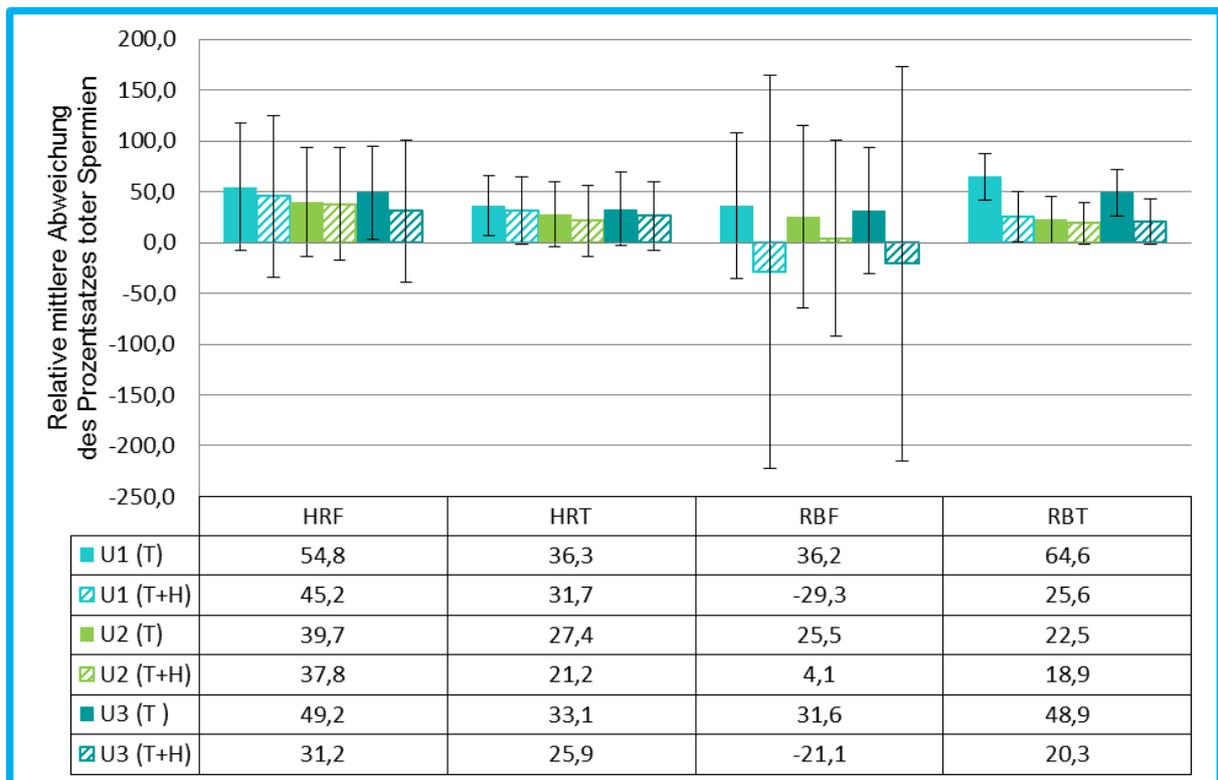
**Abbildung 4.18** Eosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

Bei dem Vergleich der Differenzen der Abweichung zwischen T und T+H bei der EN-Färbung fällt auf, dass die Differenzen zwischen den Untersuchern bei HRF, RBF und RBT mit den halbgefärbten Spermien (1,8%-25,8%) immer kleiner sind als ohne die halbgefärbten Spermien (30,7%-60,5%). Untersucher 1 weist mit der EN-Färbung bei allen Gruppen meist die größte Abweichung zum NC auf. Untersucher 2 zeigt bei allen Gruppen ohne halbgefärbte Spermien immer die größte Übereinstimmung zum NC.



**Abbildung 4.19** Eosin-Nigrosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

Die Differenzen der mittleren Abweichung zwischen den Untersuchern bei der BN-Färbung (T und T+H) sind in den beiden Gruppen des Rüden ähnlich (8,9%-15,1%). In der Gruppe RBF wird die Differenz durch die halbgefärbten Spermien größer (10,7% bzw. 33,4%), in der Gruppe RBT kleiner (42,1% bzw. 6,7%). Bei allen Gruppen weist Untersucher 1 mit der BN-Färbung (T und T+H) die größte Abweichung zum NC auf. Die Abweichung der BN-Färbung wird bei jedem Untersucher und in jeder Gruppe kleiner, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet werden.



**Abbildung 4.20** Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

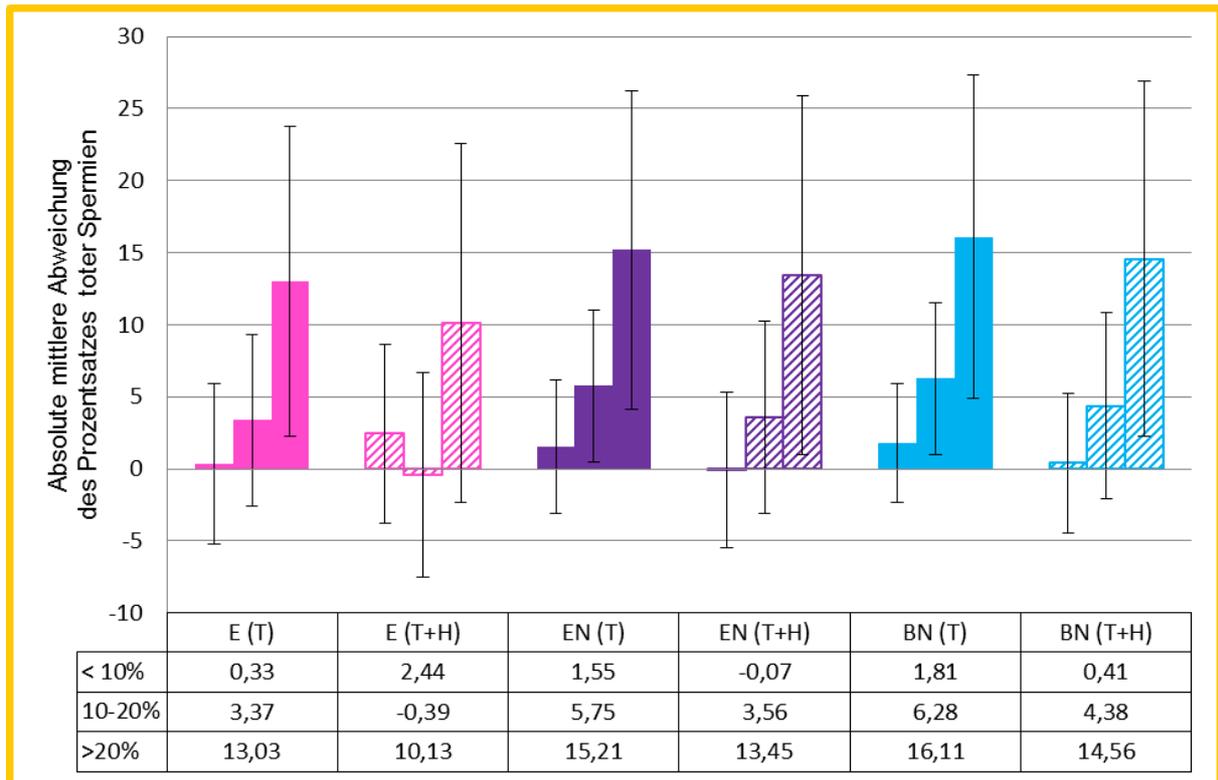
### 4.3.3 Abhängigkeit der Ergebnisse von der Qualität der Probe

Bei Betrachtung der Bland-Altman-Plots aus Abschnitt 4.3.1 fällt eine Abhängigkeit der relativen Differenzen zwischen dem NucleoCounter<sup>®</sup> und den Färbungen von dem Prozentsatz an toten Spermien auf. Daher werden in diesem Abschnitt die Differenzen zwischen NC und Vitalfärbungen nochmals durch die absolute mittlere Abweichung  $\pm$  SD zwischen NC und Färbungen für jede Gruppe gesondert dargestellt, indem die Proben jeder Gruppe entsprechend der Verteilung der Probenwerte in drei Probenklassen eingeteilt wurden. Die Anzahl der Proben in jeder Probenklasse ist in Klammern notiert.

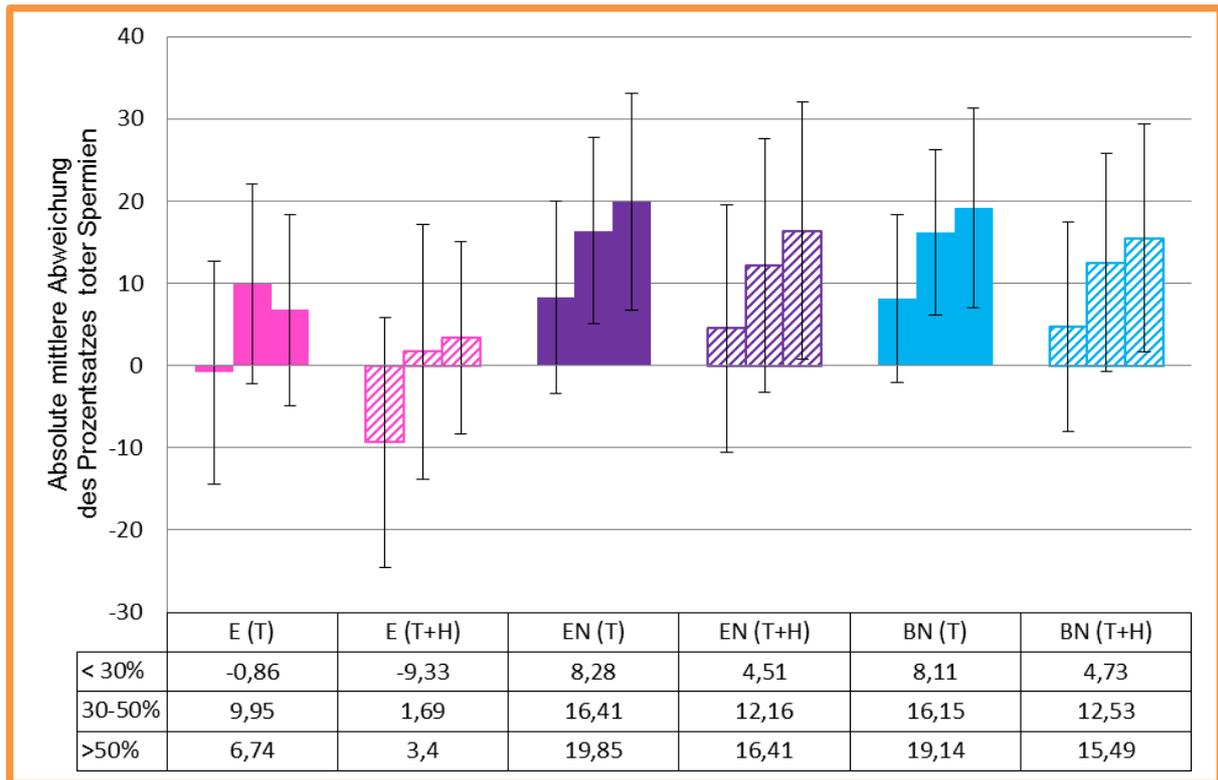
▪ HRF:	<10% (13)	10-20% (21)	>20% (6)
▪ HRT:	<30% (8)	30-50% (22)	>50% (10)
▪ RBF:	<10% (6)	10-30% (19)	>30% (15)
▪ RBT:	<40% (13)	40-50% (17)	>50% (10)

Die absoluten mittleren Abweichungen der Färbungen zum NC in den einzelnen Probenklassen sind grafisch in den Abbildungen 4.21-4.24 dargestellt.

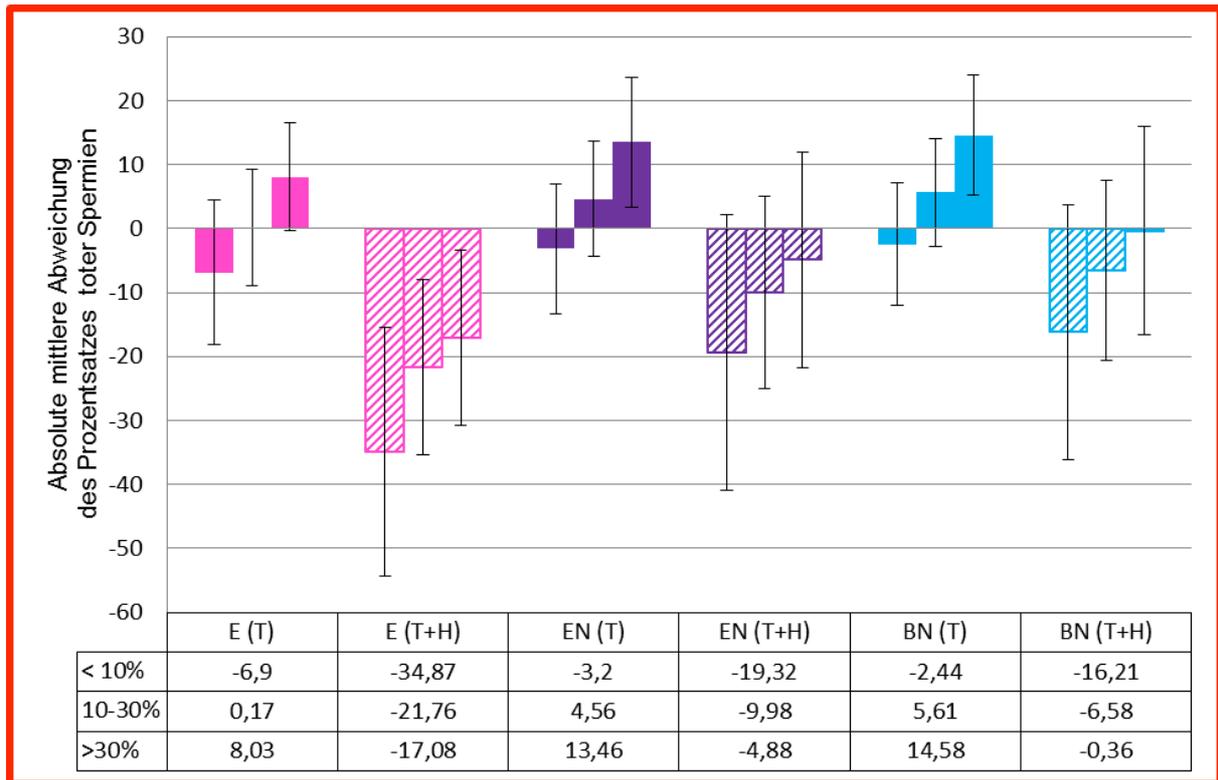
Die EN- und BN-Färbung verhalten sich gleich. In den Gruppen HRF, HRT und RBT ist die absolute mittlere Abweichung (MA) immer kleiner, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gerechnet werden. Je kleiner der Prozentsatz toter Spermien in der Probe ist, desto geringer fällt auch die MA aus. In der Gruppe RBF dagegen ist die MA bei beiden Färbungen <30% tote Spermien ohne halbgefärbte Spermien und >30% tote Spermien mit halbgefärbten Spermien kleiner. Die MA steigt (T) bzw. fällt (T+H) mit einem erhöhtem Anteil toter Spermien in der Probe. Die E-Färbung variiert von Gruppe zu Gruppe und von Probenklasse zu Probenklasse in ihrem Verhalten.



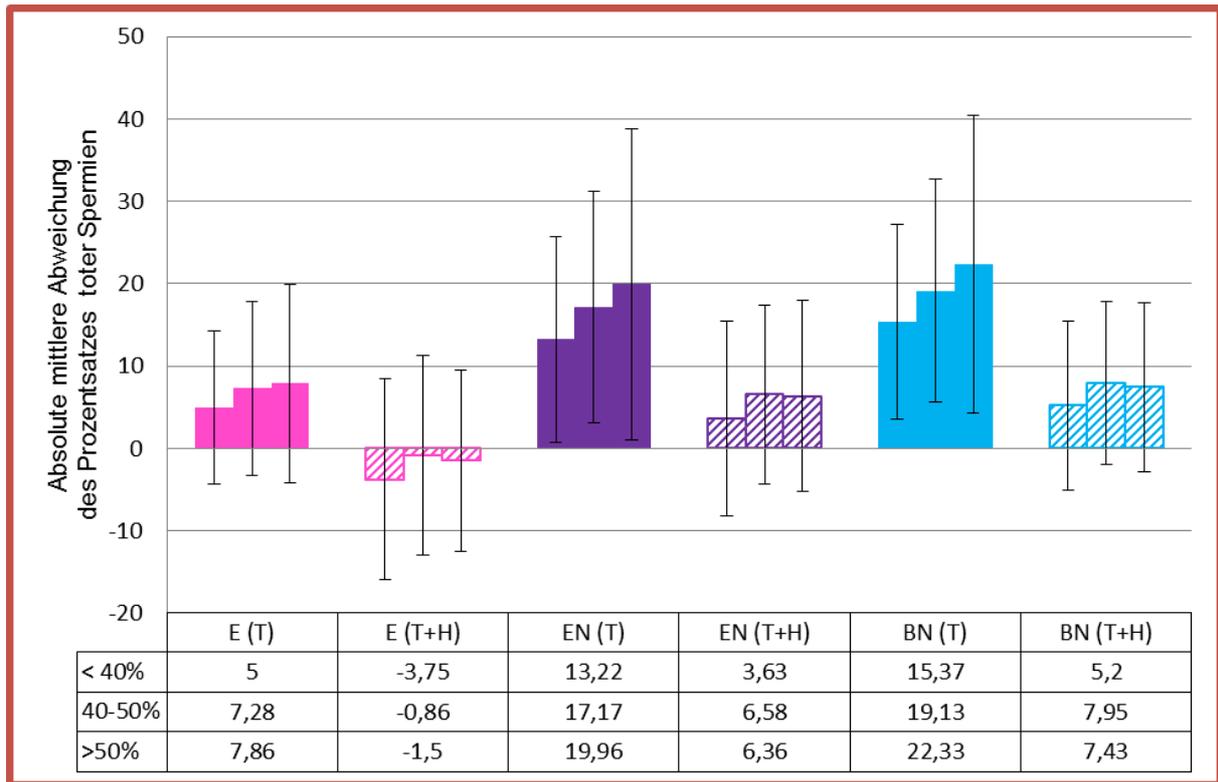
**Abbildung 4.21** Rüde Frischsperma: Absolute mittlere Abweichung (MW  $\pm$  SD) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.22** Rüde Tiefgefriersperma: Absolute mittlere Abweichung ( $MW \pm SD$ ) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.23** Bulle Frischsperma: Absolute mittlere Abweichung ( $MW \pm SD$ ) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien



**Abbildung 4.24** Bulle Tiefgefriersperma: Absolute mittlere Abweichung ( $MW \pm SD$ ) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien

## 5 Diskussion

Bereits seit mehreren Jahrzehnten sind Vitalfärbungen zur subjektiven Unterscheidung von lebenden und toten Spermien bei der herkömmlichen Spermauntersuchung im Einsatz. Sie werden jedoch zunehmend von neuen Verfahren abgelöst, die den individuellen Einfluss des Untersuchers eliminieren und einen größeren Probendurchsatz erlauben. Ein Beispiel hierfür stellt der NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) dar. Dieses Gerät besitzt ein integriertes Fluoreszenzmikroskop das mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid arbeitet. Durch zwei getrennte Messungen kann sowohl die Anzahl toter Spermien (Vitalität) als auch die Spermienkonzentration (Dichte) nach Zugabe eines Lysispuffers bestimmt werden. Zum Vergleich dieser beiden Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit Proben von Frischsperma und Tiefgefriersperma des Rüden und Bullen eingesetzt (4 Gruppen). Als Vitalfärbungen kamen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin zum Einsatz.

### 5.1 Diskussion der Methode

#### 5.1.1 Proben

Durch die Verwendung von Proben zweier Tierarten mit unterschiedlicher physiologischer Spermienkonzentration und dem Einsatz von Tiefgefrierspermaproben mit unterschiedlichen Anteilen an toten Spermien wurde in Bezug auf die Dichte und die Vitalität eine große Variationsbreite abgedeckt. In anderen Studien wurden dagegen Anteile an toten Spermien hinzugegeben, um eine schlechtere Spermaqualität zu simulieren (BRINSKO et al., 2003; MERKIES et al., 2000; MORRELL et al., 2010).

#### 5.1.2 NucleoCounter SP-100<sup>®</sup>

Die Messungen mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> wurden innerhalb jeder Gruppe durch denselben Untersucher durchgeführt. Zwischen den Gruppen wurde der NucleoCounter<sup>®</sup> durch verschiedene Untersucher bedient. SHAH et al. (2006)

konnten in Ihrer Studie mit Zellkulturen ähnliche Variationskoeffizienten für die wiederholte Bedienung des NucleoCounters® durch denselben Untersucher (Dichte 4,5%, Vitalität 3%) und für die Bedienung zwischen zwei Untersuchern (Dichte 3,5%, Vitalität 8%) feststellen. Ebenfalls zeigte sich kein Untersuchereinfluss in der Studie von EGEBERG et al. (2013) bei Messungen mit humanen Proben. Daher ist anzunehmen, dass dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse genommen hat.

Bei den Tiefgefrierproben des Rüden wurde CaniPlus Freeze (Minitüb, Tiefenbach) als Verdünner eingesetzt. Die Tiefgefrierproben des Bullen waren mit Triladyl (Minitüb, Tiefenbach) verdünnt. Nach COMERFORD (2009) kann es bei Messungen mit Hengstsperma Schwankungen der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Verdünnerart geben (Variationskoeffizienten von 2,33% - 4,96%). Bei der Verwendung eines Milchverdünners kam es mit dem NucleoCounter® sogar zu einer Überschätzung des Anteils toter Spermien im Vergleich zum Flowzytometer. Offenbar kann es vorkommen, dass der NucleoCounter® auch andere in der Probe enthaltene Zellen oder Partikel erfasst. Deshalb sollte bei einem Einsatz dieses Gerätes vorher eine subjektive Beurteilung der Spermaqualität erfolgen, um hochgradig veränderte Proben auszuschließen.

Für die Verdünnung der Spermaprobe mit dem Lysispuffer zur Dichtebestimmung bzw. mit PBS zur Vitalitätsbestimmung empfiehlt der Hersteller verschiedene Verdünnungstabellen je nach Tierart und der zu erwartenden Spermienkonzentration. In dieser Arbeit wurde bei beiden Tierarten und beiden Spermaarten durchgängig mit der Verdünnung „101“ gearbeitet. Das bedeutet, dass jeweils 10µl Probe mit 1ml Reagens verdünnt wurden. Für Proben des Rüden entspricht dies der vorgegebenen Tabelle, die Frischsamen-Proben des Bullen wurden dadurch oftmals außerhalb des idealen Rahmens gemessen. Bei dem Vorliegen einer zu hohen Spermienkonzentration und der Zunahme der Gefahr von Messfehlern gibt das Gerät eine entsprechende Fehlermeldung. Bei zwei Proben musste die Messung mit der doppelten Verdünnung wiederholt werden.

Chemometec liefert zur Verdünnung der Proben mit dem S-100 Lysispuffer einen Dispenser mit. Statt diesem wurde in der vorliegenden Arbeit eine geeichte Pipette verwendet, um 1ml Reagent in das Reaktionsgefäß zu verbringen. COMERFORD

(2006) konnte bei Überprüfung des Dispensers Ungenauigkeiten bei der Abmessung von 1, 4, 10 und 20ml feststellen.

Nach der Verdünnung wurde jede Probe durch mehrmaliges Wenden des Reaktionsgefäßes sorgfältig gemischt. Eine gute Durchmischung sieht COMERFORD (2006) als unbedingt notwendig an, da der Variationskoeffizient bei der Konzentrationsmessung mit Frischsperma des Hengstes ohne Schwenken (15,47%) deutlich höher war als bei geschwenkten Proben (3,92%).

### 5.1.3 Vitalfärbungen

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> verglichen. Alle drei Färbungen wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich bei beiden untersuchten Spezies (Frisch- und Tiefgefriersperma) verwendet.

Die Zusammensetzung der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung entsprach den Empfehlungen von BONADONNA (1954), GEISLER (1990) und RAUHAUS (1990). Die Herstellung der Eosin- und Eosin-Nigrosin-Färbung wurde nach der Empfehlung des Lehrbuches „Physiologie, Pathophysiologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung“ (Hoffmann, 2003) und den Angaben des „WHO Laborhandbuches zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates“ (WHO, 2010) durchgeführt.

Bei der Anfertigung der Eosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche wurde kritisch auf die Färbedauer geachtet und das Ausstreichen erfolgte innerhalb 20 Sekunden nach dem Mischen von Farbstoff und Spermaprobe. Für die Eosin-Nigrosin-Färbung wurden die 30 Sekunden Inkubationszeit laut WHO eingehalten. In der Vergangenheit gab es mehrere Beobachtungen, nach denen sich der Prozentsatz toter Spermien in Abhängigkeit von der Färbezeit verändern kann (BAMBA, 1988; CAMPBELL et al., 1956; GEISLER, 1990; WALES, 1959). Bei dem Einsatz von Vitalfärbungen kann eine Vielzahl an Faktoren Einfluss auf das Ergebnis haben. Protokolle für Eosin-haltige Färbungen differieren zum Beispiel in Bezug auf ihre Eosin-Art, Eosin-Konzentration, Färbedauer, Verdünnung und osmotischen Bedingungen (BJÖRNDAHL et al., 2004). BJÖRNDAHL et al. (2004) konnten nachweisen, dass das Eosin-Nigrosin-Protokoll laut WHO für humanes Sperma nicht

auf einer ausreichenden Validierung beruht, da die Protokolle im Laufe der verschiedenen Ausgaben des Handbuchs Abweichungen aufweisen in Bezug auf ihre angegebenen Quellen. Dies erschwert einen Vergleich einzelner Studien untereinander. Bei tiefgefrorenen Proben kommt hinzu, dass verschiedene Verdüner zum Einsatz kommen. So vermutet GEISLER (1990), dass bei der Tiefgefrierkonservierung die Anfärbung der Spermien durch Komponenten im Verdüner oder dessen chemisch-physikalischen Eigenschaften beeinflusst wird.

Die Färbelösungen wurden während der Versuchszeit verschlossen in dunklen Glasbehältern bei Zimmertemperatur gelagert und einmal jährlich filtriert. Es gab keine bemerkenswerten Veränderungen über die Zeit. Diese Beobachtung stimmt mit den Angaben aus der Literatur (HACKETT & MACPHERSON, 1965; PLÖTHNER, 1954; SWANSON & BEARDEN, 1951) überein. Für die Auswertung der Ausstriche wurden jeweils 200 Spermien beurteilt. Diese Anzahl entspricht der Empfehlung der Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2010).

Das Alter der Ausstriche zum Zeitpunkt der Auswertung war in diesen Untersuchungen sehr unterschiedlich. Die Ausstriche waren in den Gruppen Rüde Frischsperma, Rüde Tiefgefriersperma, Bulle Frischsperma und Bulle Tiefgefriersperma am letzten Tag ihrer Auswertung maximal 239, 83, 232 bzw. 79 Tage alt. Aus der Literatur ist ein Problem mit nicht auswertbaren Ausstrichen nach einer gewissen Lagerungszeit bekannt. Es kann zu einer Nachfärbung von ursprünglich ungefärbten Spermien mit der Zeit kommen, so dass eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Spermien nicht mehr möglich ist. Dieses Phänomen ist bislang beim Bullen mit der Eosin-Färbung (ÖNCÜL, 1956) und der Eosin-Nigrosin-Färbung (BUTTLE et al., 1965) beschrieben. GEISLER (1990) dagegen konnte über einen Zeitraum von 6 Monaten keine Nachfärbungen bei Bulle und Rüde mit der Eosin-Nigrosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung feststellen. Zur Kontrolle dieses Phänomens wurden wiederholte Auswertungen der gleichen Ausstriche von einem Untersucher über den Zeitraum von drei Monaten einmal wöchentlich durchgeführt. Dabei waren alle Ausstriche zu jeder Zeit auswertbar. Nur mit der BN-Färbung (T) in der Gruppe HRF und mit der E-Färbung (T+H) in der Gruppe RBT war ein leichter, aber signifikanter Anstieg des Prozentsatzes toter Spermien ersichtlich. Trotzdem wurde in dieser Studie bei einigen Ausstrichen mit

der Eosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung in den Tiefgefriersperma-Gruppen beider Tierarten ein Anteil von 100% gefärbten Spermien zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet. Diese Ausstriche wurden für die Berechnung der Ergebnisse nicht herangezogen. In der Vergangenheit wurden die Zusammensetzung der Farbstofflösung, die Ausstrichdicke, die Luftfeuchte, die Raumtemperatur und die Lichteinwirkung für diese Nachfärbungen verantwortlich gemacht (ÖNCÜL, 1956). BJÖRNDAHL et al. (2004) geben zu bedenken, dass Komponenten des Seminalplasmas gerade bei der Eosin-Färbung an Eosin binden und dadurch die freie Konzentration des Eosins reduzieren können. Daraus könnten Probenvariationen mit verschiedenen kritischen Eosin-Konzentrationen resultieren und zur nachträglichen Diffusion des Farbstoffes führen (EMMENS & BLACKSHAW, 1956). In der vorliegenden Arbeit sind keine Hinweise ersichtlich, die auf eine spezifische Ursache schließen lassen, sodass es sich um ein individuelles Geschehen handeln muss. Eine zeitnahe Auswertung von vitalgefärbten Ausstrichen mit Eosin und Bromphenolblau-Nigrosin ist deshalb anzuraten.

Bei der Beurteilung von vitalgefärbten Ausstrichen ist aus der Literatur bereits das Vorkommen von halbgefärbten Spermien bekannt (BARTMANN, 1959; BOGUTH & MÜLLER, 1951; CAMPBELL et al., 1956; GEISLER, 1990; MAYER et al., 1951; ÖNCÜL, 1956; SCHERK, 1963; SUTTIYOTIN & THWAITES, 1991; SWANSON & BEARDEN, 1951). Dennoch besteht bisher keine Einigkeit darüber, ob die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil lebender (BARTMANN, 1959; BJÖRNDAHL et al., 2004; KLIMOWICZ-BODYS et al., 2012; ÖNCÜL, 1956; RAUHAUS, 1990) oder toter (BOGUTH & MÜLLER, 1951; BRITO et al., 2003; GRAHAM et al., 1990; PINTADO et al., 2000) Spermien zu rechnen ist. Es existieren verschiedene Erklärungen für diese Entscheidung. BARTMAN (1959) nimmt an, dass halbgefärbte Spermien in ihrer Lebensfähigkeit geschwächte Spermien darstellen. Im Handbuch der WHO (2010) wird von einer undichten Nackenmembran gesprochen, die zu einer Teilfärbung führt. BRITO et al. (2003) dagegen argumentieren, dass die Diffusion des Farbstoffes nur durch den engen Kontakt zwischen der Plasmamembran und des Akrosoms in der Äquatorialregion verhindert wird. Auch bei Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumiodid wurden nur leicht angefärbte Spermien beobachtet (GARNER et al., 1986). Aufgrund dieser Unklarheiten wurden die halbgefärbten Spermien in dieser Arbeit als gesonderte Kategorie erfasst und eine

zweifache Auswertung vorgenommen, so dass die halbgefärbten Spermien einmal zum Anteil lebender (T) und einmal zum Anteil toter Spermien (T+H) gerechnet wurden.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 NucleoCounter SP-100®

Der NucleoCounter® wurde bisher für Studien zur Anwendung beim Bullen (ANZAR et al., 2009), Hengst (COMERFORD, 2009; FOSTER, 2009; MORELL et al., 2010), Eber (CAMUS et al., 2011; HANSEN et al., 2006), Forelle (NYNCA & CIERESZKO, 2009), Mann (EGEBERG et al., 2013) und bei Zellkulturen (SHAH et al., 2006) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden Spermaproben von Bullen und Rüden untersucht, so dass es sich um die erste Veröffentlichung zum Einsatz beim Rüden handelt.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem NucleoCounter® wurden jeweils bei 10 Proben jeder Versuchsgruppe die Konzentrations- und Vitalitätsmessung zweimal durchgeführt. Es ergaben sich Variationskoeffizienten für die Dichte von 3,19% – 8,32% und für die Vitalität von 4,14% – 9,17%. Für die Messung der Spermienkonzentration findet man ähnliche Angaben bei anderen Tierarten. So geben HANSEN et al. (2006) einen Variationskoeffizienten von 3,1% bei Eberproben und ANZAR et al. (2009) eine mittlere Abweichung von 4% bei Bullenproben (Frischsperma) an. COMERFORD (2009) berichtet über Variationskoeffizienten von 1,46% für Verdünnungen mit NaCl und von 2,78% für Verdünnungen mit Seminalplasma bei Frischsamenproben, sowie von 3,17% für Tiefgefrierproben beim Hengst. MORELL et al. (2010) wiesen eine geringe Abhängigkeit der Ergebnisse von der Probenkonzentration nach. Für die Vitalitätsmessungen beim Hengst ergaben sich in derselben Untersuchung etwas größere Unterschiede (4,37% und 19,05%) in Bezug auf die Qualität der Probe. Eine gute Übereinstimmung zwischen NucleoCounter® und Flowzytometer konnten FOSTER et al. (2011) bei Hengstsamen und ANZAR et al. (2009) bei Tiefgefriersperma des Bullen beobachten. Ein Einfluss eines Verdünners konnte bei Proben von Rüden und Bullen in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Ob eine Abhängigkeit in Bezug auf die Dichte der Probe besteht, wurde nicht überprüft. Der

Einsatz des NucleoCounters® kann aufgrund dieser Ergebnisse für alle vier Probengruppen empfohlen werden.

### 5.2.2 Vitalfärbungen

Vitalfärbungen bieten in der Praxis den Vorteil, dass sie mit einfachen Mitteln schnell und kostengünstig durchführbar sind. Dennoch hat die Anwendung auch ihre Grenzen, da das Ergebnis auf der subjektiven Beurteilung eines Untersuchers beruht und nur wenige Spermien ausgewertet werden (JOHANSSON et al., 2008). Hinzukommen viele Einflussfaktoren wie Farbstoffart, Farbstoffkonzentration und Färbezeit (BJÖRNDAHL et al., 2003).

Der Vergleich zwischen den Vitalfärbungen ergab, dass im Mittel mit der Eosin-Färbung immer die meisten gefärbten Spermien gezählt wurden. Als mögliche Begründung für den höheren Prozentsatz an toten Spermien mit der E-Färbung ist anzuführen, dass es zum Übersehen von lebenden Spermien kommen kann, da sich ungefärbte Spermien aufgrund einer fehlenden Kontrastfarbe nur schwer erkennen lassen.

Die Eosin-Nigrosin- und Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung erbrachten ähnliche Ergebnisse, nur in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma kam es mit der BN-Färbung im Mittel zu einem höheren Prozentsatz gefärbter Spermien von ca. 7-9%. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von OLIVEIRA et al. (2009) und GEISLER (1990) überein, die zwischen der EN- und BN-Färbung bei Frisch- und Tiefgefrier-Proben des Ziegenbocks bzw. des Bullen und Rüden ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede finden konnten.

Bei dem Vergleich der Mittelwerte der drei Untersucher mit jeder Färbung schnitt die Eosin-Färbung am besten ab, unabhängig davon, ob die halbgefärbten Spermien als lebend oder tot gewertet wurden. Bei den anderen beiden Färbungen war in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma der Untersuchereinfluss dann gering, wenn die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet wurden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit mit Variationskoeffizienten von 5,2% - 32,1% sehr unterschiedliche Werte für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhoben werden. Als mögliche Gründe kommen ein schlechter Kontrast zwischen den Spermien und dem Hintergrund, eine schwierige Differenzierung zwischen lebenden und toten Spermien, eine Auswertung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und an unterschiedlichen Stellen des Ausstriches in Betracht. Auch hier konnten vor allem in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma (RBT) die Variationskoeffizienten aller Färbungen deutlich gesenkt werden, wenn die halbgefärbten Spermien als tot gewertet wurden.

Die zweifache Auswertung desselben Ausstriches ergab im Mittel einen kleineren Variationskoeffizient als die Auszählung zweier verschiedene Ausstriche derselben Probe. Die Variationskoeffizienten lagen bei der zweifachen Auswertung desselben Ausstriches zwischen 9,7% und 43%. Die Differenzen der Variationskoeffizienten zwischen den Untersuchern schwankten zwischen 0,5% und 21,5%. Die kleinsten Variationskoeffizienten waren in der Gruppe RBT und die größten in der Gruppe HRF zu beobachten. Die beste Übereinstimmung der Untersucher lag in den Gruppen HRF, HRT und RBT jeweils mit der BN-Färbung (T+H) vor. Dieses Ergebnis lässt sich auf den guten Kontrast und einfache Differenzierung der BN-Färbung zurückführen.

Die Variationskoeffizienten bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in dieser Arbeit lagen zwischen 6,5% und 56,6%. Hier ergaben sich ebenfalls die größeren Werte bei Frischspermaproben des Rüden (HRF) und die kleineren in Tiefgefrierspermaproben des Bullen (RBT). Die Differenzen der Variationskoeffizienten zwischen den Untersuchern betragen zwischen 1,9% und 40,2%. Die beste Übereinstimmung zwischen den Untersuchern wurde mit der E-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma (RBF) erzielt. Die Variationskoeffizienten waren in der Regel kleiner, wenn die halbgefärbten Spermien als tot gewertet wurden. In der Gruppe HRF wurden die höchsten Variationskoeffizienten festgestellt; da aber hier der Prozentsatz toter Spermien meist sehr niedrig war (< 15%), wäre trotz der hohen Variationskoeffizienten immer eine zutreffende Aussage über die klinische Bedeutung des Parameters Vitalität (= physiologischer Bereich) getroffen worden. In den Untersuchungen von WALES

(1959) wurden Variationskoeffizienten von 14,3% mit der Trypanblau-Färbung, 7,1% mit der Eosin-Nigrosin-Färbung und 3,9% mit der Erythrosin-Nigrosin-Färbung beobachtet. Ebenso ermittelte SCHERK (1963) einen Variationskoeffizienten von unter 3% für die Bromphenolblau-Färbung beim Eber. Eine mögliche Erklärung für die höheren Variationskoeffizienten in dieser Arbeit wäre, dass die Ausstriche zu unterschiedlichen Zeitpunkten ausgewertet wurden und es zur partiellen Nachfärbung von Spermien gekommen ist. Gegen diese Annahme spricht, dass der Kontrollversuch in dieser Arbeit dieses Phänomen nicht bestätigen konnte. Eine Verbesserung könnte vermutlich durch Auszählung einer größeren Anzahl an Spermien erreicht werden.

In Bezug auf das Vorkommen von halbgefärbten Spermien mit der Eosin-Färbung gibt es bisher keine Veröffentlichungen. In dieser Studie lag der Anteil von Präparaten, in denen halbgefärbte Spermien beobachtet wurden, zwischen 82% und 100%. Der mittlere Anteil von halbgefärbten Spermien lag zwischen 4,0% und 24,6% mit einem Maximalwert von 69% in der Gruppe RBF. Generell traten halbgefärbte Spermien häufiger beim Bullen als beim Rüden auf. Die einzige quantitative Beschreibung zum Vorkommen von halbgefärbten Spermien stammt von GEISLER (1990) mit einem mittleren Anteil von 1,2% bei Proben von Rüden und Bullen bei Einsatz der EN- und BN-Färbung.

### **5.2.3 Vergleich der Vitalfärbungen mit dem NucleoCounter®**

Es wurde zunächst der Anteil an Proben errechnet, bei denen der durch die Vitalfärbungen bestimmte Prozentsatz toter Spermien niedriger war als bei Verwendung des NucleoCounters®. Mit der EN- und BN-Färbung wurde in fast allen Proben (89-100%) ein niedrigerer Anteil toter Spermien durch die Vitalfärbungen bestimmt, bei der E-Färbung lag dieser Anteil zwischen 64-77%. Wurden die halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien gewertet, so war das Vorkommen einer „Unterschätzung“ deutlich niedriger (E: 5-55%, EN: 64-100%, BN: 65-93%). In den Untersuchungen von JOHANSSON et al. (2008) wurde mit der EN-Färbung bei Frischsperma des Hengstes in 97,1% der Fälle niedrigere Werte als mit dem NucleoCounter® beobachtet. Dieses Ergebnis ist mit den hier erzielten Werten vergleichbar.

Der relative mittlere Unterschied in Bezug auf den Prozentsatz toter Spermien zwischen den Methoden sollte eine Abhängigkeit von der Qualität der Probe erkennen lassen. Bei den Rüdenproben (Frischsperma- und Tiefgefriersperma) lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem NucleoCounter<sup>®</sup> und der Eosin-Färbung (T und T+H) vor; auch bei den Bullenproben (Frischsperma) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem NucleoCounter<sup>®</sup> und den Ergebnissen mit der E-Färbung (T), EN-Färbung (T+H) und BN-Färbung (T+H). Die Abweichung der BN-Färbung (T und T+H) zum NucleoCounter<sup>®</sup> in den Tiefgefriersperma-Gruppen beider Tierarten war signifikant geringer als die der EN-Färbung, so dass die BN-Färbung hier der EN-Färbung überlegen war.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten wird dadurch erschwert, dass dort zumeist die absoluten mittleren Unterschiede eruiert wurden. JOHANSSON et al. (2008) und FOSTER et al. (2011) berichten, dass die EN-Färbung bei Frischsperma des Hengstes im Mittel einen um 12,5% bzw. 8% niedrigeren Anteil toter Spermien erbringt als der NucleoCounter<sup>®</sup>. Die Validität bei Berechnung einer Korrelation für einen Methodenvergleich wird bezweifelt (ALTMAN & BLAND, 1983), da eine positive Korrelation nicht zwingend bedeutet, dass vergleichbare Ergebnisse vorliegen (PINTADO et al., 2000).

Methodenvergleiche zwischen Vitalfärbungen und Propidiumiodid oder anderen Fluoreszenzfärbungen im Flowzytometer oder Fluoreszenzmikroskop ergaben ebenfalls, dass die Eosin-Nigrosin-Färbung beim Bullen (BRITO et al., 2003; PINTADO et al., 2000), Hengst (MERKIES et al., 2000), Eber (PINTADO et al., 2000) und Geflügel (CHALAH und BRILLARD, 1998) und die Trypanblau-Färbung beim Bullen (BRITO et al., 2003) zu einer Unterschätzung des Anteils toter Spermien führte.

Die Überschätzung des Prozentsatzes toter Spermien durch den NucleoCounter<sup>®</sup> könnte laut COMERFORD (2009) durch somatische Zellen in den Proben, die Propidiumiodid aufgenommen und von dem NucleoCounter<sup>®</sup> fälschlicherweise als Spermien gewertet werden, bedingt sein. Dem widersprechen NYNCA und CIERESZKO (2009), deren Meinung nach der NucleoCounter<sup>®</sup> fähig ist, somatische Zellkerne von den haploiden Zellkernen der Spermien zu unterscheiden. MERKIES

et al. (2000) konnten vor allem bei Tiefgefrierproben im Vergleich zu Frischsamenproben größere Schwankungen von 21-38% zwischen der EN-Färbung und der SYBR-14/PI-Färbung mittels Flowzytometer und Fluoreszenzmikroskop beim Hengst feststellen und führten diese Diskrepanz auf das Vorhandensein von Glycerin und Milchpartikeln in den Tiefgefrierproben zurück. In der vorliegenden Arbeit führten aber Messungen von Tiefgefrierproben nicht regelmäßig zu einer größeren Differenz im Vergleich zu Frischsamenproben. FOSTER et al. (2011) geben als mögliche Erklärung an, dass tote Spermien eine saure Färbung (Eosin) leichter ausschließen als basische (PI). Dass das Molekulargewicht des Farbstoffes ursächlich ist, halten BRITO et al. (2003) für unwahrscheinlich, da Eosin und Propidiumiodid sich ähnlich sind. Als Nachteil des NucleoCounters<sup>®</sup> ist nach FOSTER et al. (2011) die Notwendigkeit einer zweifachen Messung zu nennen, da die Berechnung des Prozentsatzes toter Spermien auf einer Konzentrationsmessung beruht und dadurch die Variabilität durch ungenaues Pipettieren oder Mischen steigen kann. Aus eigener Sicht könnte die Vielseitigkeit an Membranschäden und eine unterschiedliche Sensitivität der Farbstoffe für die Differenzen der Ergebnisse verantwortlich sein.

Die Berechnung der absoluten mittleren Abweichung für drei Probenklassen mit unterschiedlichen Anteilen an toten Spermien ergab eine eindeutige Abhängigkeit der Ergebnisse von der „Qualität“ der Samenproben, d.h., in Proben mit höheren Anteilen toter Spermien waren die absoluten Abweichungen höher. In anderen Studien konnte bestätigt werden, dass die Unterschiede der Ergebnisse der beiden Methoden mit steigendem Anteil toter Spermien in der Probe größer werden (FOSTER et al., 2011; KLIMOWICZ-BODYS et al., 2012; PINTADO et al., 2000). Auch das ist ein Grund für die Forderung, Messungen des Prozentsatzes toter Spermien in einer Spermaprobe immer mit der Motilitätsbestimmung zu kombinieren.

Zusammenfassend kann aus diesen Untersuchungen gefolgert werden, dass der NucleoCounter<sup>®</sup> mit hinreichender Genauigkeit Ergebnisse zur Spermienkonzentration und Anteil toter Spermien bei Frisch- und Tiefgefrierspermaproben von Rüden und Bullen liefert. Der Einsatz der Vitalfärbungen führte dagegen zu einer geringen Reproduzierbarkeit der Auswertungen. Im Vergleich hierzu kann der Einfluss verschiedener Untersucher vernachlässigt werden. Zum Großteil lag der Prozentsatz toter Spermien, der mit den

Vitalfärbungen erfasst wurde, niedriger als der des NucleoCounters®. Durch Einberechnung der halbgefärbten Spermien zu dem Anteil toter Spermien konnte diese Differenz verringert werden oder führte dann, insbesondere in der Gruppe Bulle Frischsperma, zu einer Überschätzung. Die Übereinstimmung der beiden Methoden zur Bestimmung der Vitalität war bei Proben mit niedrigem Anteil toter Spermien besser als bei höheren Anteilen.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in dem Vergleich zwischen drei bewährten Vitalfärbungen und dem NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) zur Beurteilung des Anteils toter Spermien in einer Spermaprobe bei Rüden und Bullen. Ergänzt wurde diese Arbeit durch Untersuchungen zu dem Auftreten von halbgefärbten Spermien und nachträglicher Anfärbung der Spermien während der Lagerung der Ausstriche.

Es wurden von jeder Tierart jeweils 40 Frischsperma- und 40 Tiefgefriersperma-Proben analysiert. Die drei Vitalfärbungen Eosin (E), Eosin-Nigrosin (EN) und Bromphenolblau-Nigrosin (BN) wurden verwendet. Es wurden von jeder Probe zwei Ausstriche mit jeder Färbung angefertigt und 200 Spermien pro Ausstrich unter dem Mikroskop im Hellfeld klassifiziert. Jeder Ausstrich wurde zweimal von drei Untersuchern ausgewertet. Spermien mit einem gänzlich rot (E, EN) oder blau (BN) gefärbten Kopf wurden als „tot“ gewertet. Halbgefärbte Spermien wurden separat gezählt. Die Spermienkonzentration und die Anzahl toter Spermien wurden mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> (NC) gemessen. Der NucleoCounter<sup>®</sup> besitzt ein integriertes Fluoreszenzmikroskop und verwendet den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid. Die statistische Analyse zum Vergleich der Methoden wurde durch Verwendung des Bland-Altman-Plots und Berechnung von Variationskoeffizienten vorgenommen.

Bei Kontrolluntersuchungen der Färbeausstriche über drei Monate war bei den drei Vitalfärbungen kein klinisch relevanter Anstieg des Prozentsatzes toter Spermien mit der Zeit zu erkennen. Obwohl alle Ausstriche zum Zeitpunkt der Anfertigung auf die Tauglichkeit kontrolliert wurden, waren bei einzelnen Präparaten (Tiefgefrierspermaproben von Rüde und Bulle), die mit Eosin oder Bromphenolblau-Nigrosin gefärbt worden waren, zum Zeitpunkt der Auswertung Nachfärbungen der Spermien zu beobachten. Es wird deshalb empfohlen, Ausstriche von solchen Spermaproben zeitnah auszuwerten.

Halbgefärbte Spermien traten bei Frischsamenproben des Rüden nur in geringem Umfang auf. Dagegen kamen halbgefärbte Spermien beim Bullen in fast jedem

Ausstrich vor und machten im Mittel immer einen Prozentsatz von über 8% aus. Die E-Färbung ergab im Mittel immer den höchsten Anteil an toten Spermien, während die EN- und BN-Färbung zumeist ähnliche Ergebnisse erbrachten. Die Variationskoeffizienten der drei Vitalfärbungen in den vier Gruppen lagen zwischen 5,19% und 32,14%. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Untersuchereinfluss eher vernachlässigt werden kann.

Die E-Färbung zeigte die geringste relative Abweichung zum NucleoCounter<sup>®</sup> in allen Gruppen, wenn nur ganz gefärbte Spermien berücksichtigt wurden. Im Falle der EN- und BN-Färbung näherten sich die Ergebnisse in den meisten Fällen denen des NucleoCounters<sup>®</sup> an, wenn die halbgefärbten Spermien auch berücksichtigt wurden. Zugleich waren die Unterschiede zwischen den Untersuchern jeweils kleiner, wenn halbgefärbte Spermien zu dem Anteil toter Spermien gezählt wurden. Bei allen Färbungen war die Abweichung zum NucleoCounter<sup>®</sup> bei Proben mit niedrigeren Anteilen von toten Spermien geringer.

Grundsätzlich können die Vitalfärbungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin für die Beurteilung der Vitalität von Spermien bei Bullen und Rüden eingesetzt werden. Dabei sollten die halbgefärbten Spermien bei der E-Färbung nicht mitgewertet werden, bei der EN- und BN-Färbung dagegen schon. Der gute Kontrast im mikroskopischen Bild bei der BN-Färbung erleichtert eine einfache und schnelle Auswertung.

Die Messungen der Spermienkonzentration und der Anzahl toter Spermien mit dem NucleoCounter<sup>®</sup> waren mit guter Reproduzierbarkeit möglich. Der NucleoCounter<sup>®</sup> kann daher für den Gebrauch bei Rüden- und Bullensperma empfohlen werden.

## 7 Summary

### **Sperm membrane integrity in canine and bovine semen samples:**

#### **A comparison of vital stains (eosin, eosin-nigrosin, bromphenolblue-nigrosin) with the NucleoCounter SP-100<sup>®</sup>**

The aim of this study was to examine sperm membrane integrity in canine and bovine fresh and frozen-thawed semen samples with three different vital stains and the NucleoCounter SP-100<sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Denmark). In addition the occurrence of half-stained sperm heads and storage-related artefacts were examined.

Fresh (40) and frozen-thawed (40) canine and bovine semen samples were analyzed. Eosin (E) eosin-nigrosin (EN) and bromphenolblue-nigrosin (BN) were used as vital stains. Two smears per stain were prepared and a total of 200 sperm per slide were classified using bright field microscopy. Each slide was examined twice by three investigators. Completely red (E, EN) or blue (BN) stained spermatozoa were classified as “dead”. Half-stained sperm were counted separately. Sperm concentration and viability were determined using the NucleoCounter<sup>®</sup> (NC). The NucleoCounter<sup>®</sup> works with a built-in fluorescence microscope using propidium iodide as a fluorescence dye. Statistical analysis for comparison of results were made using Bland-Altman-Plot and coefficient of variation.

In control smears of the three staining methods stored for up to three months no clinically relevant increase of the percentage of dead spermatozoa could be observed. Although all smears were checked after preparation, in some smears of frozen-thawed canine and bovine samples stained with eosin or bromphenolblue-nigrosin, all spermatozoa were stained at the time of examination. It is therefore recommended to examine smears soon after preparation in these cases.

In fresh canine semen samples only a few half-stained spermatozoa could be observed. In contrast half-stained sperm heads could be detected in almost all slides prepared from bovine semen samples with a mean value >8%. Staining with eosin led to a higher percentage of dead sperm compared to eosin-nigrosin and

bromphenolblue-nigrosin. The coefficients of variation of the results obtained with the vital stains in fresh and frozen-thawed canine and bovine semen samples ranged from 5.2% to 32.1%. The results were not significantly influenced by the investigator.

When only completely stained sperm heads were considered, the best agreement was found between the eosin-stain and the NucleoCounter<sup>®</sup>. In case of the other staining methods, inclusion of half-stained sperm heads reduced the difference compared to the NucleoCounter<sup>®</sup>. Inclusion of half-stained sperm heads also decreased the individual influence of investigators. In general the agreement between methods was better in samples with a low percentage of dead spermatozoa.

The vital stains examined in this study can be used to determine the percentage of dead spermatozoa in canine and bovine semen samples. Half-stained sperm heads should be counted as live sperm in eosin stained smears only. The enhanced contrast in smears with bromphenolblue-nigrosin facilitates microscopic evaluation.

The NucleoCounter<sup>®</sup> allows assessment of sperm concentration and viability with a reasonable repeatability in canine and bovine semen samples.

## 8 Literaturverzeichnis

**Altman, D. G., Bland, J. M. (1983).**

Measurement in medicine: The analysis of method comparison studies. *The Statistician*, 32(3), 307-317.

**Amann, R. P., Hammerstedt, R. H. (1993).**

In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *Journal of Andrology*, 14(6), 397-406.

**Anzar, M., Kroetsch, T., Buhr, M. M. (2009).**

Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *Journal of Andrology*, 30(6), 661-668.

**Bamba, K. (1988).**

Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology*, 29(6), 1245-1251.

**Bartlett, D. J. (1962).**

Studies on dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 3(2), 190-205.

**Bartmann, G. (1959).**

Untersuchungen über Supravitalfärbungen an Bullenspermien im Vergleich zu deren Bewegungsverhalten im Nativpräparat unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Samenverdünnungen und -aufbewahrungen. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.

**Beatty, R. A. (1958).**

Nigrosin-Eosin staining of rabbit spermatozoa and the fertility of semen. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B: Biological Sciences*, 67(01), 1-31.

**Björndahl, L., Söderlund, I., Johansson, S., Mohammadieh, M., Pourian, M. R., Kvist, U. (2004).**

Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of Andrology*, 25(5), 671-678.

**Björndahl, L., Söderlund, I., Kvist, U. (2003).**

Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18(4), 813-816.

**Blackshaw, A. W. (1955).**

The evaluation of bull semen. *Veterinary Record*, 67, 363-372.

**Bland, J. M., Altman, D. G. (1986).**

Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1(8476), 307-310.

**Boguth, W., Müller, E. (1951).**

Die Bestimmung toter Spermien mittels Eosin im Bullensperma. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 58, 50-52.

**Bonadonna, T. (1954).**

Sur l'identification des spermatozoides vivants et morts de Bos Taurus par la coloration bleu de bromo-phenol et nigrosine. Recueil de Medicine veterinaire, 130, 5-13.

**Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Rigby, S. L., Love, C. C., Varner, D. D. (2003).**

Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. Theriogenology, 59(3-4), 735-742.

**Brito, L. F., Barth, A. D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. L., Kastelic, J. P. (2003).**

Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. Theriogenology, 60(8), 1539-1551.

**Buttle, H. R. L., Hancock, J. L., Purser, A. F. (1965).**

Counting dead spermatozoa in frozen semen. Animal Science, 7(01), 59-65.

**Campbell, R. C., Dott, H. M., Glover, T. D. (1956).**

Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. The Journal of Agricultural Science, 48(01), 1-8.

**Campbell, R. C., Hancock, J. L., Rothschild, L. (1953).**

Counting live and dead bull spermatozoa. Journal of Experimental Biology, 30(1), 44-49.

**Camus, A., Camugli, S., Leveque, C., Schmitt, E., Staub, C. (2011).**

Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? Theriogenology, 75(3), 577-583.

**Chalah, T., & Brillard, J. P. (1998).**

Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). Theriogenology, 50(3), 487-493.

**Christensen, P., Stenvang, J. P., & Godfrey, W. L. (2004).**

A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. Journal of Andrology, 25(2), 255-264.

**Christensen, P., Stryhn, H., Hansen, C. (2005).**

Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burkert-Turk, Thoma and Makler counting chambers. Theriogenology, 63(4), 992-1003.

**Comerford, K. L. (2009).**

Validation of a commercially available fluorescence-based instrument to evaluate stallion spermatozoal concentration and comparison to photometric systems. Master of Science, Texas A&M University.

**Correa, J. R., Zavos, P. M. (1994).**

The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42(2), 351-360.

**Cummins, J. M., Woodall, P. F. (1985).**

On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 75(1), 153-175.

**Devereux, E. D., Tanner, F. W. (1927).**

Observations on the growth of yeasts in pure nutrient solutions. *Journal of Bacteriology*, 14(5), 317-333.

**Dott, H. M., Foster, G. C. (1972).**

A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live/dead" stain. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29(3), 443-445.

**Dott, H. M., Foster, G. C. (1975).**

Preservation of differential staining of spermatozoa by formol citrate. *Journal of Reproduction and Fertility*, 45(1), 57-60.

**Dougherty, K. A., Urry, R. L., Cockett, A. T. (1977).**

Supravital staining of spermatozoa: relationship of eosin concentration to the percentage of cells staining live. *Journal of Urology*, 118(6), 1008-1009.

**Dyrendahl, I. (1954).**

Some studies of the methods of freezing bull semen. 1. The influence of different brands of glycerol on the survival of spermatozoa. *Nordisk Veterinaermedicin*, 6, 780-784.

**Egeberg, D. L., Kjaerulff, S., Hansen, C., Petersen, J. H., Glensbjerg, M., Skakkebaek, N. E., Almstrup, K. (2013).**

Image cytometer method for automated assessment of human spermatozoa concentration. *Andrology*, 1(4), 615-623.

**Eilts, B. E. (2005).**

Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 64(3), 692-697.

**Ellington, J., Scarlett, J., Meyers-Wallen, V., Mohammed, H. O., Surman, V. (1993).**

Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology*, 40(4), 725-733.

**Emik, L. O., Sidwell, G. M. (1947).**

Refining methods for using opal blue stain in evaluating ram semen. *Journal of Animal Science*, 6(1), 67-71.

**Emmens, C. W., Blackshaw, A. W. (1956).**

Artificial insemination. *Physiological Review*, 36(2), 277-306.

**England, G. C., Plummer, J. M. (1993).**

Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplements*, 47, 261-270.

**Entwistle, K. W. (1972).**

Congo red-fast green FCF as a supra-vital stain for ram and bull spermatozoa. *Australian Veterinary Journal*, 48(9), 515-519.

**Eustache, F., Jouannet, P., Auger, J. (2001).**

Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *Journal of Andrology*, 22(4), 558-567.

**Farstad, W. (2000).**

Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53(1), 175-186.

**Farstad, W. (2009).**

Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 Suppl 2, 336-341.

**Foster, M. L. (2009).**

Comparison of methods for assessing viability of equine spermatozoa and effects of seminal plasma on viability and motion characteristics of equine spermatozoa. Master of Science, Texas A&M University.

**Foster, M. L., Love, C. C., Varner, D. D., Brinsko, S. P., Hinrichs, K., Teague, S., Blanchard, T. L. (2011).**

Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology*, 76(2), 334-341.

**Fraser, C. G. (1919).**

The action of methylene blue and certain other dyes on living and dead yeast. *The Journal of Physical Chemistry*, 24(9), 741-748.

**Freshman, J. L. (2002).**

Semen collection and evaluation. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 17(3), 104-107.

**Garner, D. L., Johnson, L. A. (1995).**

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53(2), 276-284.

- Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A., Pace, M. M. (1986).**  
Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34(1), 127-138.
- Gay, F. P., Clark, A. R. (1934).**  
The differentiation of living from dead bacteria by staining reactions. *Journal of Bacteriology*, 27(2), 175-189.
- Geisler, A. (1990).**  
Prüfung von Vitalfärbungen für Spermien von Haussäugetieren. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W. M. (2005).**  
Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Graham, J. K., Kunze, E., Hammerstedt, R. H. (1990).**  
Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43(1), 55-64.
- Graham, J. K., Moce, E. (2005).**  
Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504.
- Günzel, A. R. (1986).**  
Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierärztliche Praxis*, 14(2), 275-282.
- Hackett, A. J., Macpherson, J. W. (1965).**  
Some staining procedures for spermatozoa. A review. *The Canadian Veterinary Journal*, 6(3), 55-62.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., Nolan, J. P. (1990).**  
Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73-88.
- Hancock, J. L. (1951).**  
A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature*, 167(4243), 323-324.
- Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J. P., Simmet, C., Day, B. C., Feitsma, H. (2006).**  
Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*, 66(9), 2188-2194.
- Harrison, R. A., Vickers, S. E. (1990).**  
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88(1), 343-352.

**Hoffmann, B. (2003).**

Künstliche Besamung (KB). In B. Hoffmann (Ed.), *Andrologie: Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung*. Rieden: Lehmanns Media.

**Holt, W. V., North, R. D. (1984).**

Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *The Journal of Experimental Zoology*, 230(3), 473-483.

**Hu, Y. A., Lu, J. C., Lu, N. Q., Shao, Y., Huang, Y. F. (2006).**

Comparison of four methods for sperm counting. *National journal of andrology*, 12(3), 222-224, 227.

**Iguer-Ouada, M., Verstegen, J. P. (2001).**

Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology*, 55(3), 733-749.

**Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., Zaneveld, L. J. (1984).**

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219-228.

**Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Zaneveld, L. J. (1992).**

The hypoosmotic swelling test: an update. *Archives of Andrology*, 29(2), 105-116.

**Johansson, C. S., Matsson, F. C., Lehn-Jensen, H., Nielsen, J. M., Petersen, M. M. (2008).**

Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin-nigrosin stain. *Animal Reproduction Science*, 107(3-4), 325-326.

**Johnson, J. E., Boone, W. R., Blackhurst, D. W. (1996).**

Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertility and Sterility*, 65(1), 150-155.

**Johnston, S. D. (1991).**

Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 21(3), 545-551.

**Kamar, G. A. R. (1959).**

The differentiation of live from dead sperms in fowl semen. *Biotechnic & Histochemistry*, 34(1), 5-7.

**Klimowicz-Bodys, M. D., Batkowski, F., Ochrem, A. S., Savic, M. A. (2012).**

Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast-phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. *Theriogenology*, 77(3), 628-635.

**Knaysi, G. (1935).**

A microscopic method of distinguishing dead from living bacterial cells. *Journal of Bacteriology*, 30(2), 193-206.

**Kodama, H., Kuribayashi, Y., Gagnon, C. (1996).**

Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *Journal of Andrology*, 17(2), 151-157.

**Kumi-Diaka, J. (1993).**

Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, 39(6), 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(7), 1355-1366.

**Ladha, S. (1998).**

Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *The Journal of Membrane Biology*, 165(1), 1-10.

**Lasley, J. F. (1951).**

Spermatozoan motility as a measure of semen quality. *Journal of Animal Science*, 10(1), 211-218.

**Lasley, J. F., Easley, G. T., McKenzie, F. F. (1942).**

A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa. *The Anatomical Record*, 82(2), 167-174.

**Lechniak, D., Kedzierski, A., Stanislawski, D. (2002).**

The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(6), 379-380.

**Leidl, W., Schefels, W., Stolla, R., Metzger, E. (1971).**

Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 78(4), 129-134.

**Lichtenstern, A. (1995).**

Färbeverhalten von Bullen-, Schafbock- und Eberspermien vor und nach In vitro-Kapazitation in verschiedenen Medien. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

**Mayer, D. T., Squiers, C. D., Bogart, R., Oloufa, M. M. (1951).**

The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. *Journal of Animal Science*, 10(1), 226-235.

**Mazur, P. (1985).**

Basic concepts in freezing cells. Stuttgart: Schattauer.

**Merkies, K., Chenier, T., Plante, C., Buhr, M. M. (2000).**

Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. *Theriogenology*, 54(8), 1215-1224.

**Mixner, J. P., Saroff, J. (1954).**

Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa as used with semen thawed from the frozen state<sup>1</sup>. *Journal of dairy science*, 37(9), 1094-1098.

**Moce, E., Graham, J. K. (2008).**

In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 104-118.

**Morrell, J. M., Johannisson, A., Juntilla, L., Rytty, K., Backgren, L., Dalin, A. M., Rodriguez-Martinez, H. (2010).**

Stallion sperm viability, as measured by the Nucleocounter SP-100, is affected by extender and enhanced by single layer centrifugation. *Veterinary medicine international*, 2010, 659862.

**Nynca, J., Ciereszko, A. (2009).**

Measurement of concentration and viability of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) spermatozoa using computer-aided fluorescent microscopy. *Aquaculture*, 292(3-4), 256-258.

**Oliveira, R. V. d., Nunes, J. F., Salgueiro, C. C. d. M., Cavalcante, J. M. M., Moura, A. A. d. A., Araújo, A. A. d. (2009).**

Morphologic evaluation of goat spermatozoa diluted and frozen in media based on powder coconut water or TRIS, stained by eosin-nigrosin and bromophenol blue. *Ciência Animal Brasileira*, 10(3), 862-869

**Öncül, S. (1956).**

Untersuchungen über die Vitalfärbung von Bullensperma im Rahmen des Tiefkühlverfahrens. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.

**Parks, J. E., Graham, J. K. (1992).**

Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38(2), 209-222.

**Parks, J. E., Lynch, D. V. (1992).**

Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266.

**Peña-Martinez, A. I. (2004).**

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 209-224.

**Peña, A. I., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C. (2001).**

Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 57, 371-376.

- Peña, A. I., Quintela, L. A., Herradon, P. G. (1998).**  
Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, 50(8), 1211-1220.
- Peña, F. J., Nunez-Martinez, I., Moran, J. M. (2006).**  
Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, 41 Suppl 2, 21-29.
- Peña, F. J., Rodriguez Martinez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Gonzalez Fernandez, L., Macias Garcia, B. (2009).**  
Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345-349.
- Pesch, S., Bergmann, M. (2006).**  
Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37(7), 597-612.
- Pintado, B., de la Fuente, J., Roldan, E. R. (2000).**  
Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1), 145-152.
- Plöthner, R. (1954).**  
Untersuchungen über die Vitalfärbung des Bullenspermas mit Eosin, Bromphenolblau und Erythrosin unter Berücksichtigung der morphologischen Befunde. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Prathalingam, N. S., Holt, W. W., Revell, S. G., Jones, S., Watson, P. F. (2006).**  
The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*, 27(2), 257-262.
- Rauhaus, H. (1990).**  
Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. (2005).**  
New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*, 64(3), 706-719.
- Root Kustritz, M. V. (2007).**  
The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*, 68(3), 329-337.
- Root Kustritz, M. V., Olson, P. N., Johnston, S. D., Root, T. K. (1998).**  
The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 34(4), 348-352.

**Rovan, E. (2011).**

Biochemie der Spermatozoa. In W. Busch & A. Holzmann, Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren (pp. 23-54). Stuttgart: Schattauer.

**Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A. C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Lopez-Perez, M. J. (1998).**

Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry*, 44(8 Pt 1), 1616-1620.

**Saacke, R. G., Almquist, J. O. (1964).**

Ultrastructure of bovine spermatozoa. II. The neck and tail of normal, ejaculated sperm. *American Journal of Anatomy*, 115(1), 163-183.

**Scherk, F. (1963).**

Über die Eignung des Farbstoffes Bromphenolblau zur Supravitalfärbung von Eberspermien. Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover.

**Schmollich, A., Michel, G. (1992).**

Microscopical anatomy of domestic animals. Jena, Stuttgart: Gustav Fischer.

**Schnorr, B. (1996).**

Embryology of Domestic Animals (pp. 10-13). Stuttgart: Enke.

**Schrader, S. M., Platek, S. F., Zaneveld, L. J., Perez-Pelaez, M., Jeyendran, R. S. (1986).**

Sperm viability: a comparison of analytical methods. *Andrologia*, 18(5), 530-538.

**Seaman, E. K., Goluboff, E., BarChama, N., Fisch, H. (1996).**

Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertility and Sterility*, 66(4), 662-665.

**Senger, P. L. (2003).**

Pathway to pregnancy and parturition (second ed.). Pullman, Washington: Current Conceptions, Inc.

**Shah, D., Naciri, M., Clee, P., Al-Rubeai, M. (2006).**

NucleoCounter-An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology*, 51(1), 39-44.

**Sinowatz, F. (2001).**

Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. Stuttgart: Schattauer.

**Sullivan, R. (2004).**

Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 341-347.

**Suttiyotin, P., Thwaites, C. J. (1991).**

The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 25(3), 209-224.

**Swanson, E. W., Bearden, H. J. (1951).**

An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 10(4), 981-987.

**Tamuli, M. K., Watson, P. F. (1994).**

Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science*, 35(3-4), 247-254.

**Töpfer-Petersen, E., Waberski, D. (2001).**

Spermienreifung und Befruchtung. In W. Busch & A. Holzmann, *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren* (pp. 72). Stuttgart: Schattauer.

**Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., Roca, J. (1997).**

Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47(4), 913-922.

**Vigano, P., Brignate, C., Gonfiantini, C., Doldi, N., Busacca, M. (1990).**

Which is the best test to evaluate the integrity of sperm plasma membrane? *Acta Europaea fertilitatis*, 21(5), 231-234.

**Vishwanath, R. (2003).**

Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59(2), 571-584.

**Wales, R. G. (1959).**

The differential staining of human and dog spermatozoa. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 37(5), 433-439.

**Watson, P. F. (2000).**

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481-492.

**White, I. G., Lincoln, G. J. (1960).**

The yellow pigmentation of bull semen and its content of riboflavin, niacin, thiamine and related compounds. *The Biochemical journal*, 76, 301-306.

**Woodall, P. F., Johnstone, I. P. (1988).**

Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 82(2), 603-609.

**World Health Organisation (2010).**

WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edn.). Geneva: WHO Press.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1	Der NucleoCounter SP-100 <sup>®</sup> (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark) mit eingesetzter Messkassette .....	40
Abbildung 3.2	gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Eosin-Färbung, Frischsperma Rüde (1000x).....	43
Abbildung 3.3	gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Eosin-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Rüde (1000x).....	43
Abbildung 3.4	gefärbtes und ungefärbtes Spermium mit der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Bulle (1000x).....	44
Abbildung 3.5	gefärbtes und halbgefärbtes Spermium mit der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung, Tiefgefriersperma Bulle (1000x).....	44
Abbildung 3.6	Grafische Darstellung des Versuchsaufbaus mit den drei Vitalfärbungen .....	45
Abbildung 4.1	Vergleich der drei Vitalfärbungen (MW $\pm$ SD) in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	55
Abbildung 4.2	Rüde Frischsperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW $\pm$ SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	56
Abbildung 4.3	Rüde Tiefgefriersperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW $\pm$ SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	57
Abbildung 4.4	Bulle Frischsperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW $\pm$ SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	58
Abbildung 4.5	Bulle Tiefgefriersperma: Ergebnisse der drei Untersucher mit den drei Vitalfärbungen (MW $\pm$ SD), exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	59
Abbildung 4.6	Variationskoeffizienten (%) der drei Vitalfärbungen in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	60
Abbildung 4.7	Eosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	62
Abbildung 4.8	Eosin-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien.....	63

- Abbildung 4.9 Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei zweifacher Auswertung desselben Ausstriches in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 64
- Abbildung 4.10 Eosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 66
- Abbildung 4.11 Eosin-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien 67
- Abbildung 4.12 Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Variationskoeffizienten (%) der drei Untersucher bei Auswertung zweier Ausstriche der gleichen Probe in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 68
- Abbildung 4.13 Rüde Frischsperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10 ..... 71
- Abbildung 4.14 Rüde Tiefgefriersperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10 ..... 72
- Abbildung 4.15 Bulle Frischsperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10 ..... 73
- Abbildung 4.16 Bulle Tiefgefriersperma: Wöchentliche Verlaufsauswertung (MW des Prozentsatzes toter Spermien und Regressionsgerade) der drei Vitalfärbungen über einen Zeitraum von 12 Wochen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien, n=10 ..... 74
- Abbildung 4.17: Mittlere relative Abweichung mit 95% Konfidenzintervall des Prozentsatzes toter Spermien der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 76
- Abbildung 4.18 Eosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters® in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 78

- Abbildung 4.19 Eosin-Nigrosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters<sup>®</sup> in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 79
- Abbildung 4.20 Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung: Relative mittlere Abweichung mit 95% Konfidenzintervall der drei Untersucher zum Prozentsatzes an toten Spermien des NucleoCounters<sup>®</sup> in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 80
- Abbildung 4.21 Rüde Frischsperma: Absolute mittlere Abweichung (MW ± SD) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter<sup>®</sup> in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien..... 82
- Abbildung 4.22 Rüde Tiefgefriersperma: Absolute mittlere Abweichung (MW ± SD) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter<sup>®</sup> in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 83
- Abbildung 4.23 Bulle Frischsperma: Absolute mittlere Abweichung (MW ± SD) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter<sup>®</sup> in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien..... 84
- Abbildung 4.24 Bulle Tiefgefriersperma: Absolute mittlere Abweichung (MW ± SD) der drei Vitalfärbungen zum NucleoCounter<sup>®</sup> in Abhängigkeit von dem Prozentsatz toter Spermien in der Probe, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien ..... 85
- Abbildung 10.1 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma ..... 125
- Abbildung 10.2 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma..... 125
- Abbildung 10.3 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma..... 126
- Abbildung 10.4 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma ..... 126
- Abbildung 10.5 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma..... 127
- Abbildung 10.6 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma..... 127

- Abbildung 10.7 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma ..... 128
- Abbildung 10.8 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma ..... 128
- Abbildung 10.9 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma..... 129
- Abbildung 10.10 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma 129
- Abbildung 10.11 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma ..... 130
- Abbildung 10.12 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma ..... 130
- Abbildung 10.13 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma..... 131
- Abbildung 10.14 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma ..... 131
- Abbildung 10.15 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma ..... 132
- Abbildung 10.16 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma..... 132
- Abbildung 10.17 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma..... 133
- Abbildung 10.18 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma..... 133
- Abbildung 10.19 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma ..... 134
- Abbildung 10.20 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma ..... 134
- Abbildung 10.21 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma..... 135
- Abbildung 10.22 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma 135

Abbildung 10.23	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma .....	136
Abbildung 10.24	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma .....	136
Abbildung 10.25	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1.. ..	137
Abbildung 10.26	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1 .....	137
Abbildung 10.27	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1.....	138
Abbildung 10.28	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1.....	138
Abbildung 10.29	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1 .....	139
Abbildung 10.30	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1 .....	139
Abbildung 10.31	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2.. ..	140
Abbildung 10.32	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2 .....	140
Abbildung 10.33	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2.....	141
Abbildung 10.34	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2.....	141
Abbildung 10.35	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2 .....	142

Abbildung 10.36	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2 .....	142
Abbildung 10.37	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3.. .....	143
Abbildung 10.38	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3 .....	143
Abbildung 10.39	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3.....	144
Abbildung 10.40	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3.....	144
Abbildung 10.41	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3 .....	145
Abbildung 10.42	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3 .....	145
Abbildung 10.43	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	146
Abbildung 10.44	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	146
Abbildung 10.45	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	147
Abbildung 10.46	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	147
Abbildung 10.47	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	148
Abbildung 10.48	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 .....	148

Abbildung 10.49	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	149
Abbildung 10.50	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	149
Abbildung 10.51	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	150
Abbildung 10.52	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	150
Abbildung 10.53	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	151
Abbildung 10.54	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	151
Abbildung 10.55	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	152
Abbildung 10.56	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	152
Abbildung 10.57	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	153
Abbildung 10.58	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	153
Abbildung 10.59	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	154
Abbildung 10.60	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	154
Abbildung 10.61	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .. .....	155

Abbildung 10.62	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .....	155
Abbildung 10.63	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .....	156
Abbildung 10.64	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .....	156
Abbildung 10.65	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .....	157
Abbildung 10.66	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1 .....	157
Abbildung 10.67	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .. .....	158
Abbildung 10.68	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .....	158
Abbildung 10.69	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .....	159
Abbildung 10.70	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .....	159
Abbildung 10.71	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .....	160
Abbildung 10.72	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2 .....	160
Abbildung 10.73	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 .. .....	161
Abbildung 10.74	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 .....	161

- Abbildung 10.75 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 ..... 162
- Abbildung 10.76 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 ..... 162
- Abbildung 10.77 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 ..... 163
- Abbildung 10.78 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3 ..... 163
- Abbildung 10.79 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 164
- Abbildung 10.80 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 164
- Abbildung 10.81 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 165
- Abbildung 10.82 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 165
- Abbildung 10.83 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 166
- Abbildung 10.84 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1 ..... 166
- Abbildung 10.85 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2 ..... 167
- Abbildung 10.86 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2 ..... 167
- Abbildung 10.87 Bland-Altman-Plot: NucleoCounter<sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2 ..... 168

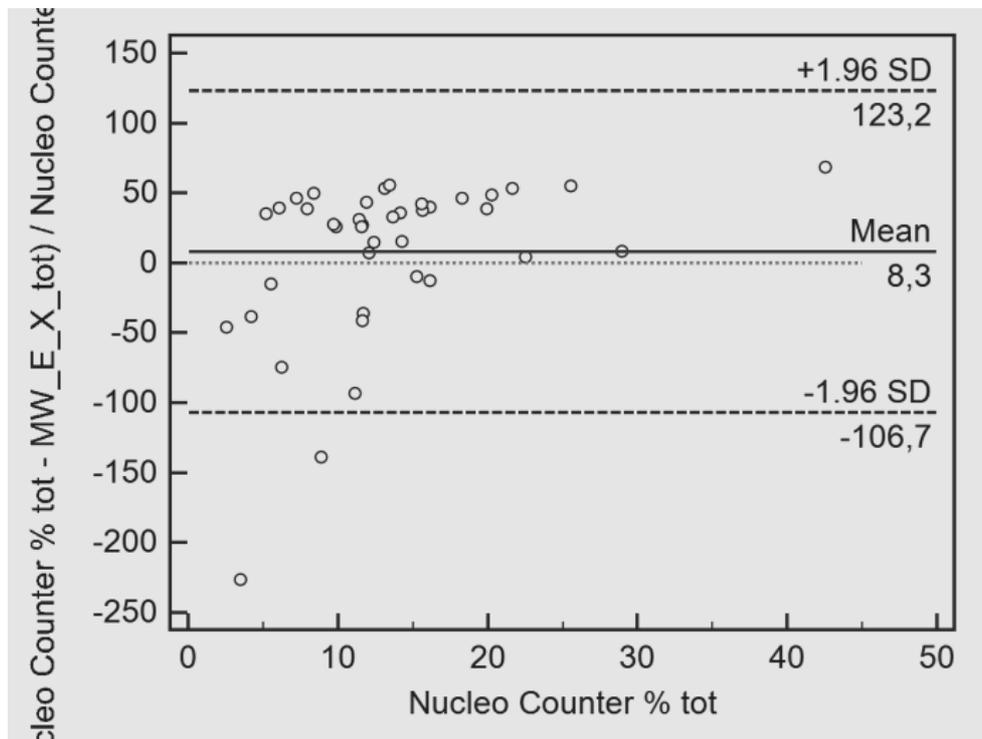
Abbildung 10.88	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	168
Abbildung 10.89	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	169
Abbildung 10.90	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2.....	169
Abbildung 10.91	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3 .....	170
Abbildung 10.92	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	170
Abbildung 10.93	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	171
Abbildung 10.94	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	171
Abbildung 10.95	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	172
Abbildung 10.96	Bland-Altman-Plot: NucleoCounter <sup>®</sup> im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3.....	172

## 10 Tabellenverzeichnis

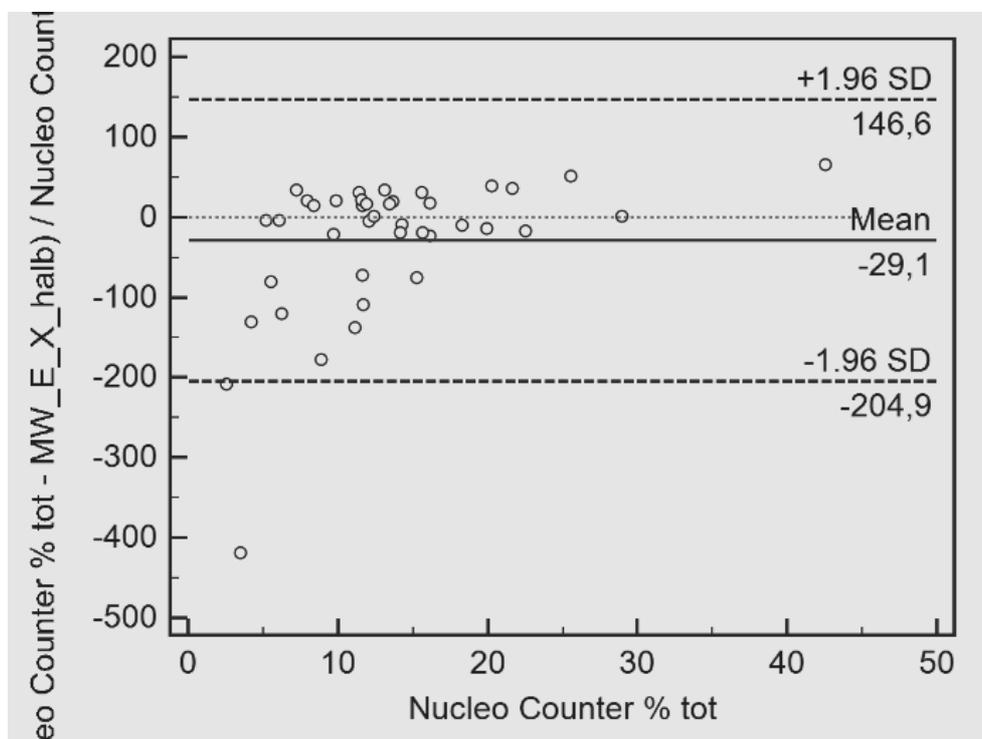
Tabelle 2.1	Referenzbereiche für Haustierejakulate (Makroskopische Untersuchung).....	6
Tabelle 2.2	Referenzbereiche für Haustierejakulate (Mikroskopische Untersuchung) .....	11
Tabelle 4.1	Verwendete Abkürzungen und Farben im Ergebnis- und Diskussionsteil .....	48
Tabelle 4.2	Rüde Frischsperma: NucleoCounter®-Messungen (MW $\pm$ SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechneter Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40 .....	50
Tabelle 4.3	Rüde Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Messungen (MW $\pm$ SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40... ..	50
Tabelle 4.4	Bulle Frischsperma: NucleoCounter®-Messungen (MW $\pm$ SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40.....	50
Tabelle 4.5	Bulle Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Messungen (MW $\pm$ SD, Min/Max) für die Parameter Dichte (Mio./ml), Anzahl toter Spermien (Mio./ml) und errechnete Prozentsatz toter Spermien (%-Tot), n=40... ..	50
Tabelle 4.6	Rüde Frischsperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW $\pm$ SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10.....	51
Tabelle 4.7	Rüde Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW $\pm$ SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10.....	51
Tabelle 4.8	Bulle Frischsperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW $\pm$ SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10.....	51
Tabelle 4.9	Bulle Tiefgefriersperma: NucleoCounter®-Doppelmessungen (MW $\pm$ SD, Variationskoeffizient) für die Parameter Dichte (Mio./ml) und Anzahl toter Spermien (Mio./ml), n=10.....	51
Tabelle 4.10	Alter der Ausstriche (MW $\pm$ SD, Min/Max) in Tagen zum Zeitpunkt der Auswertung in den vier Gruppen.....	52

Tabelle 4.11 Rüde Frischsperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW $\pm$ SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien.....	54
Tabelle 4.12 Rüde Tiefgefriersperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW $\pm$ SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien.....	54
Tabelle 4.13 Bulle Frischsperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW $\pm$ SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien.....	54
Tabelle 4.14 Bulle Tiefgefriersperma: Häufigkeit von Präparaten mit halbgefärbten Spermien (%) und prozentualer Anteil (MW $\pm$ SD, Min/Max) halbgefärbter Spermien.....	54
Tabelle 4.15 Korrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r_s$ ) für die Verlaufsauswertung über 12 Wochen mit den drei Vitalfärbungen in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien .....	70
Tabelle 4.16 Häufigkeit der Unterschätzung (%) des Prozentsatzes toter Spermien durch die drei Vitalfärbungen im Vergleich zum NucleoCounter <sup>®</sup> (n=480) in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien .....	75
Tabelle 4.17 Differenzen des Prozentsatzes toter Spermien (MW $\pm$ SD) zwischen den drei Vitalfärbungen und dem NucleoCounter <sup>®</sup> in den vier Gruppen, exkl. (T) und inkl. (T+H) halbgefärbter Spermien .....	77
Tabelle 11.1 Rezeptur der Eosin-Färbung modifiziert nach HOFFMANN (2003)...	173
Tabelle 11.2 Rezeptur der Eosin-Nigrosin-Färbung nach WHO (2012).....	173
Tabelle 11.3 Rezeptur der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung nach GEISLER (1990).....	173

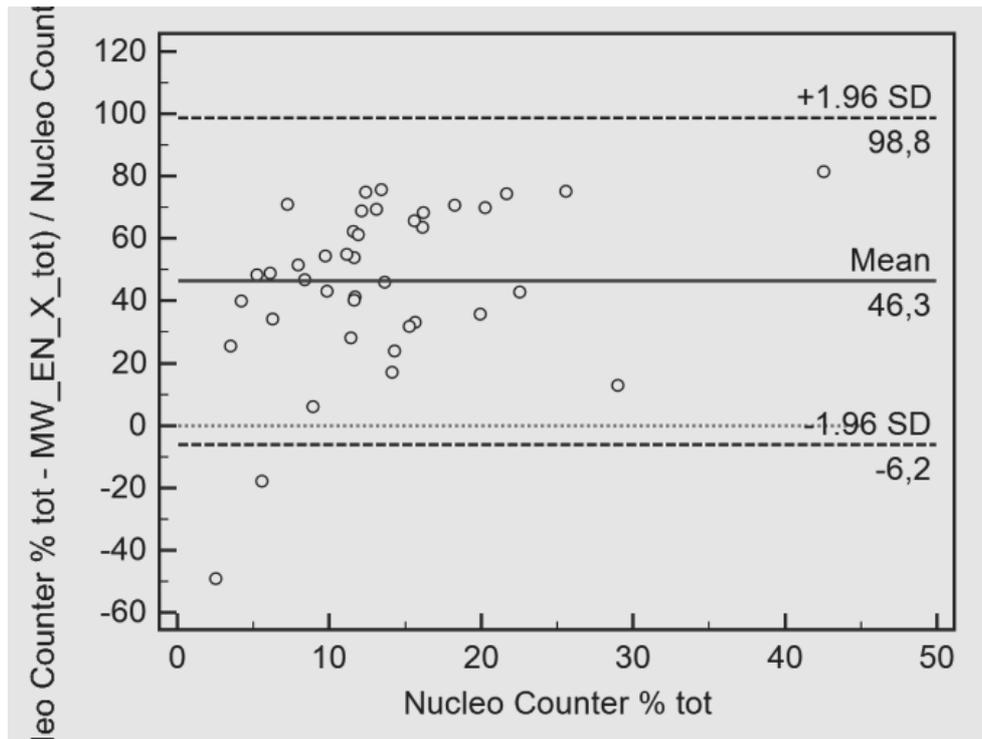
## 11 Anhang



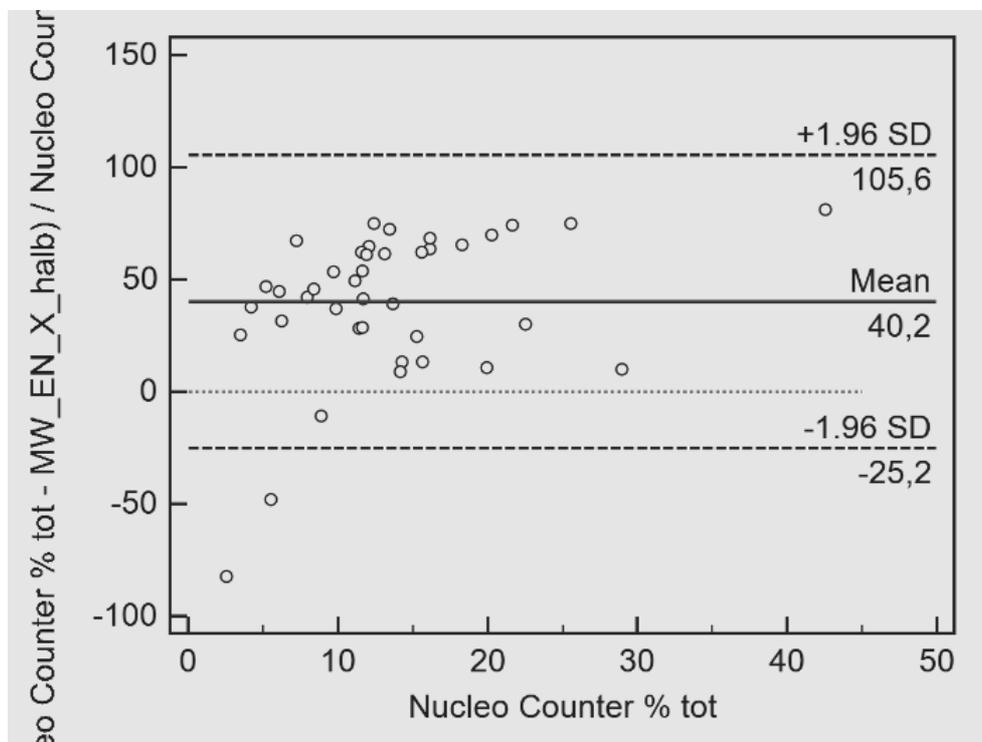
**Abbildung 11.1** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma



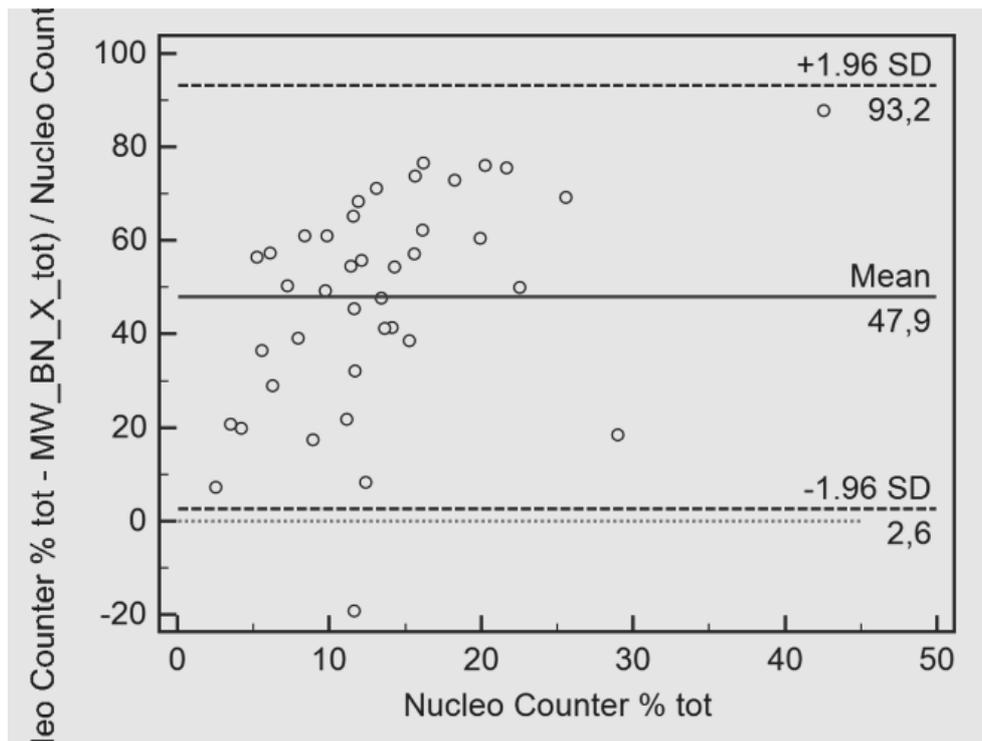
**Abbildung 11.2** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma



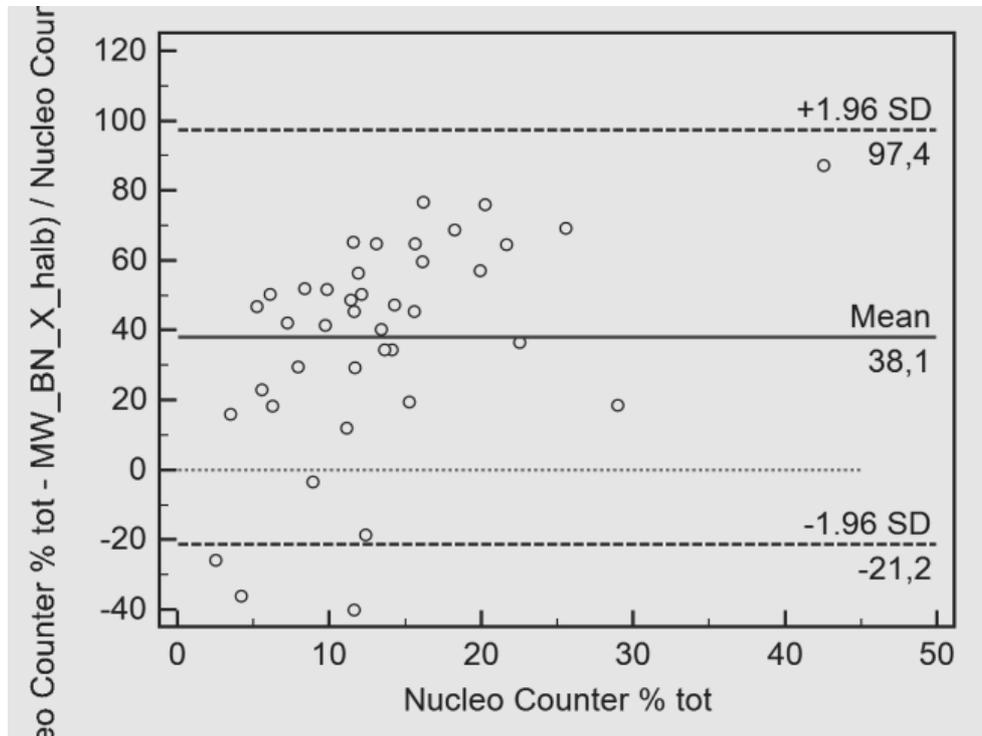
**Abbildung 11.3** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma



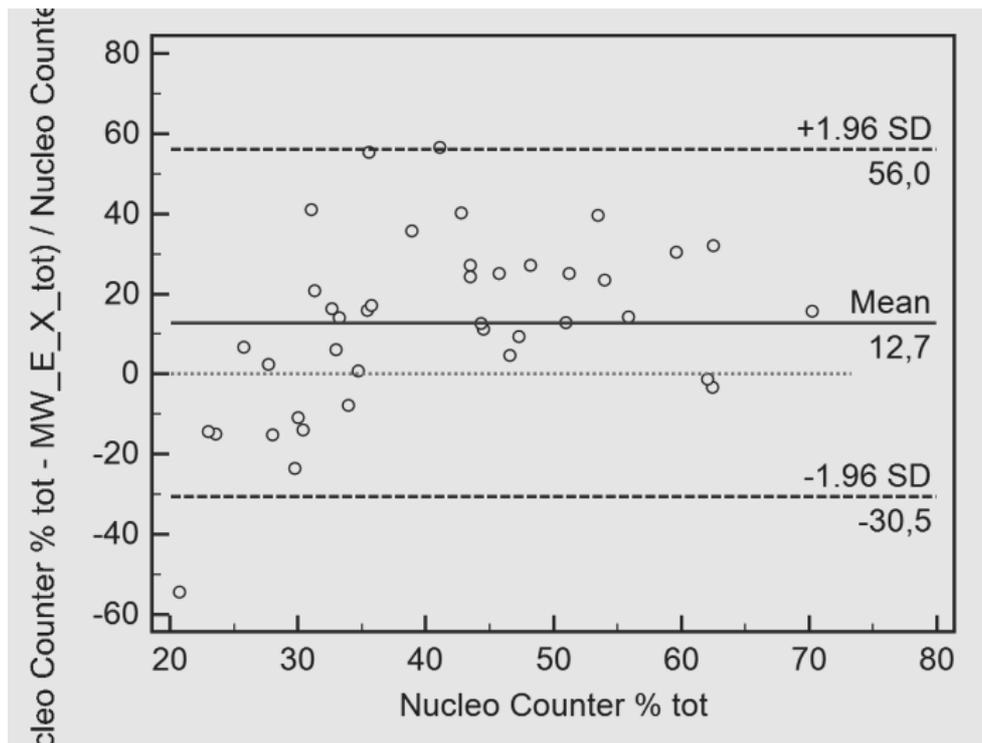
**Abbildung 11.4** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma



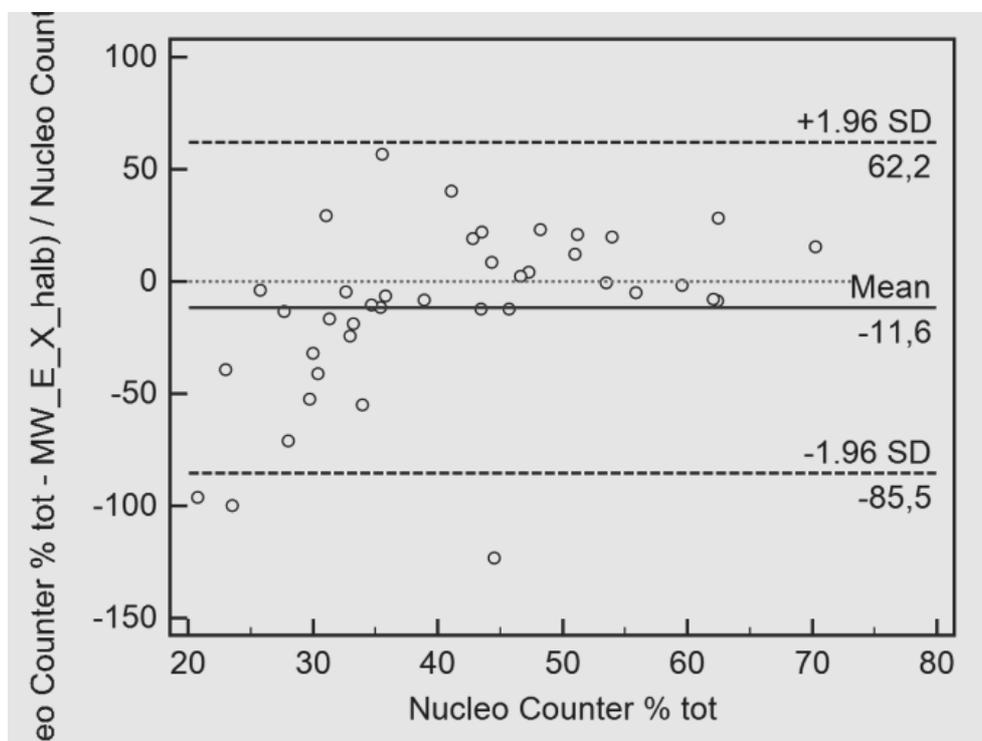
**Abbildung 11.5** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma



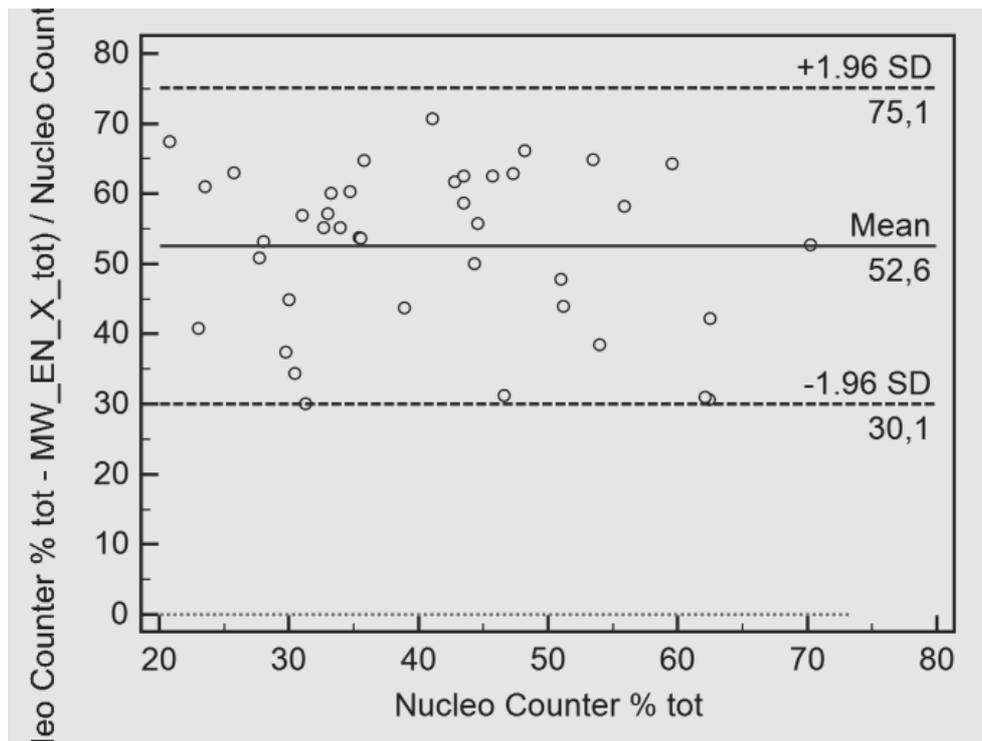
**Abbildung 11.6** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma



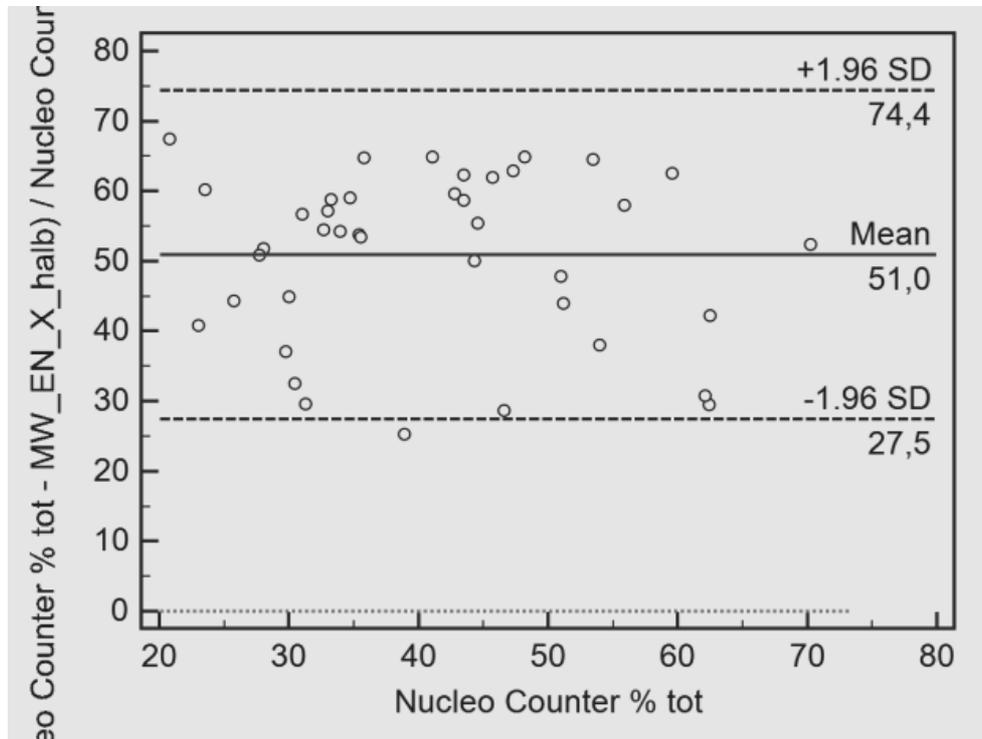
**Abbildung 11.7** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rude Tiefgefriersperma



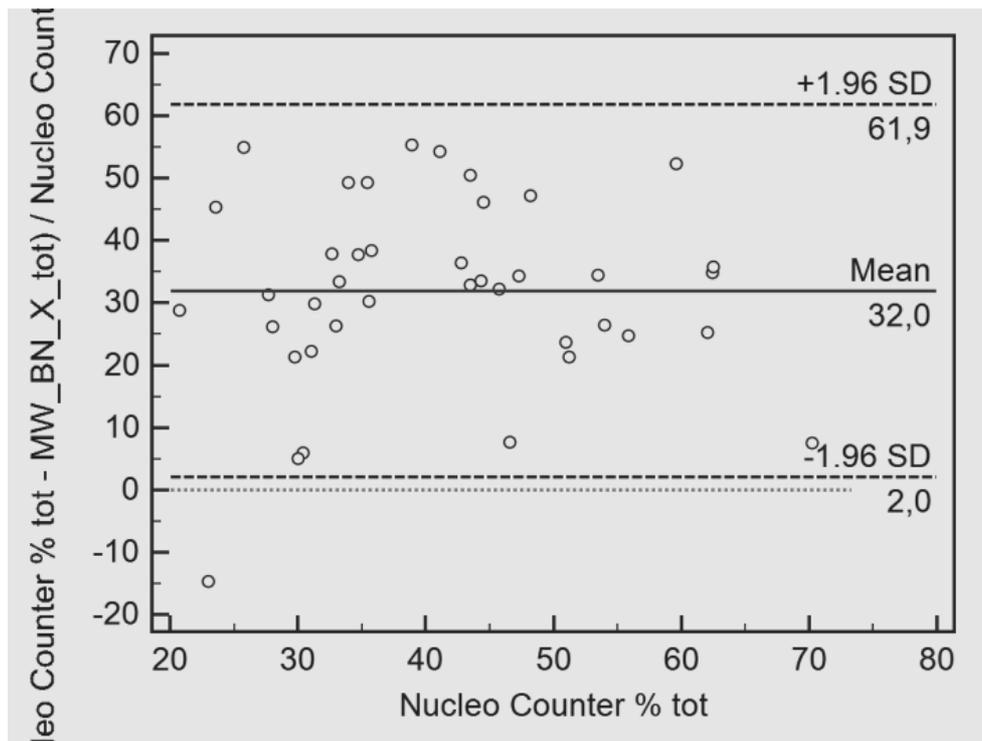
**Abbildung 11.8** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rude Tiefgefriersperma



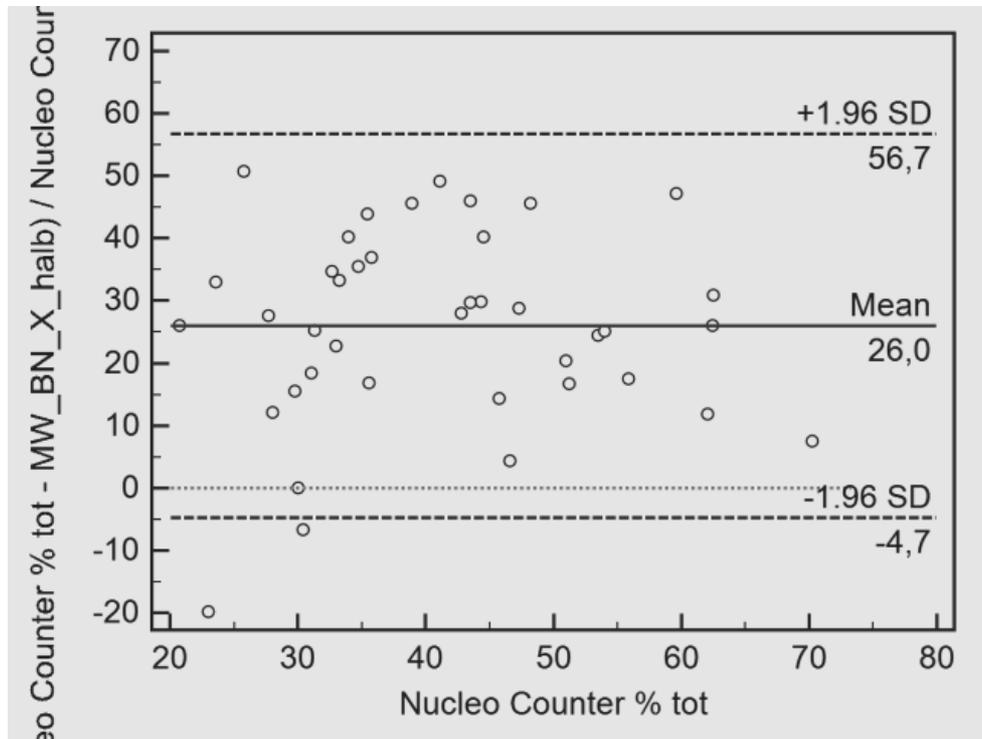
**Abbildung 11.9** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma



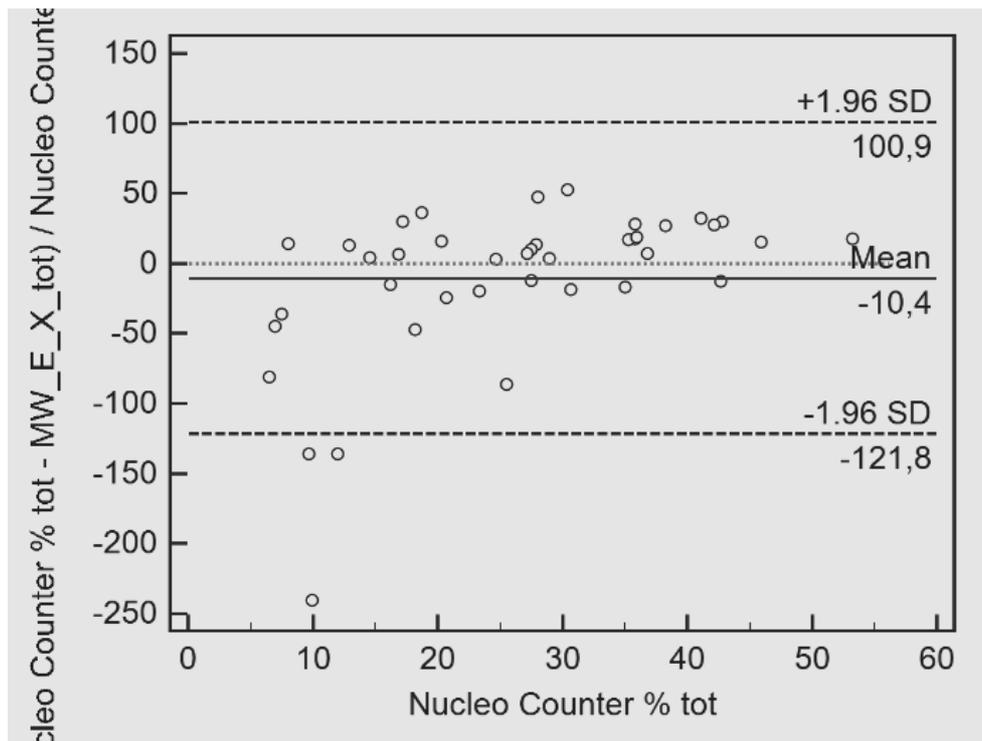
**Abbildung 11.10** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma



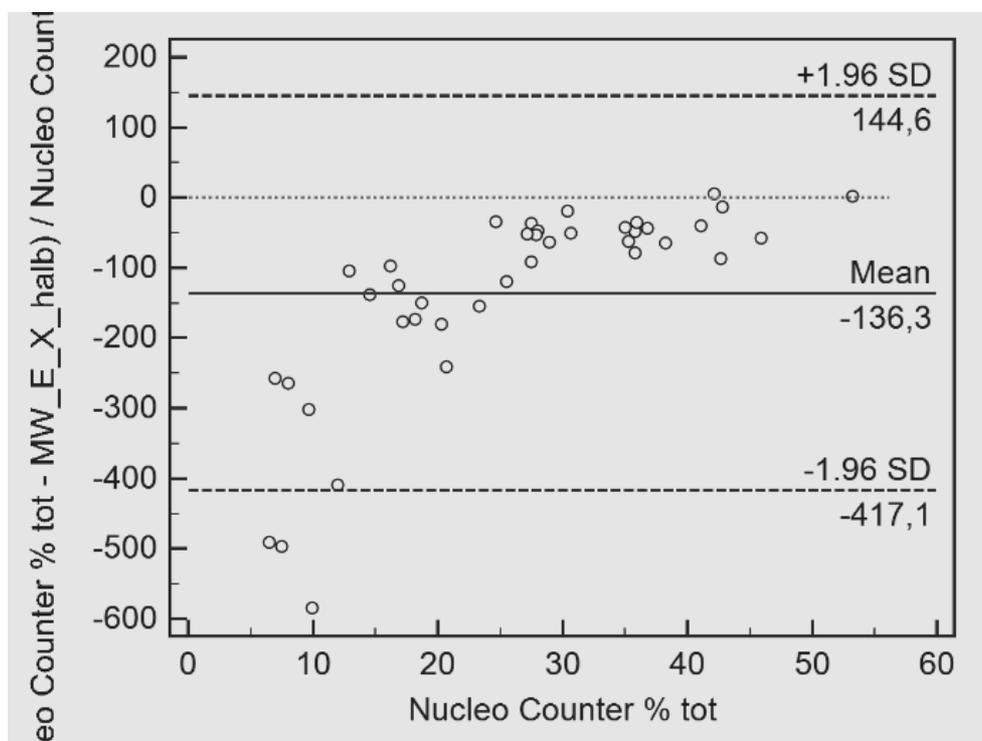
**Abbildung 11.11** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rude Tiefgefriersperma



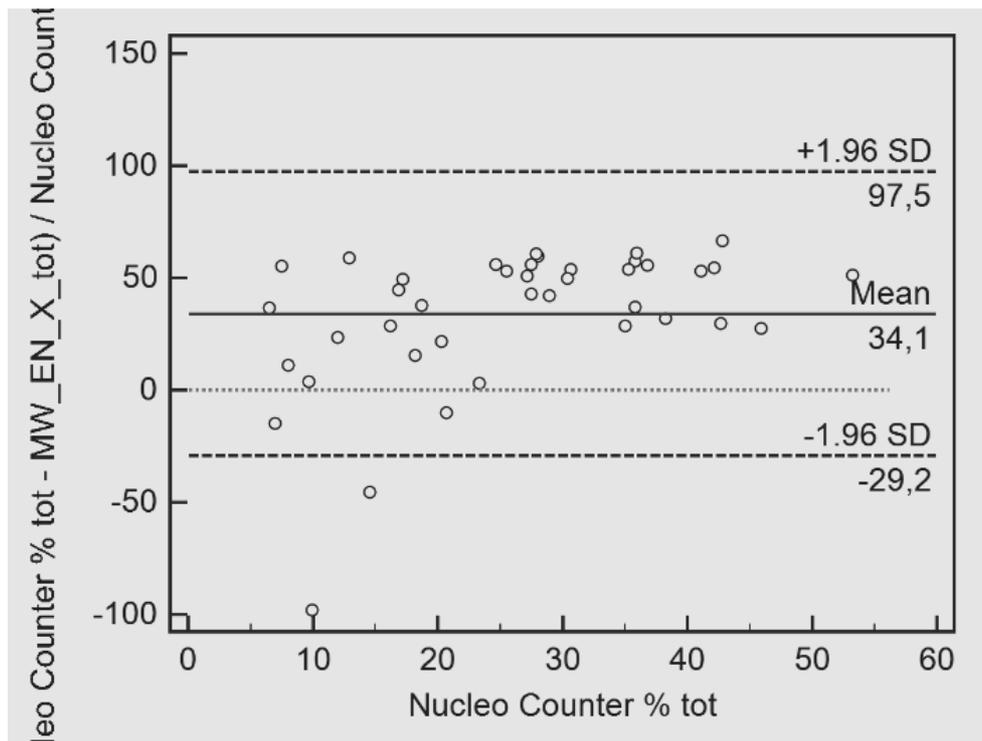
**Abbildung 11.12** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rude Tiefgefriersperma



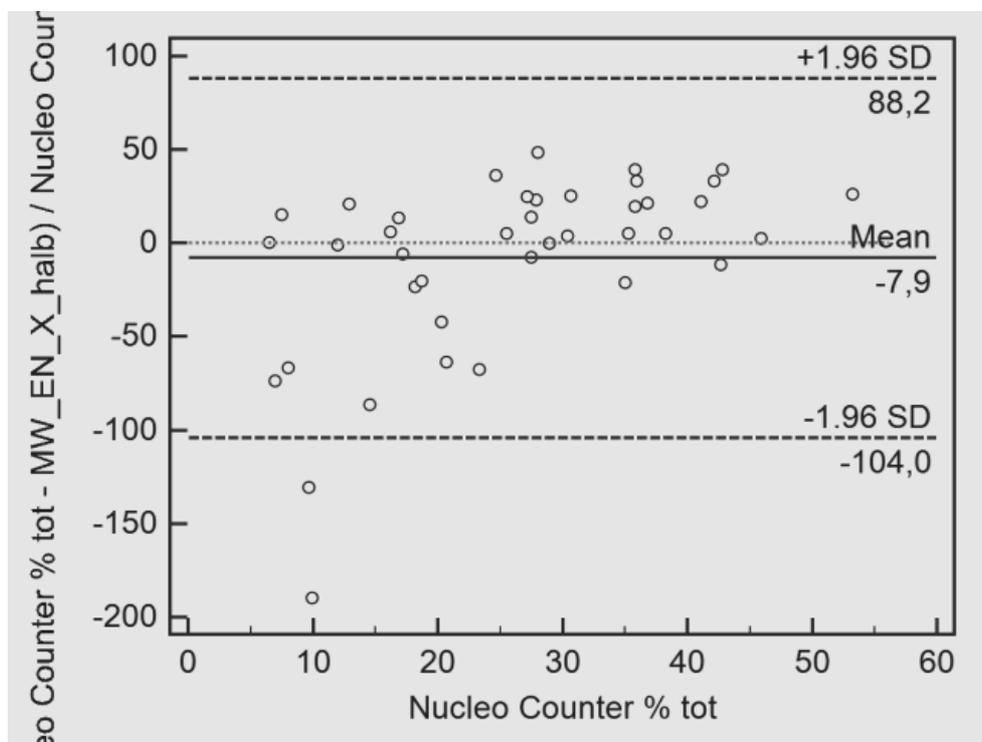
**Abbildung 11.13** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma



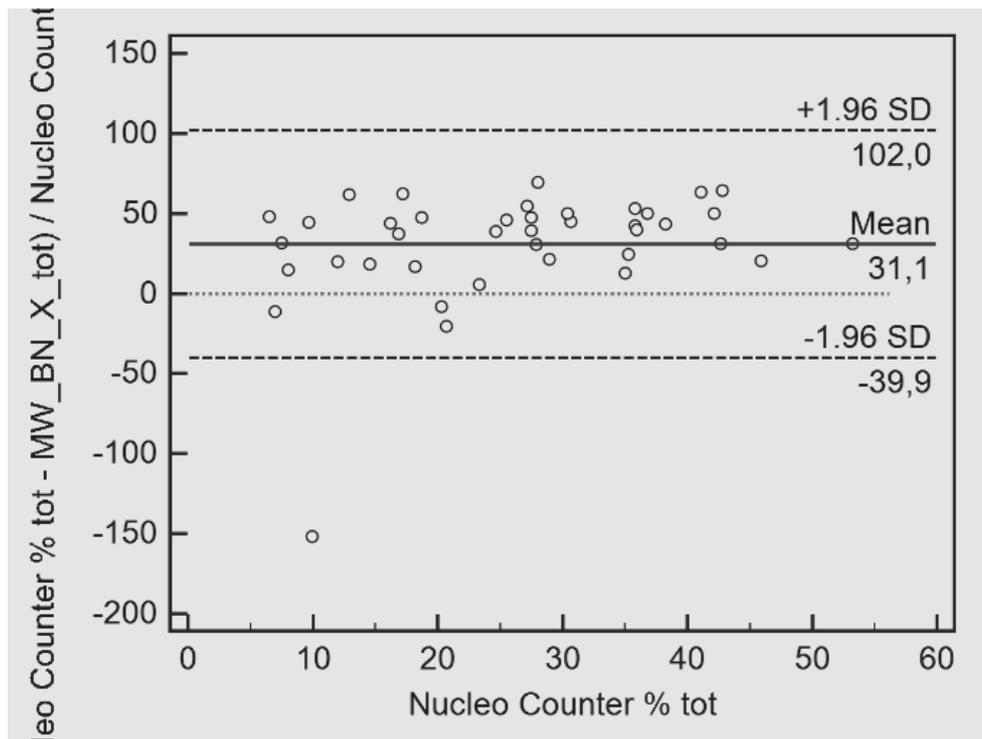
**Abbildung 11.14** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma



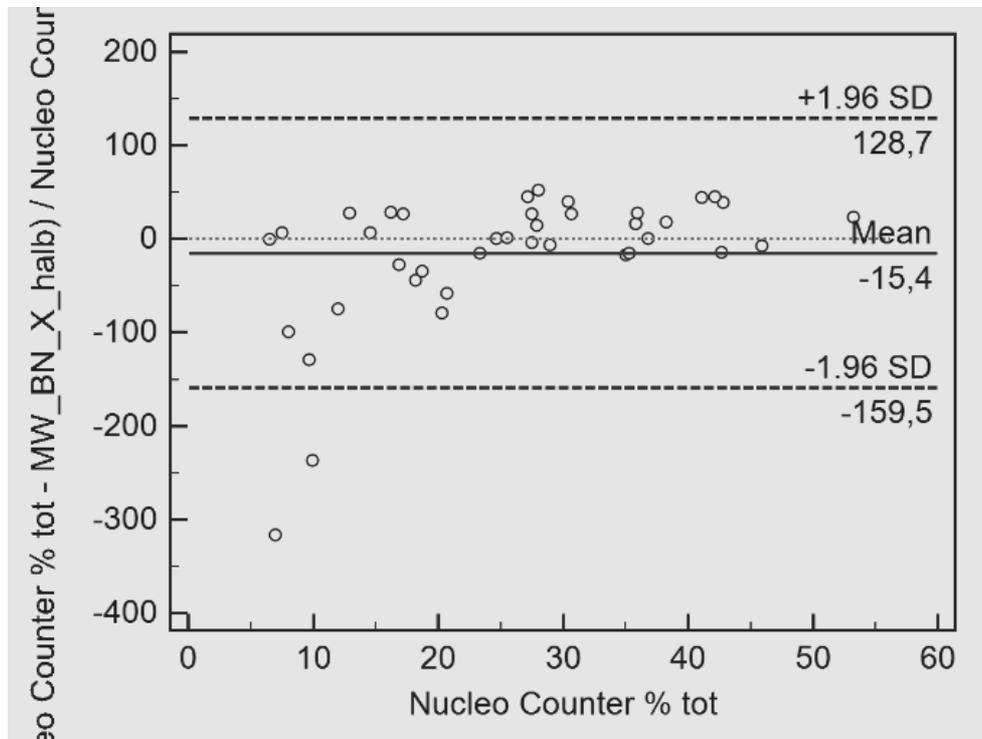
**Abbildung 11.15** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma



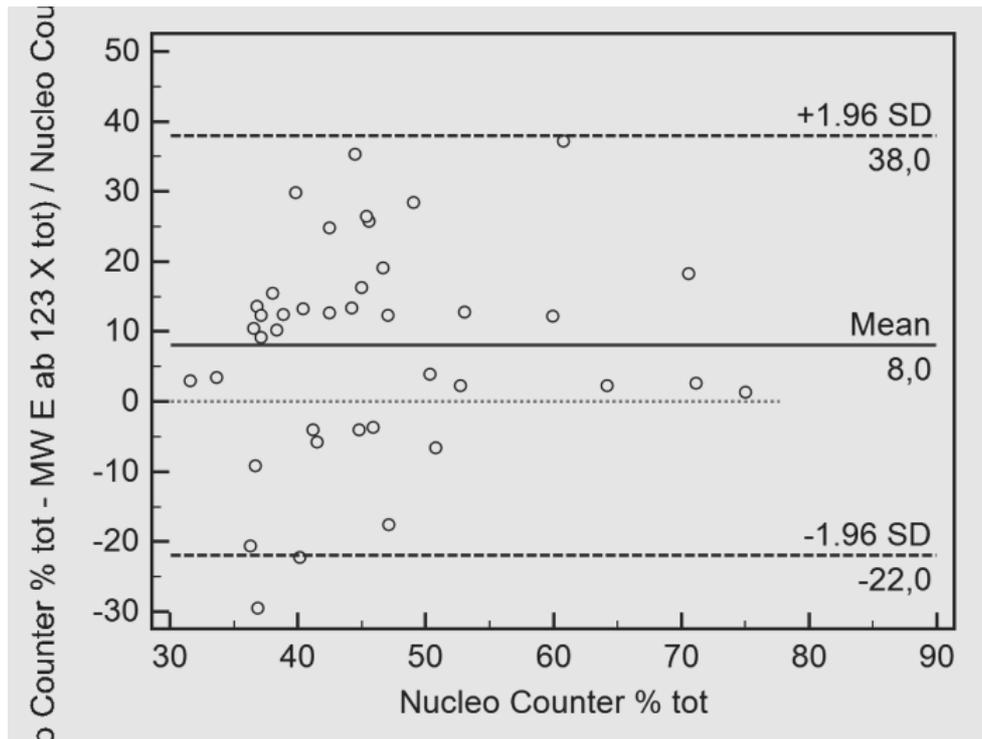
**Abbildung 11.16** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma



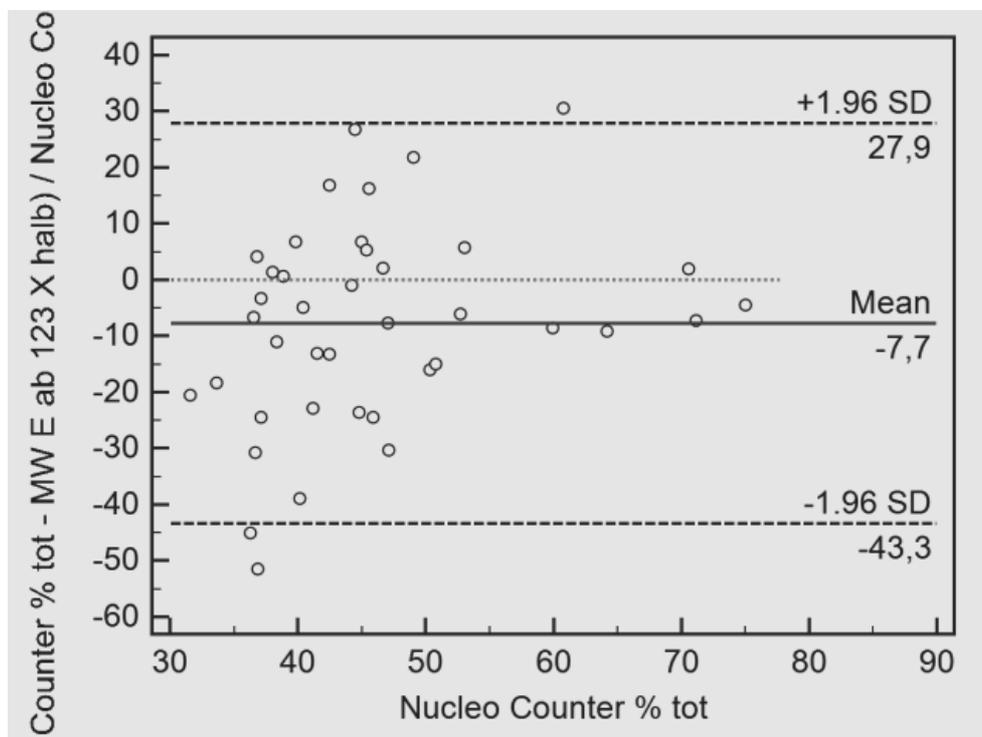
**Abbildung 11.17** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma



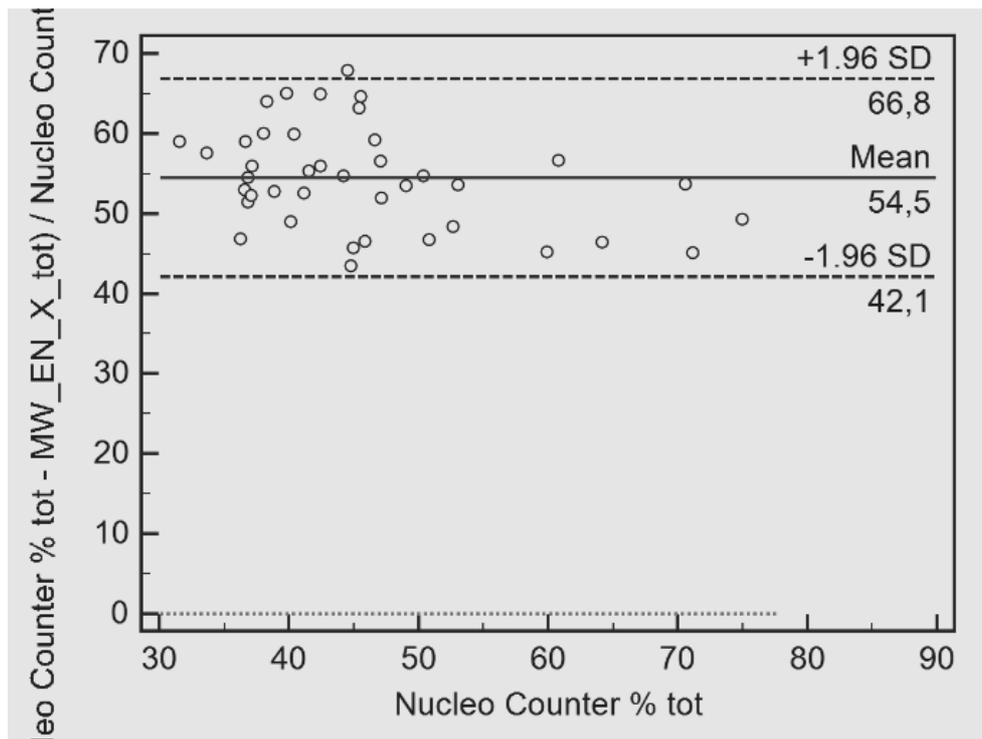
**Abbildung 11.18** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma



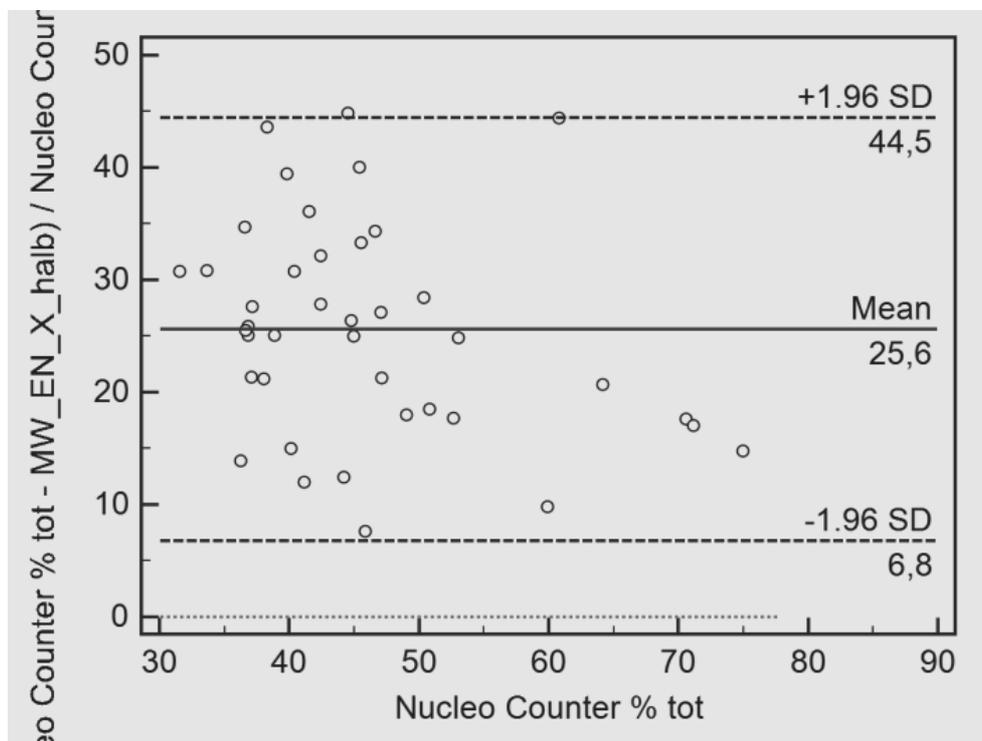
**Abbildung 11.19** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



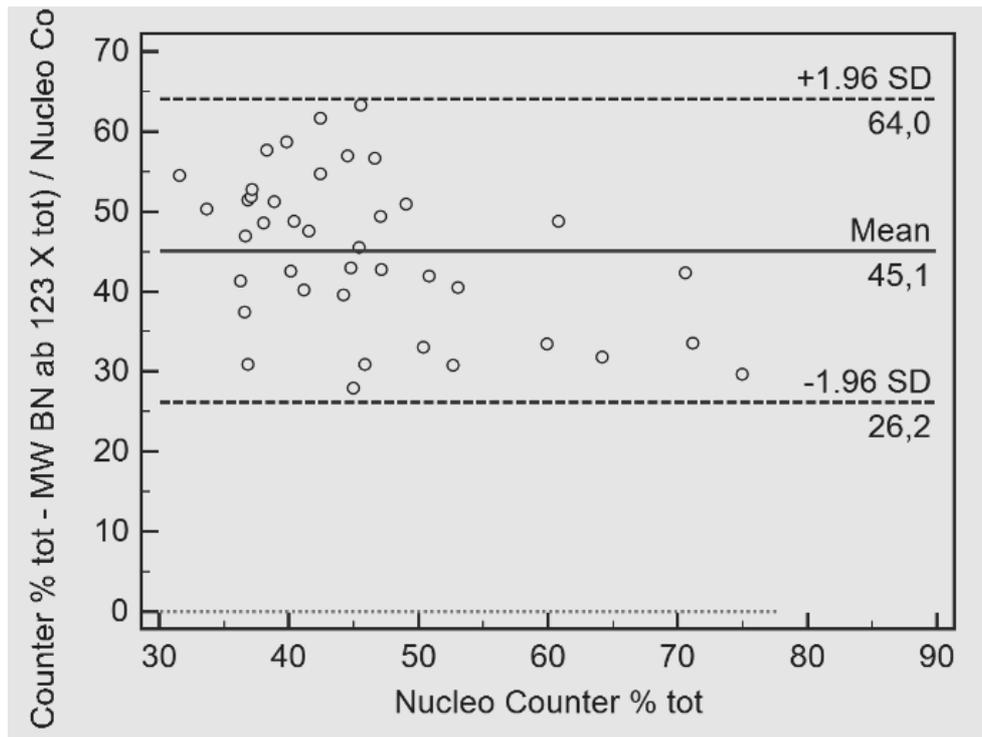
**Abbildung 11.20** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



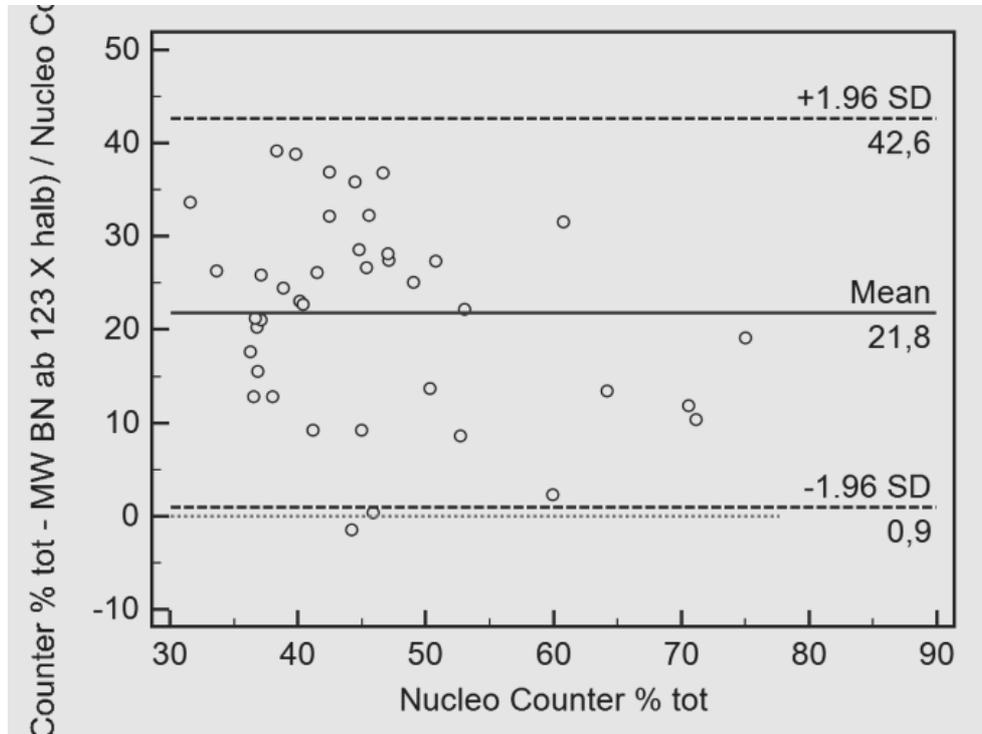
**Abbildung 11.21** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



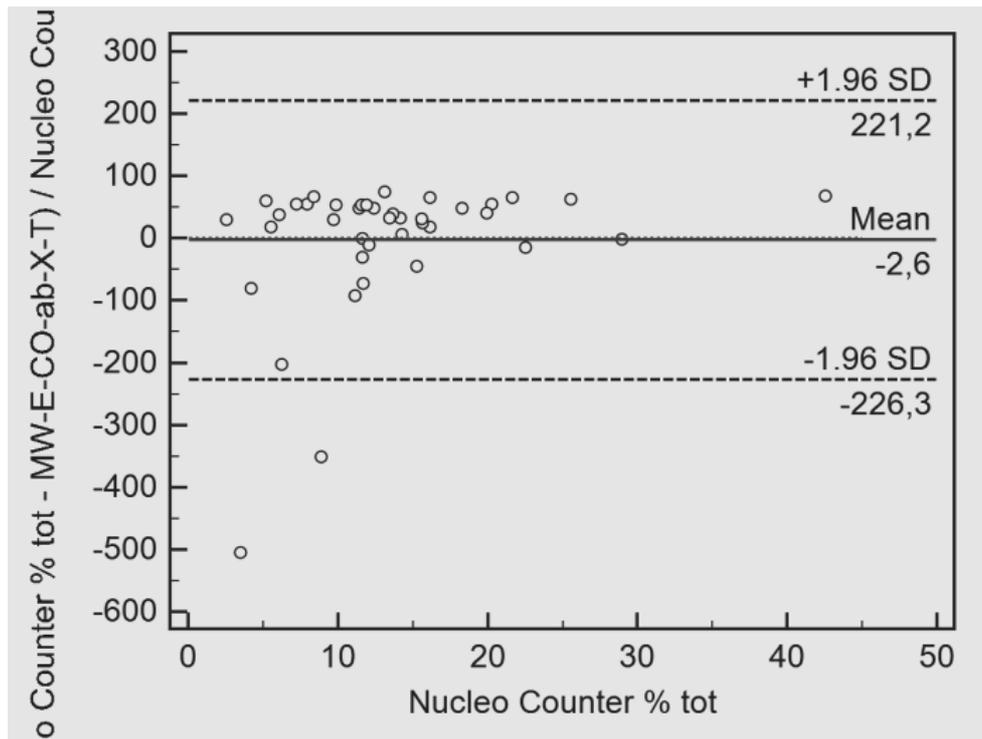
**Abbildung 11.22** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



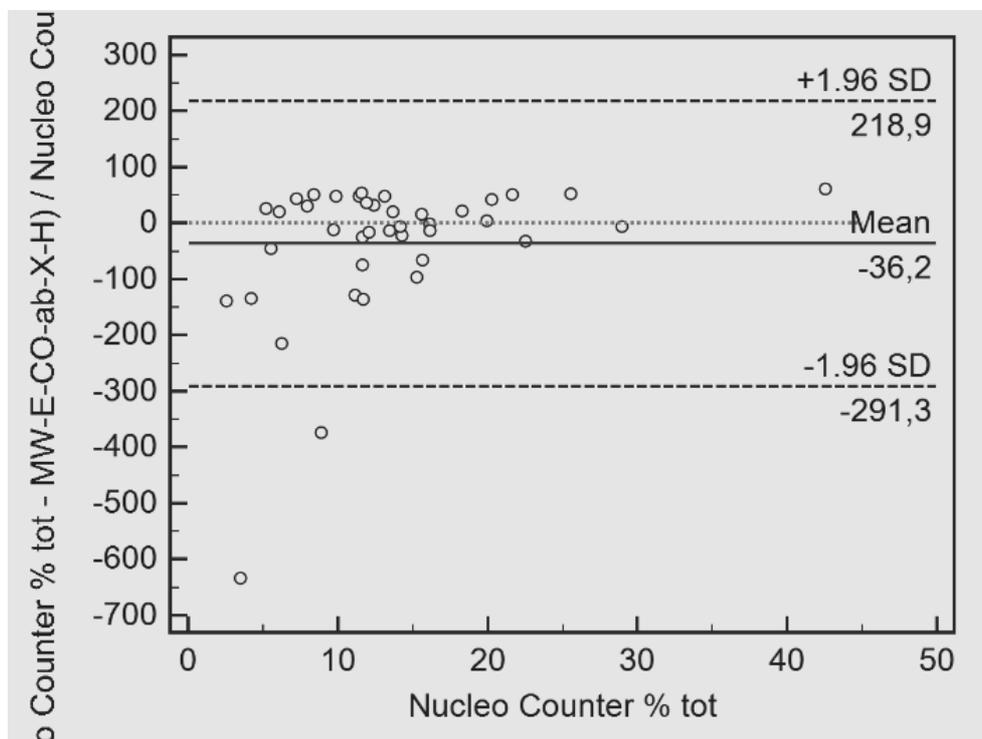
**Abbildung 11.23** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



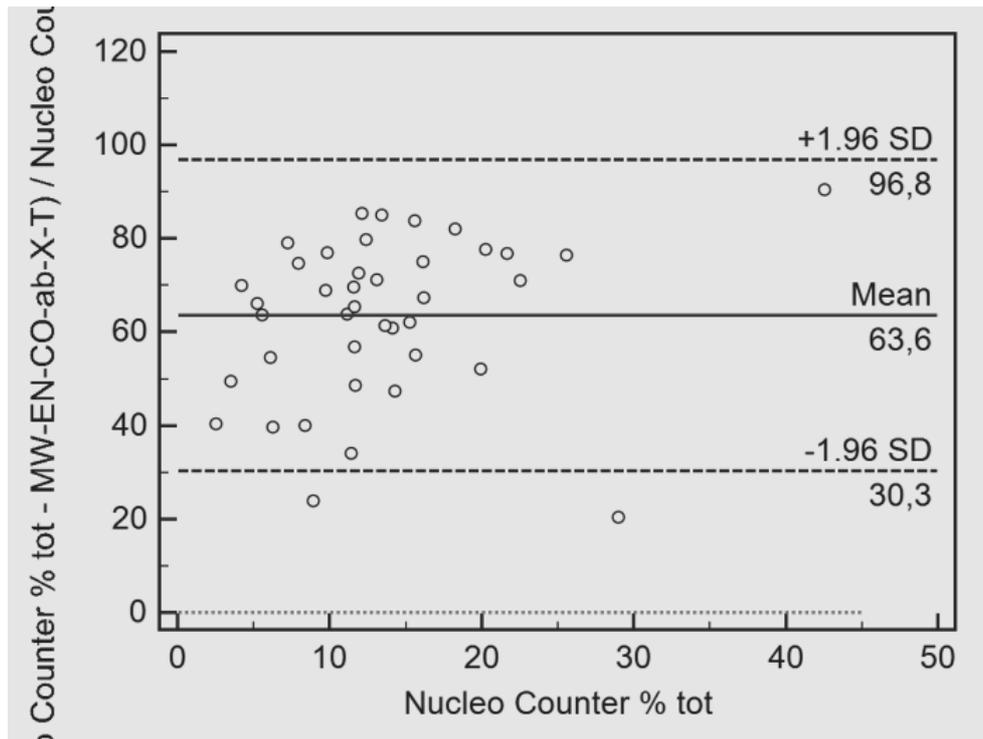
**Abbildung 11.24** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma



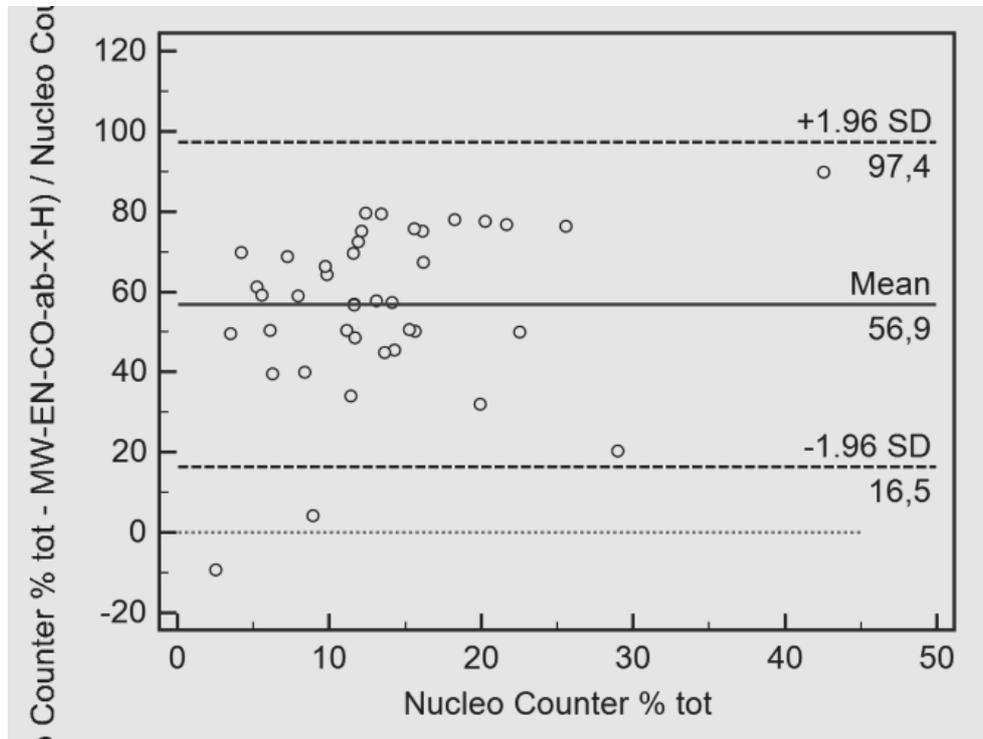
**Abbildung 11.25** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



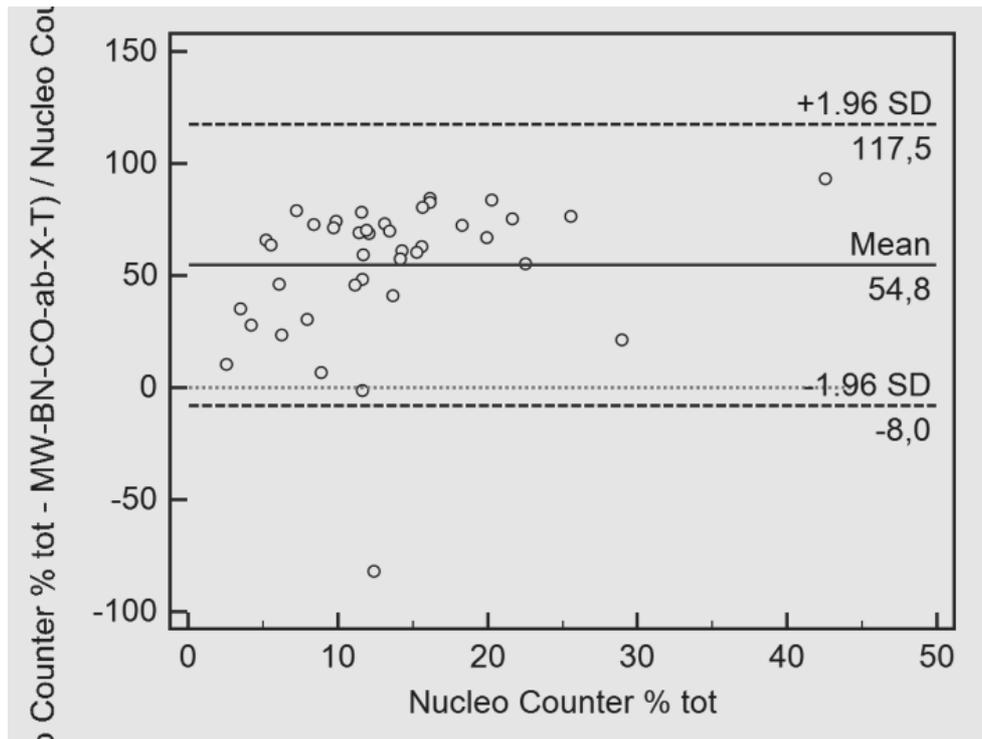
**Abbildung 11.26** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



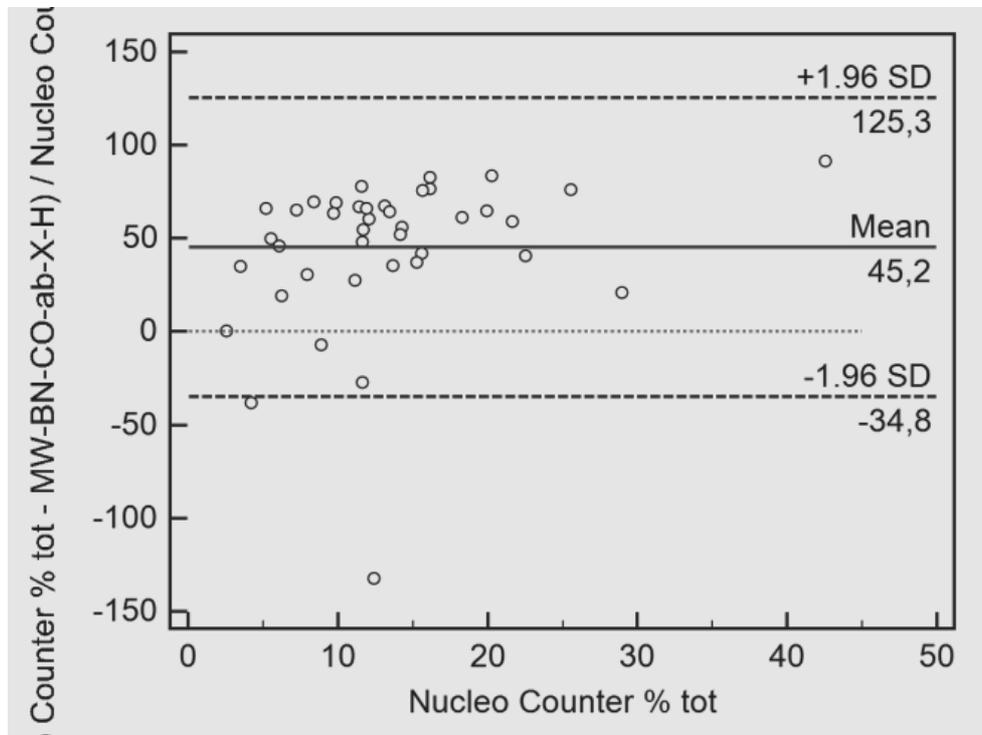
**Abbildung 11.27** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



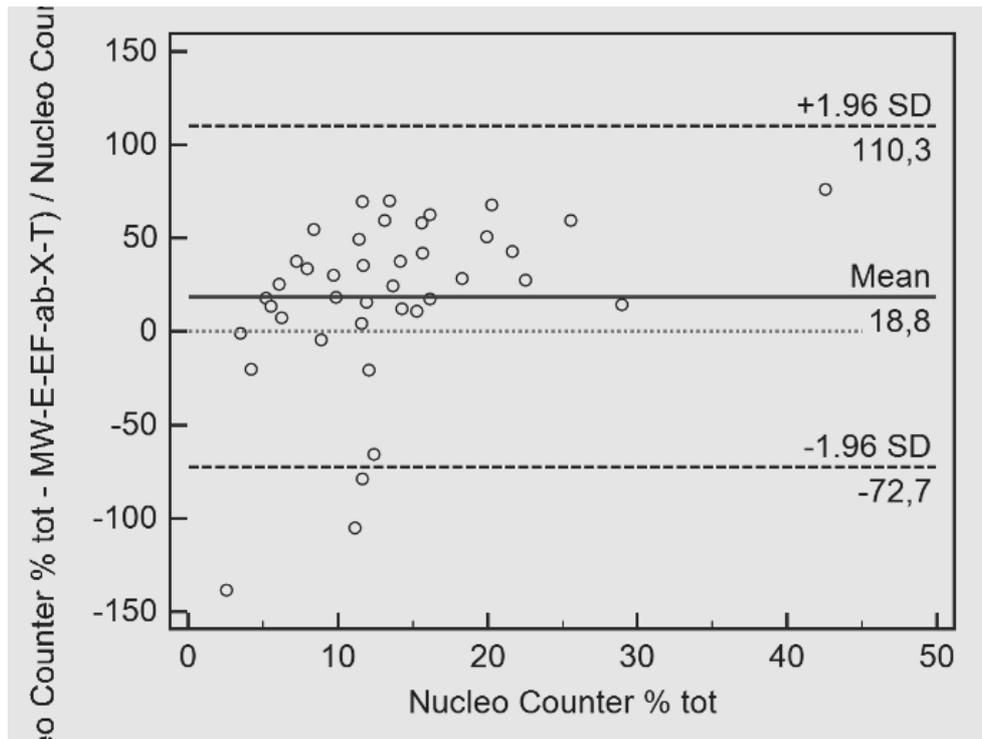
**Abbildung 11.28** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



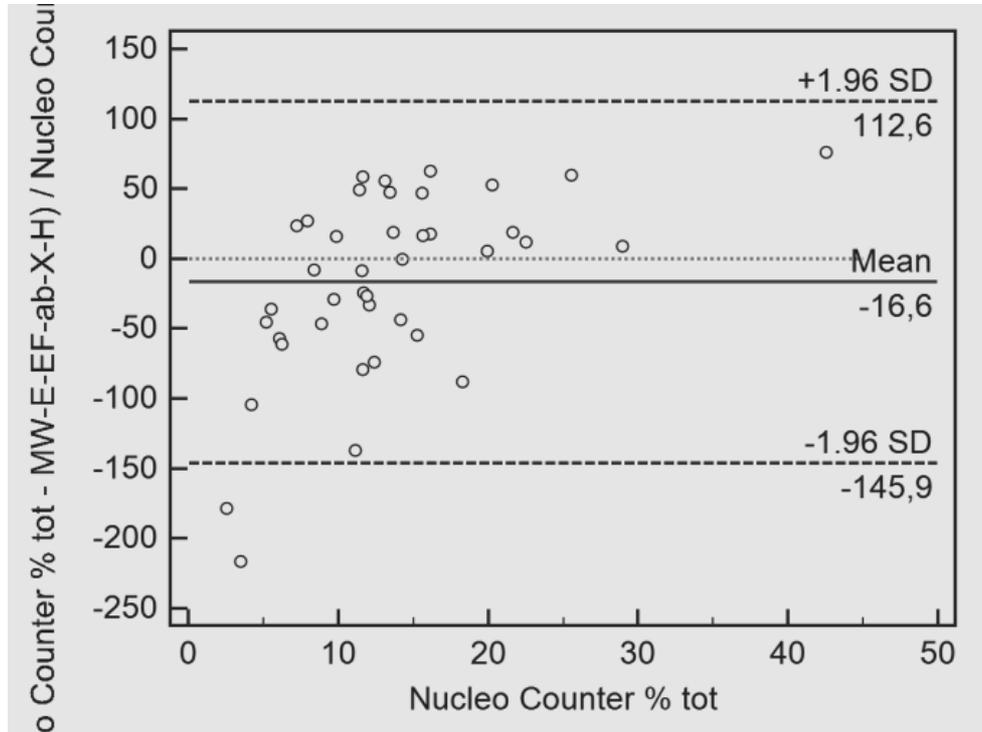
**Abbildung 11.29** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



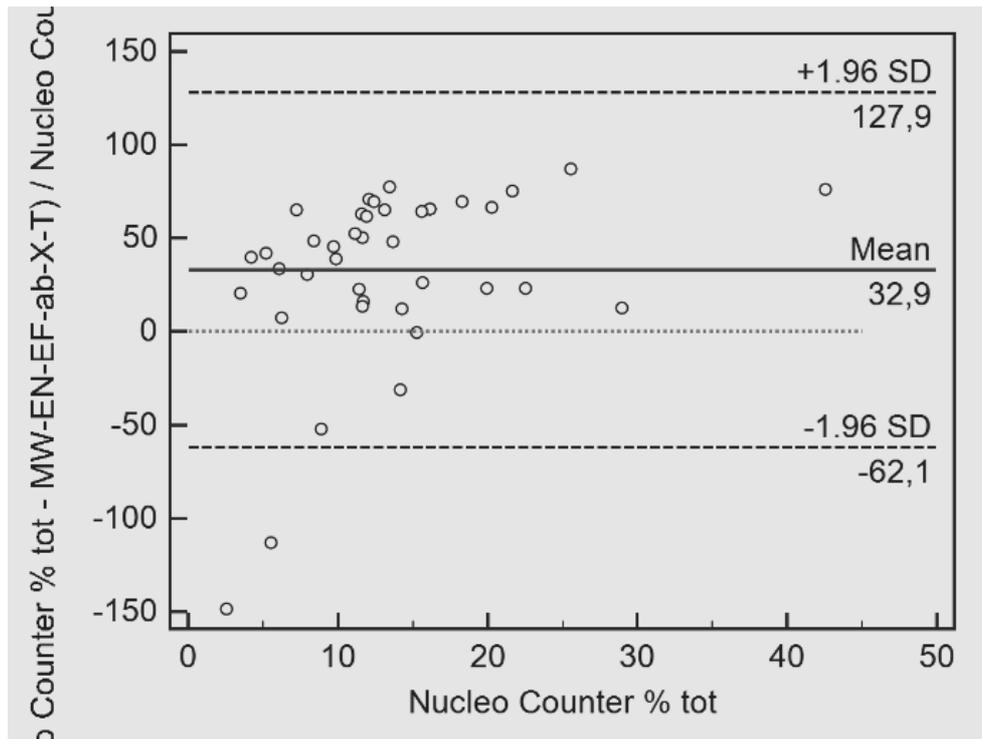
**Abbildung 11.30** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 1



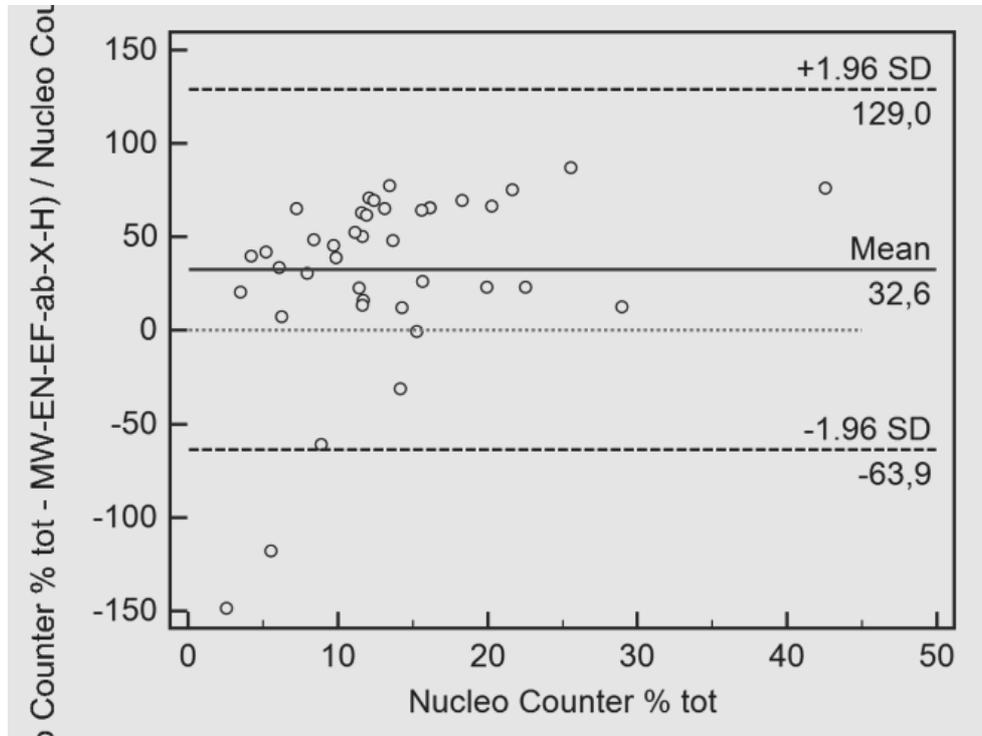
**Abbildung 11.31** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



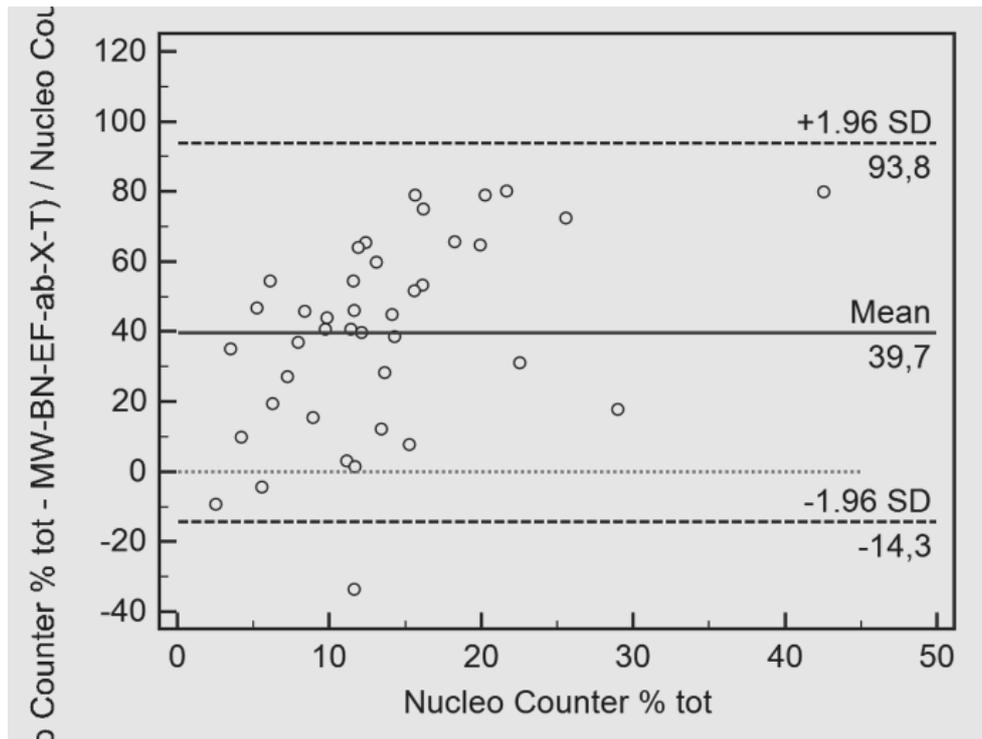
**Abbildung 11.32** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



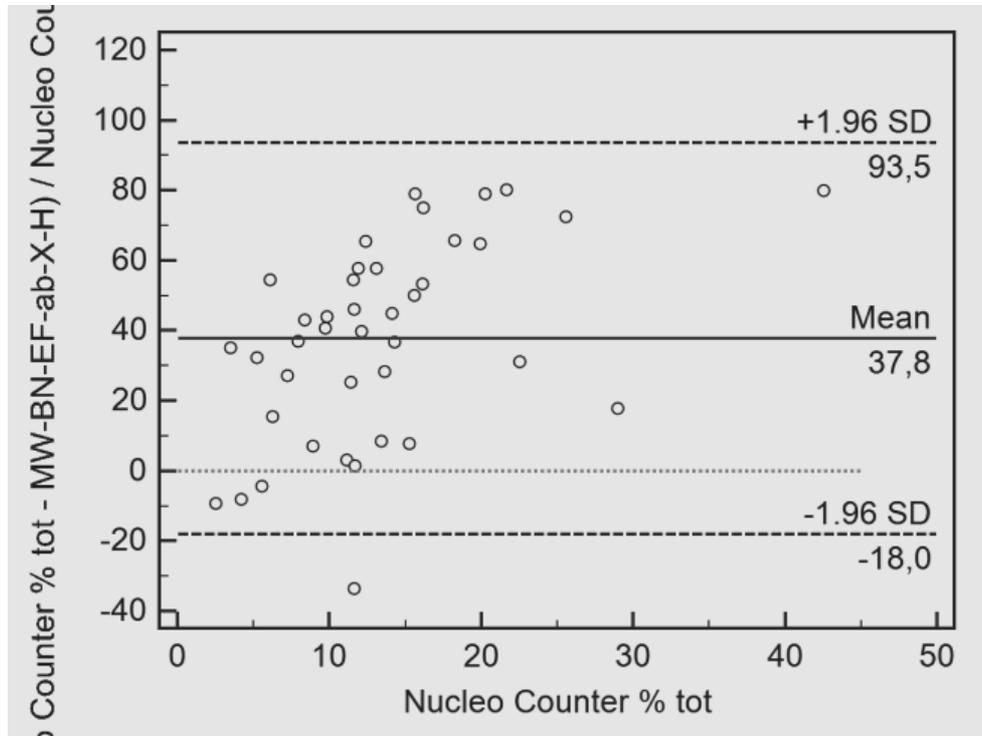
**Abbildung 11.33** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



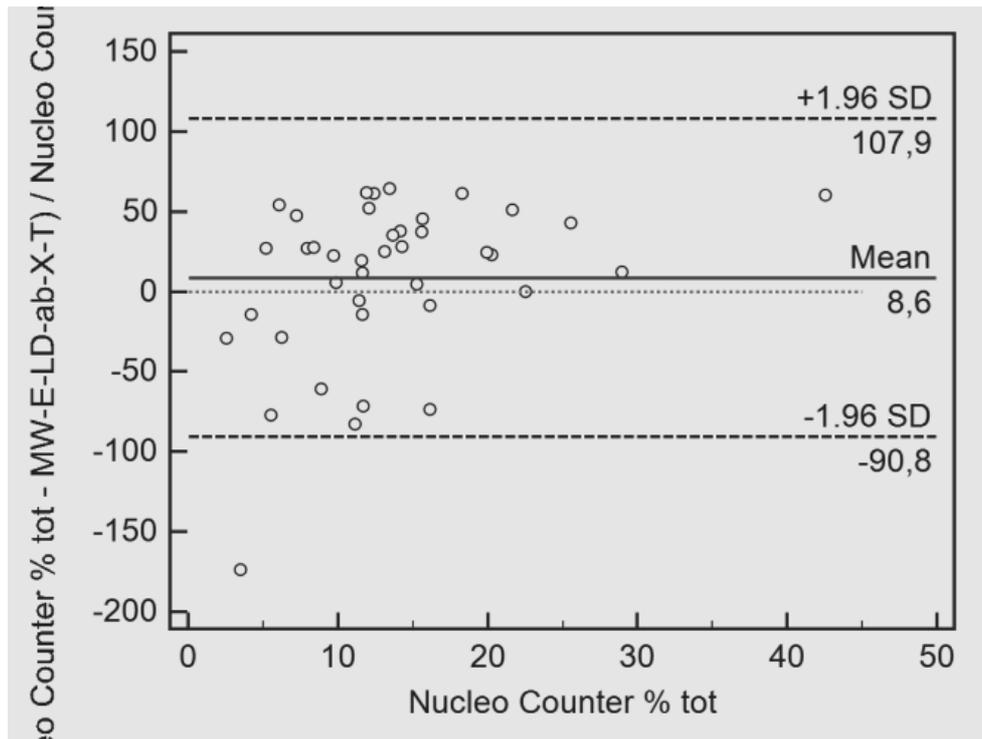
**Abbildung 11.34** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



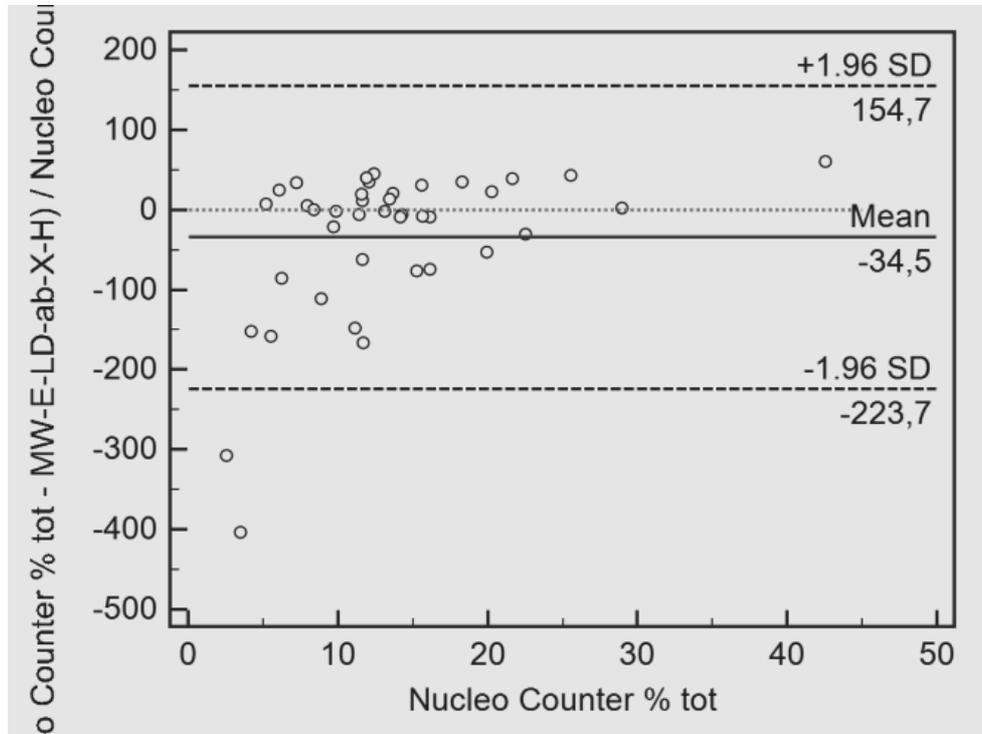
**Abbildung 11.35** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



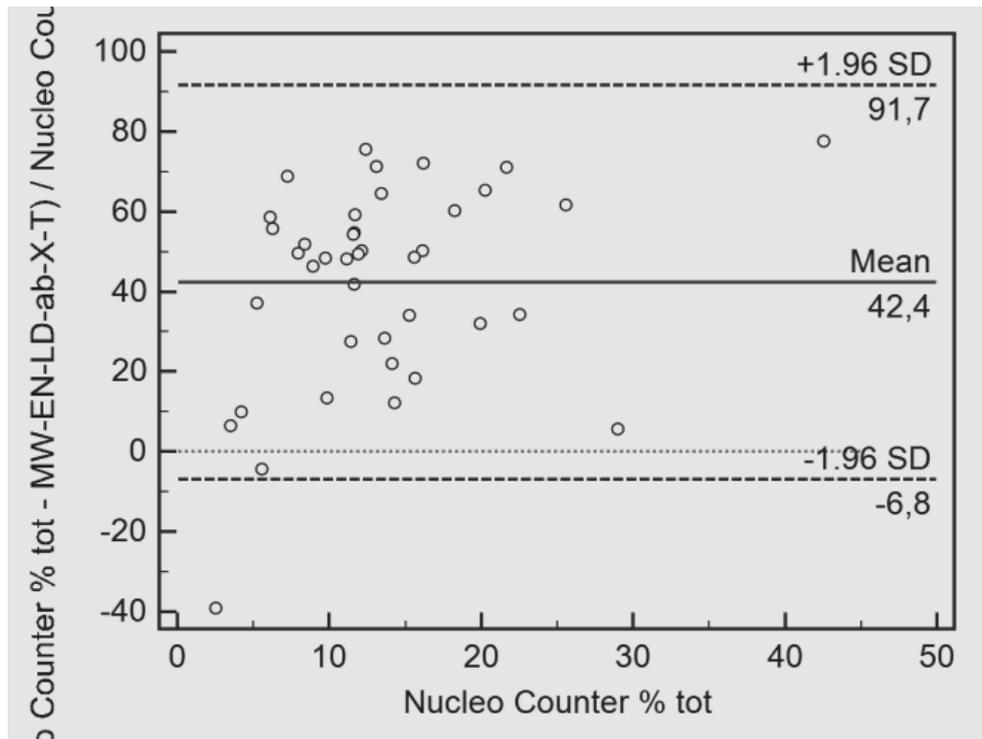
**Abbildung 11.36** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 2



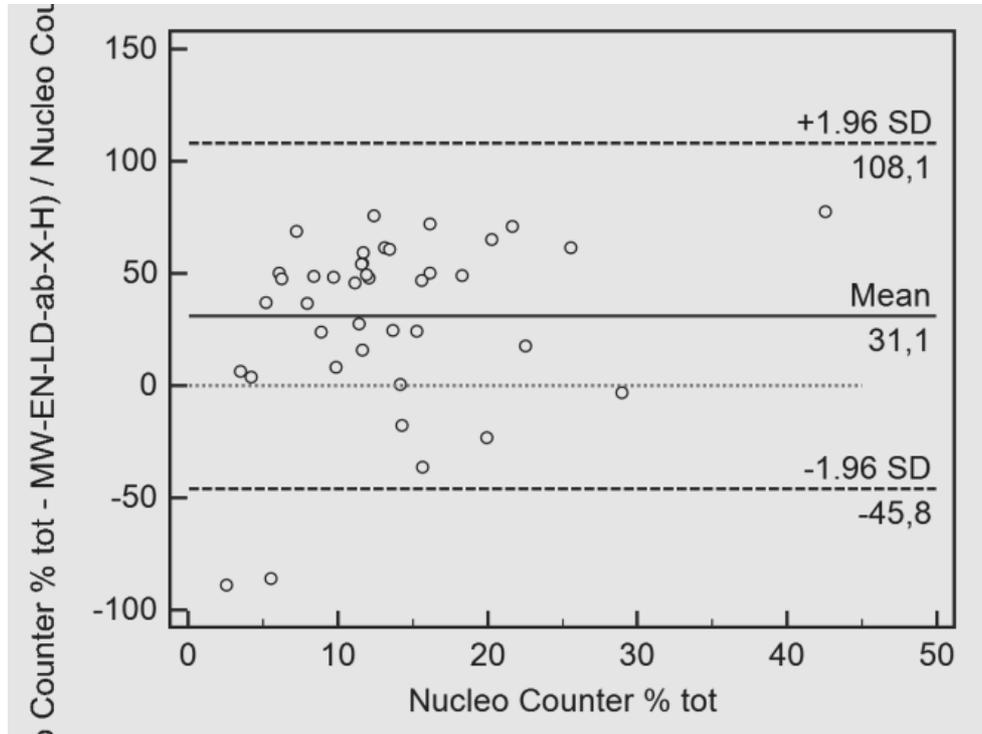
**Abbildung 11.37** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



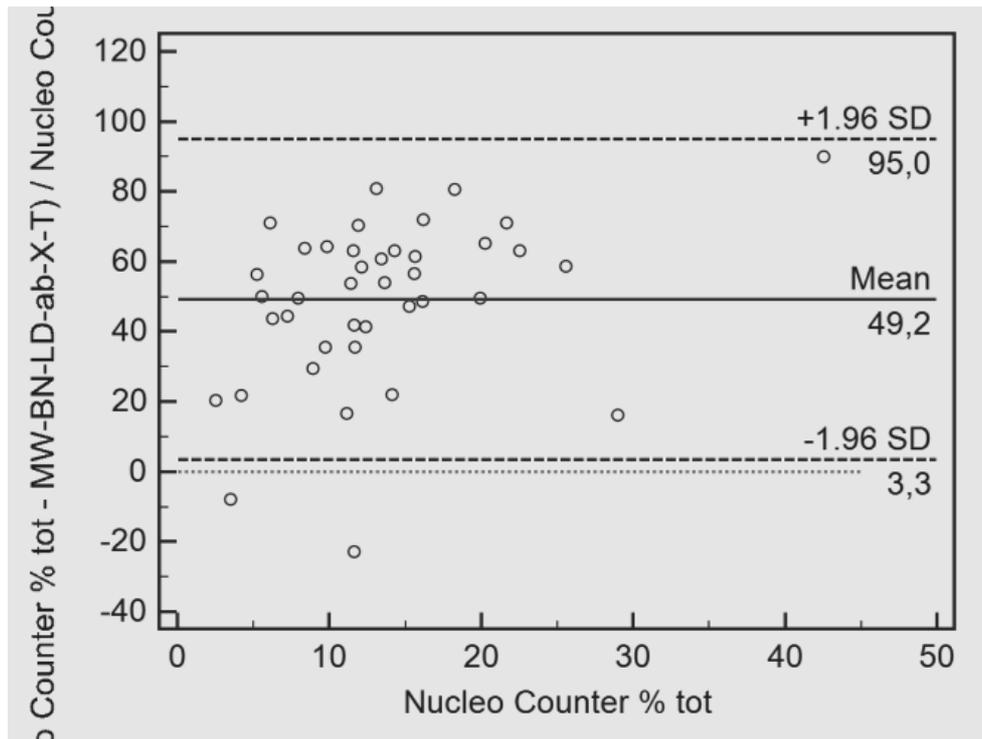
**Abbildung 11.38** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



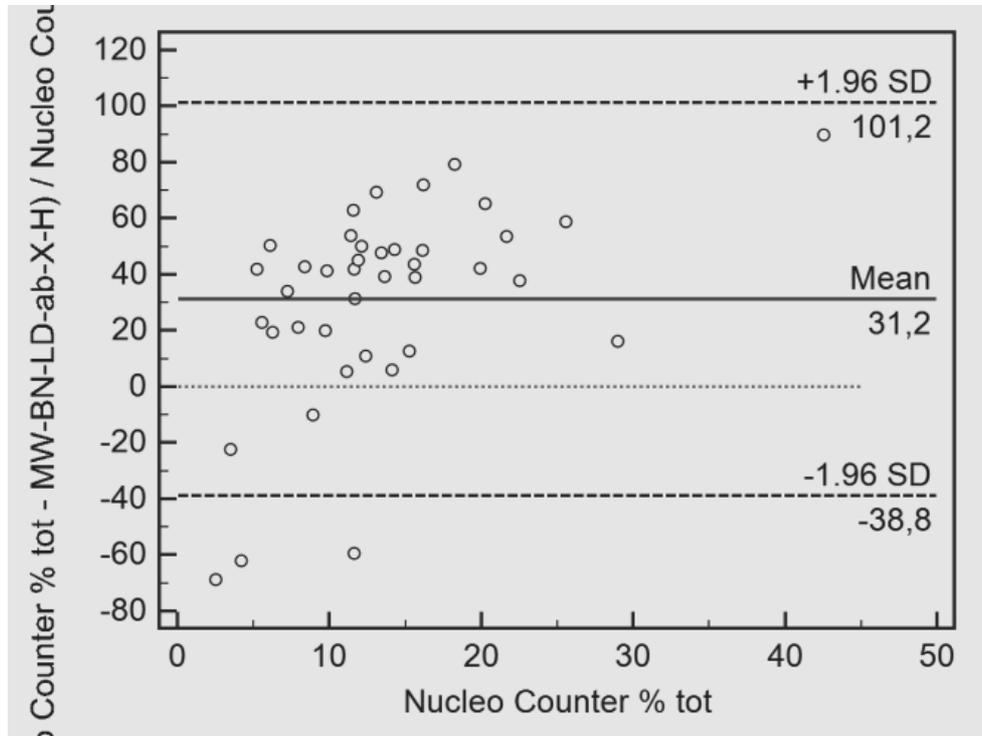
**Abbildung 11.39** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



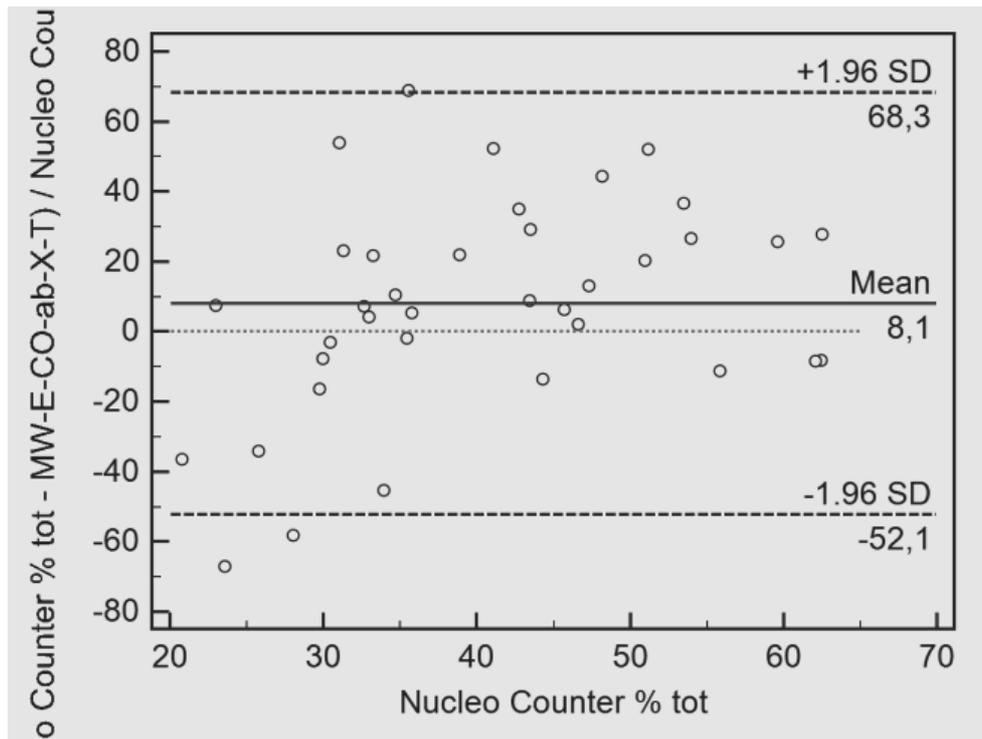
**Abbildung 11.40** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



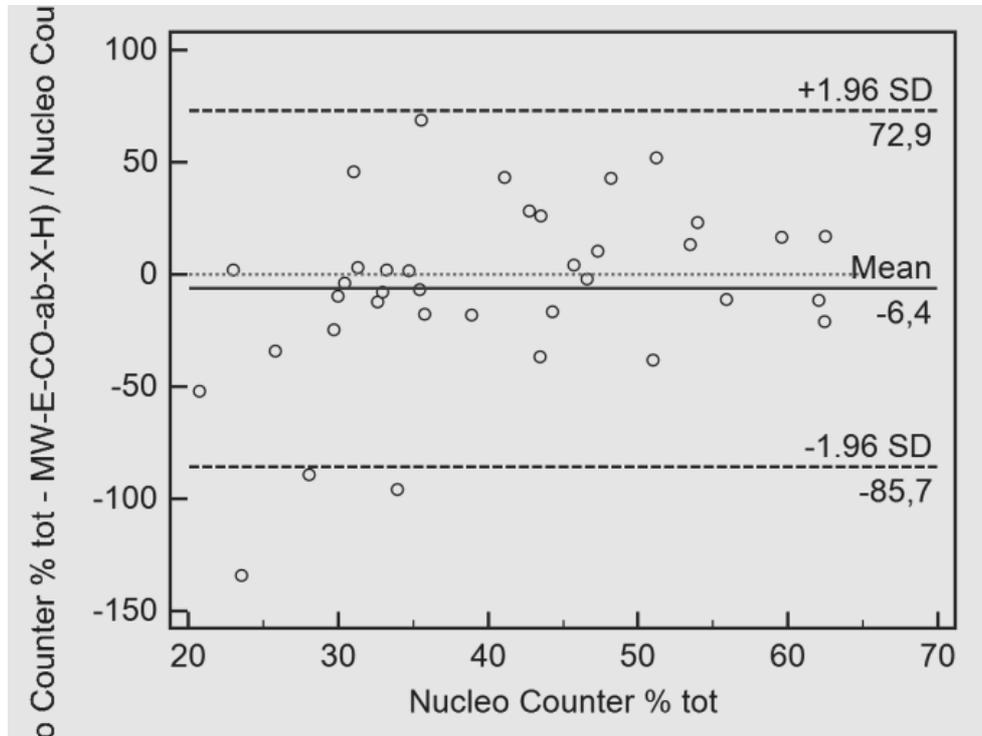
**Abbildung 11.41** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



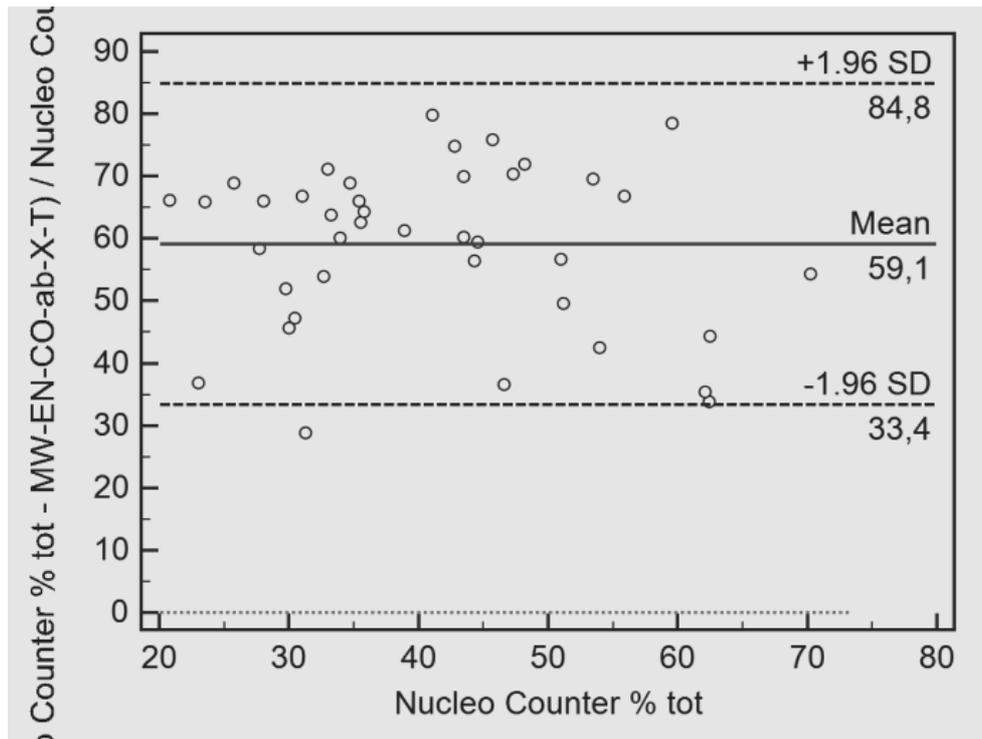
**Abbildung 11.42** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Frischsperma bei Untersucher 3



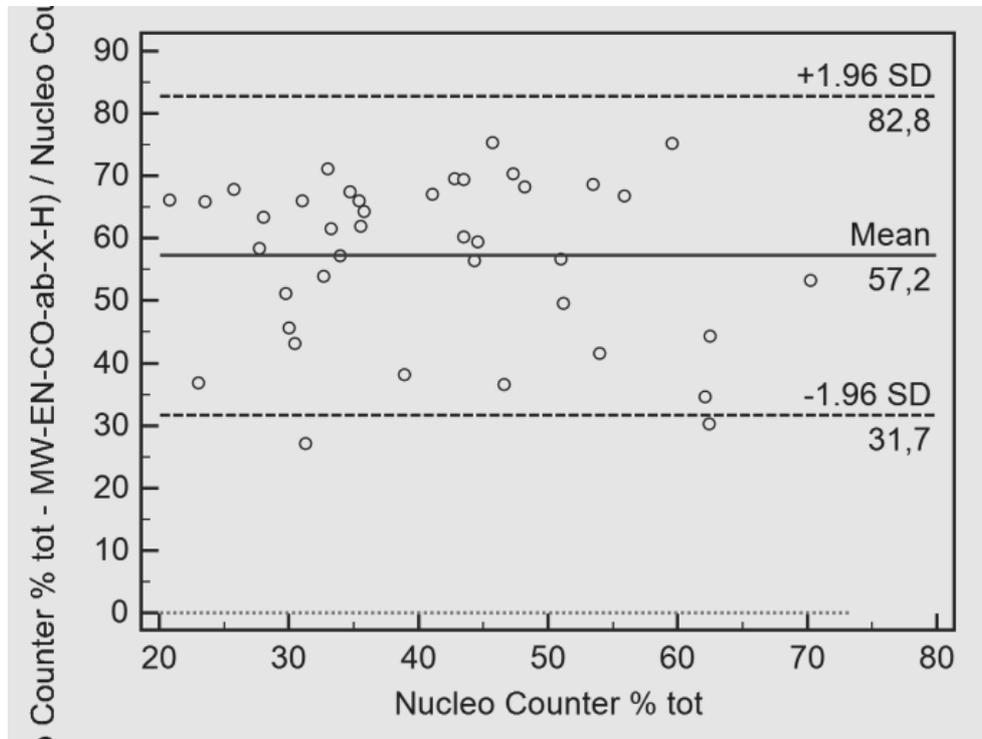
**Abbildung 11.43** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



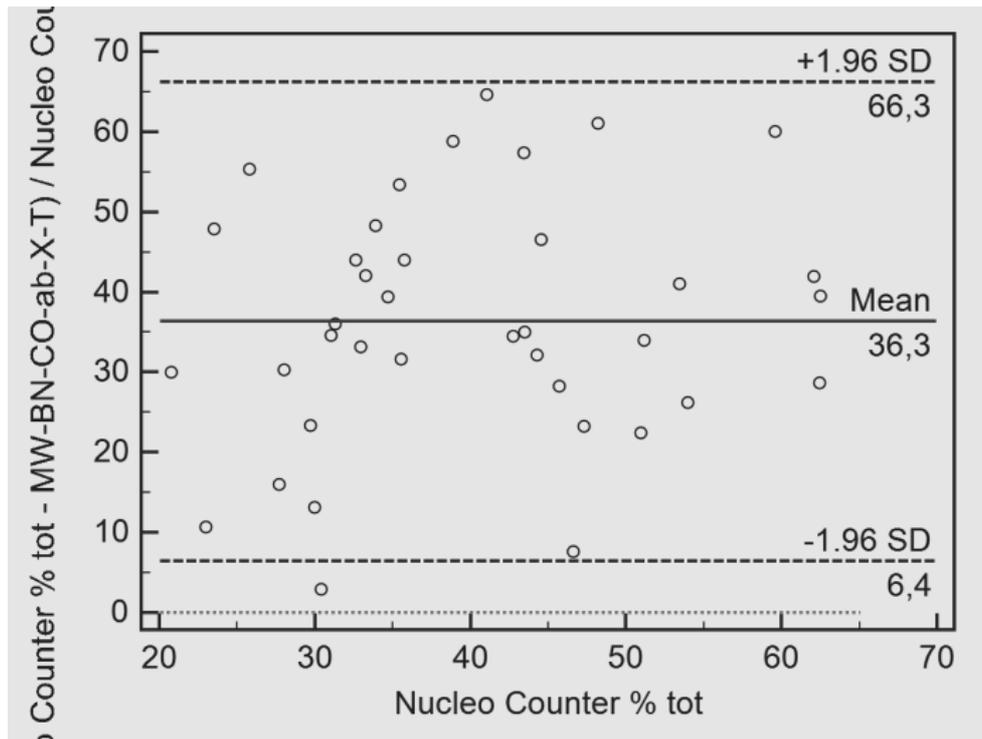
**Abbildung 11.44** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



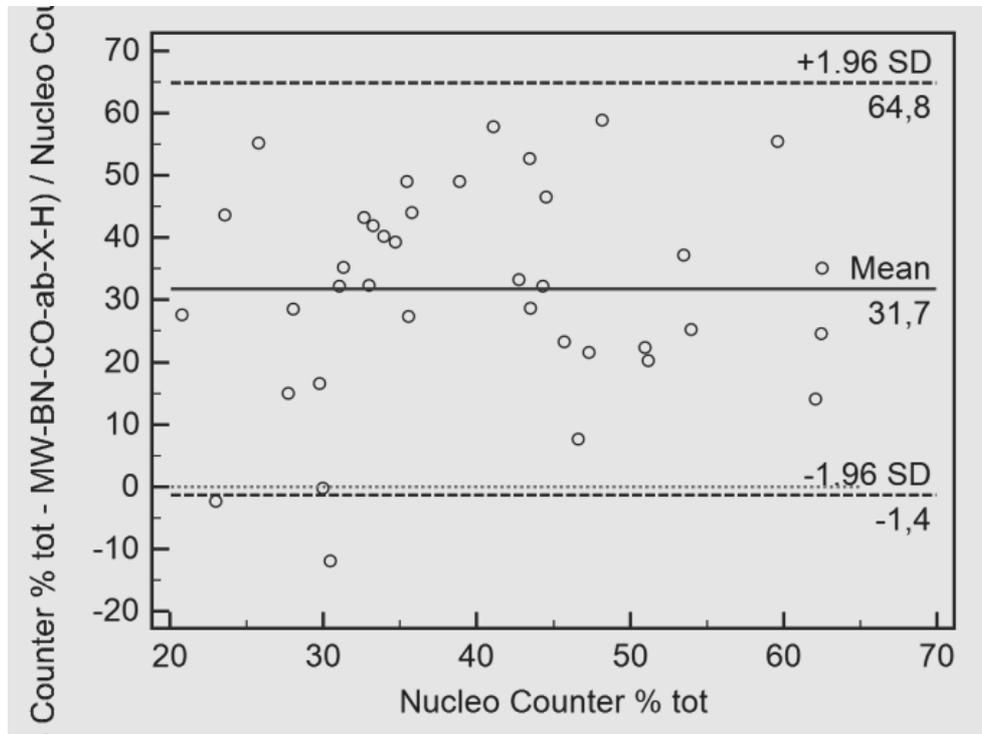
**Abbildung 11.45** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



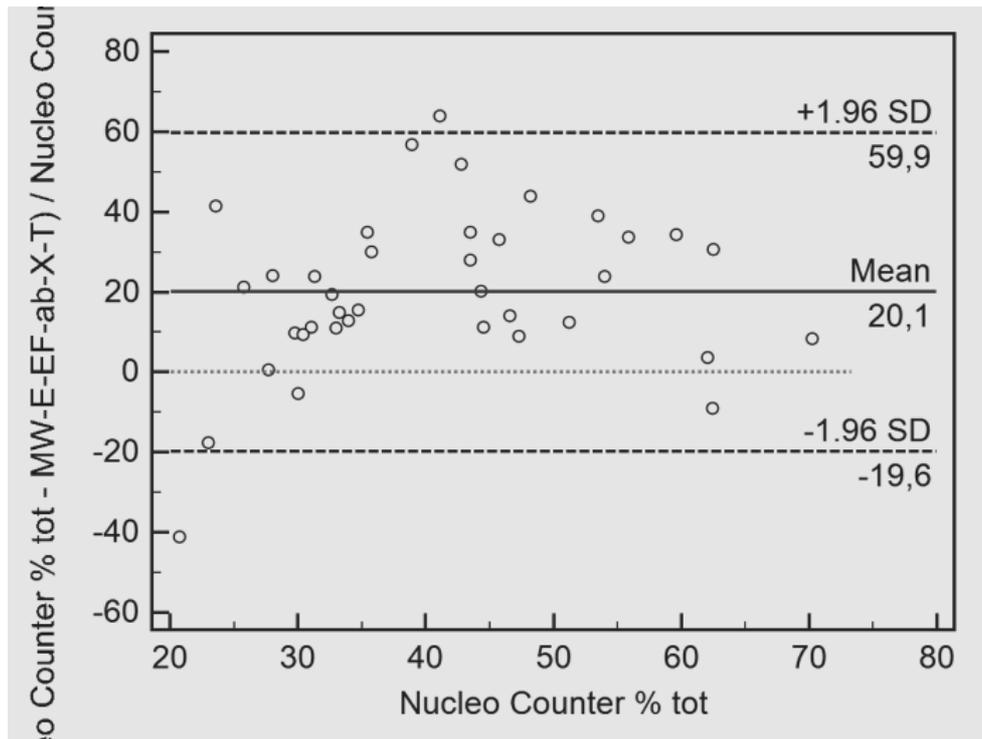
**Abbildung 11.46** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



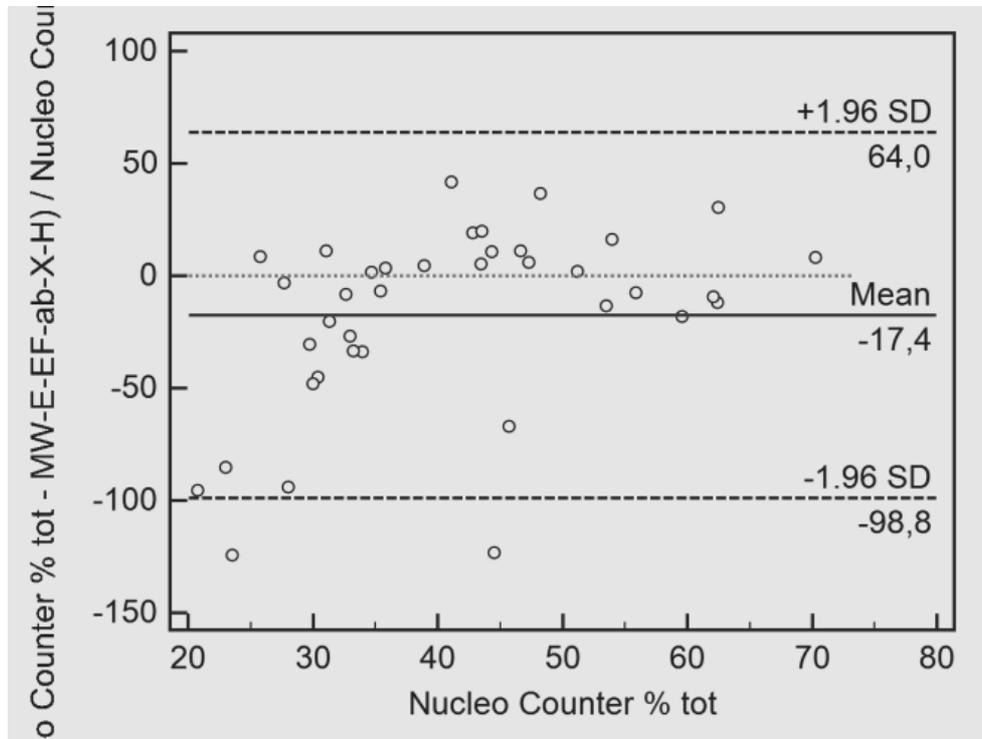
**Abbildung 11.47** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



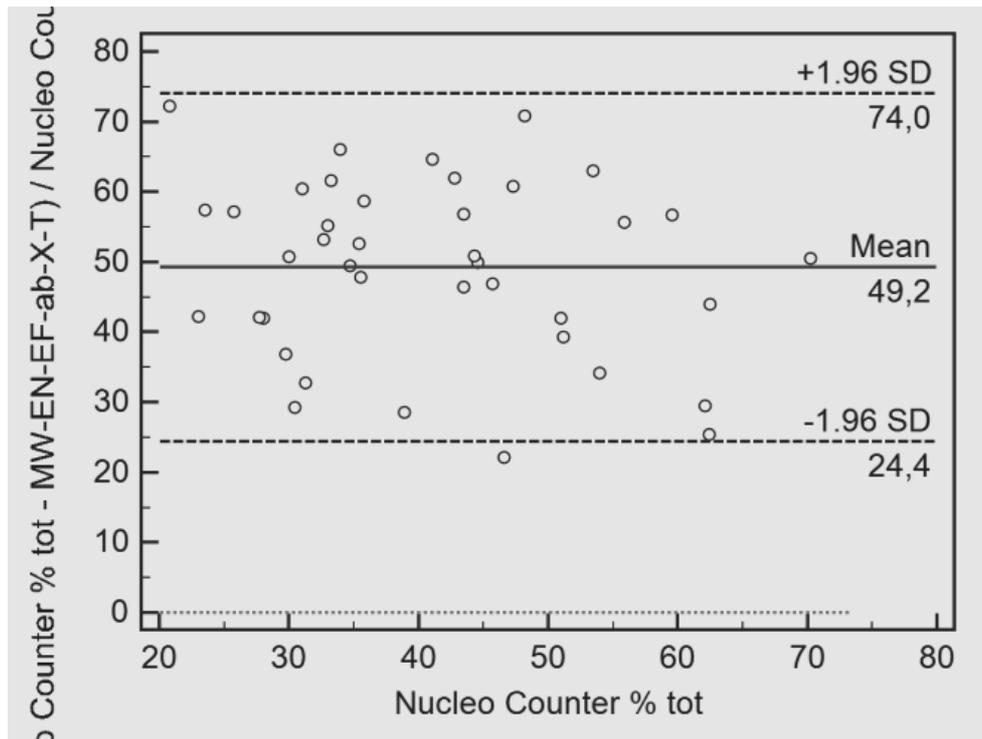
**Abbildung 11.48** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



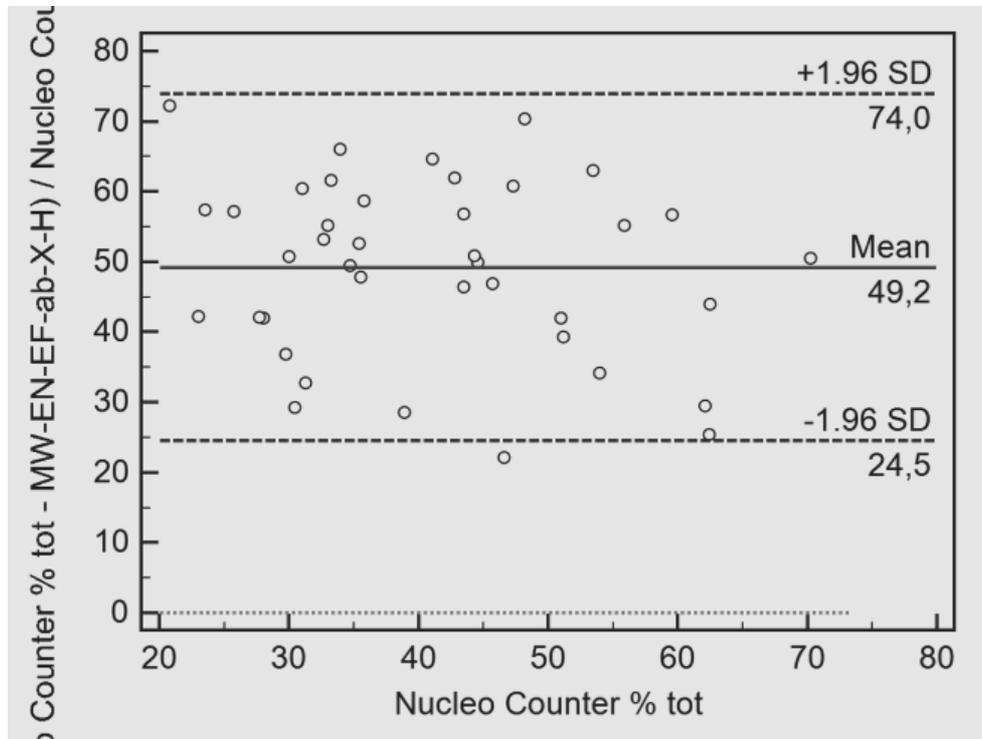
**Abbildung 11.49** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



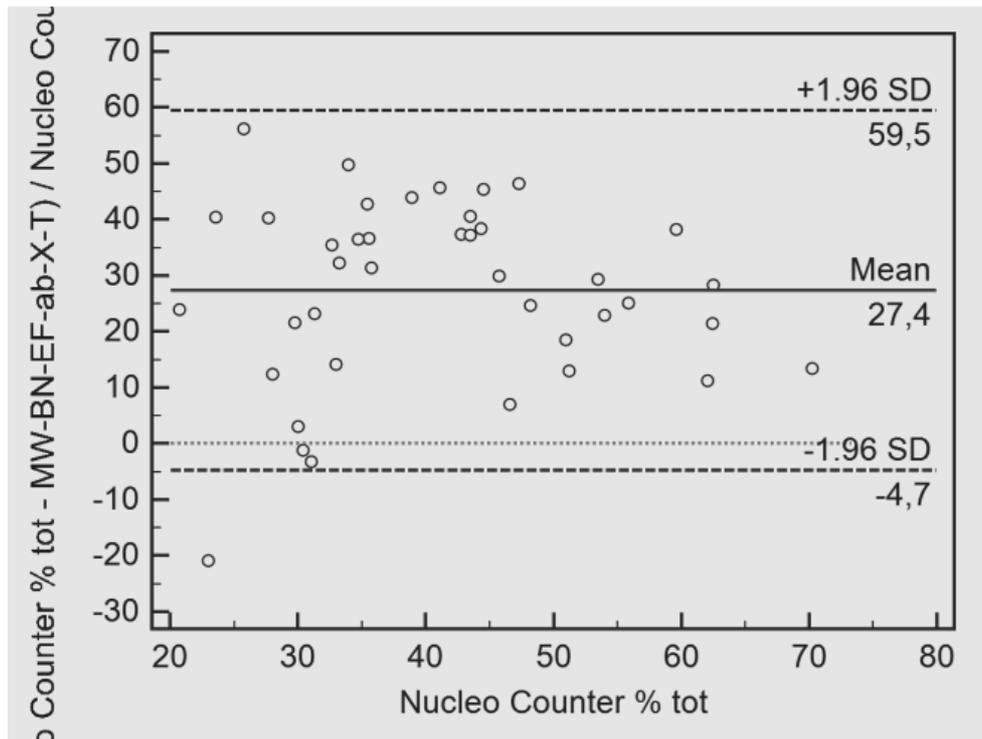
**Abbildung 11.50** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



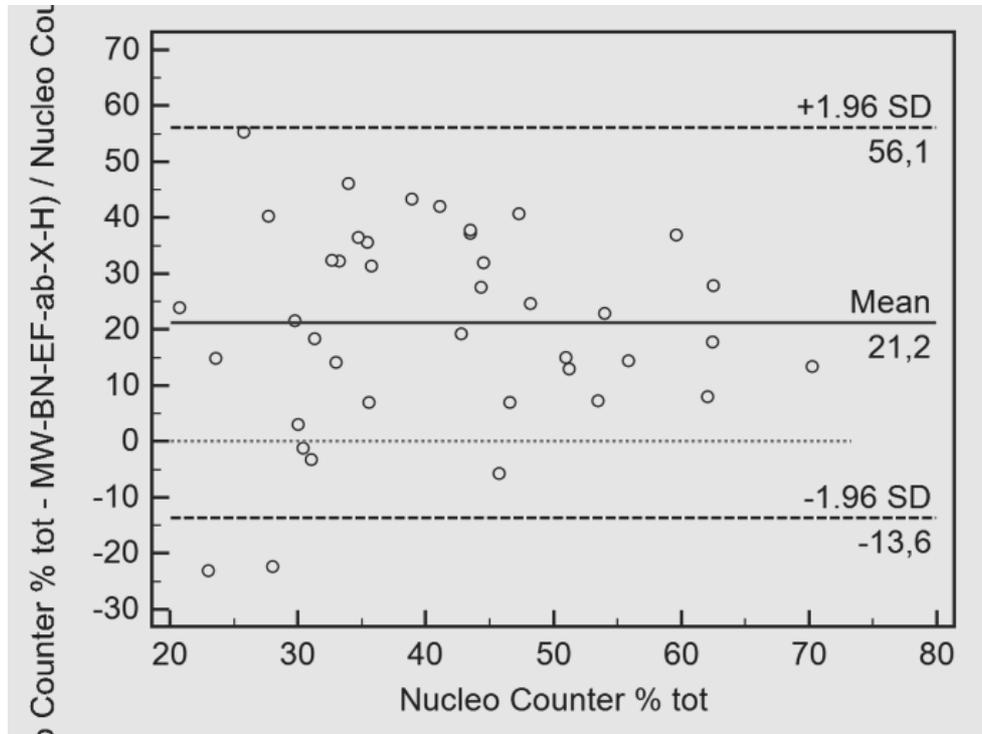
**Abbildung 11.51** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



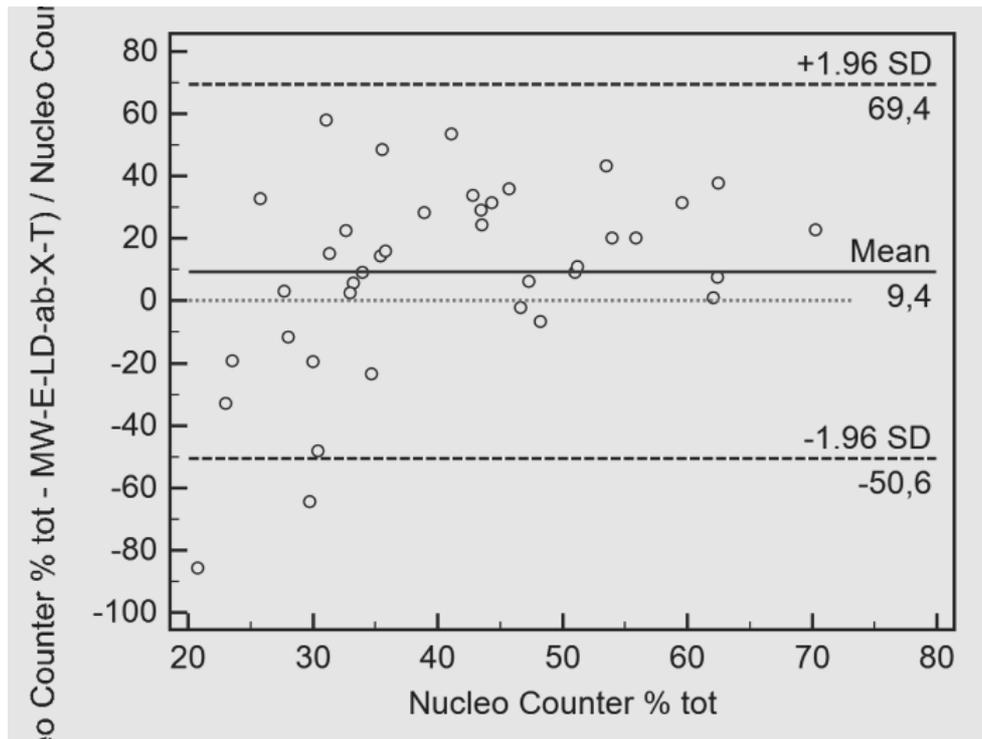
**Abbildung 11.52** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



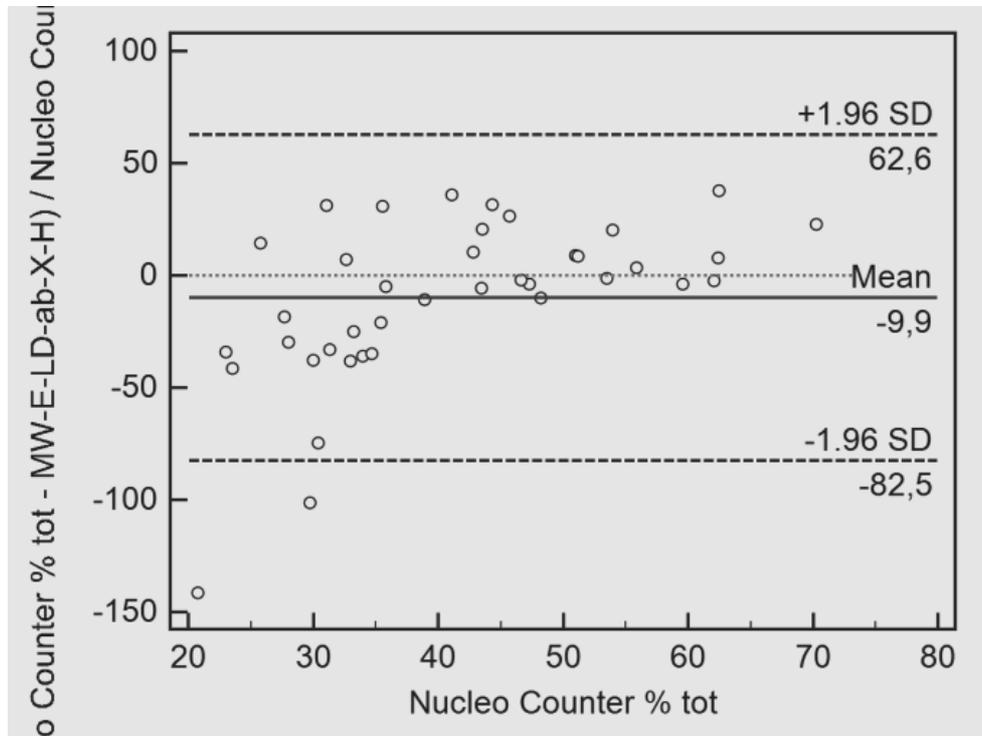
**Abbildung 11.53** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



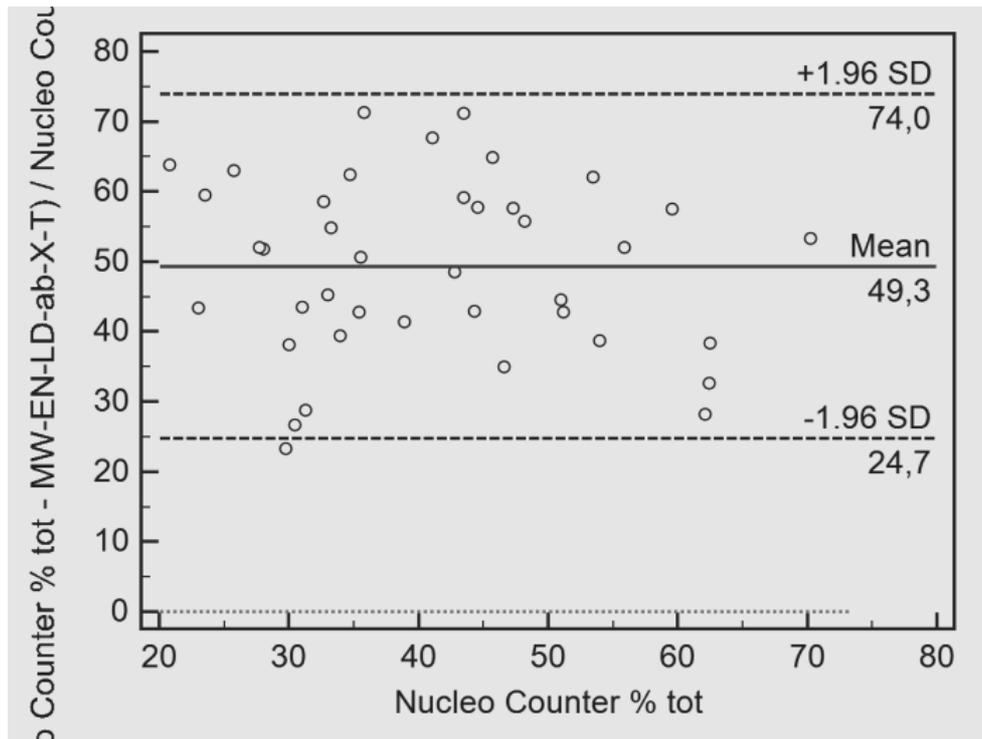
**Abbildung 11.54** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



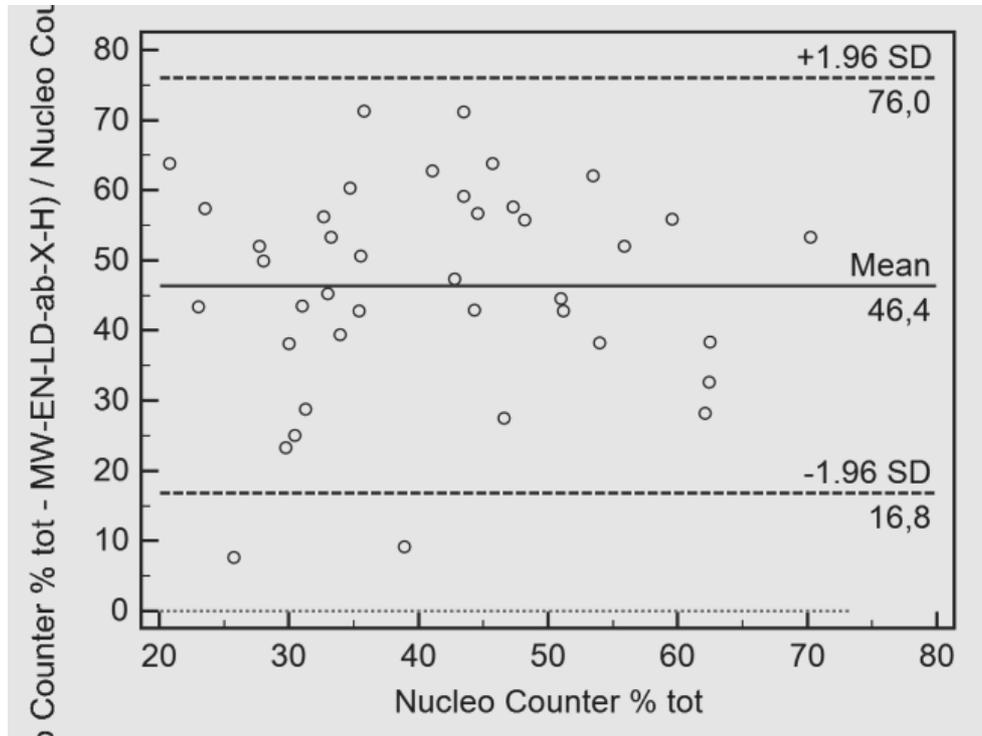
**Abbildung 11.55** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



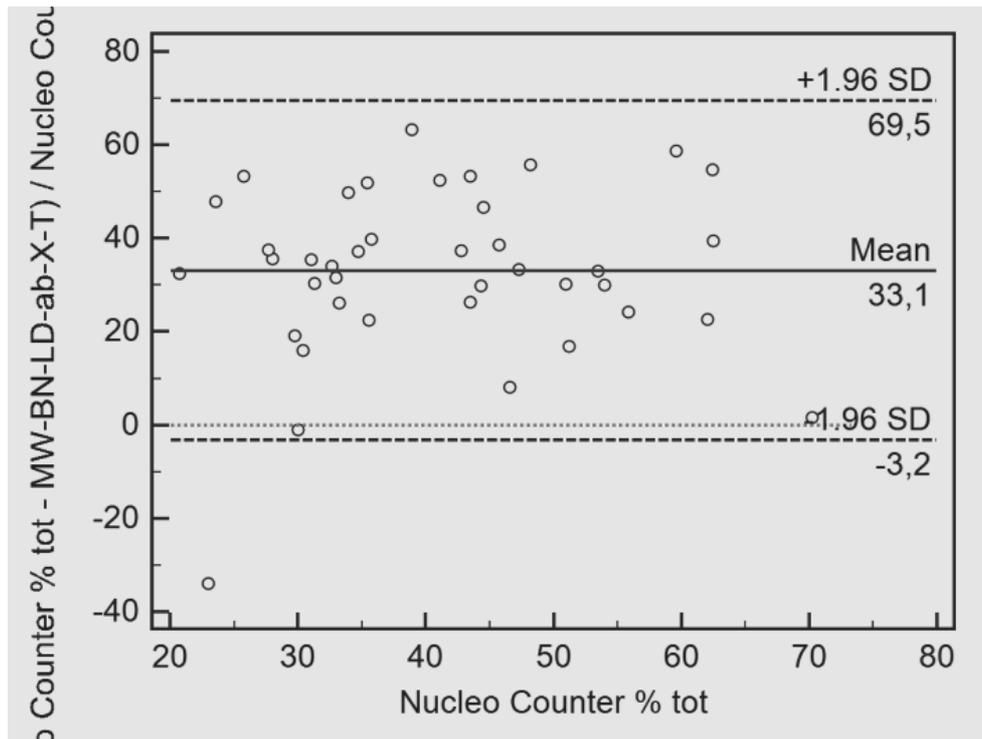
**Abbildung 11.56** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



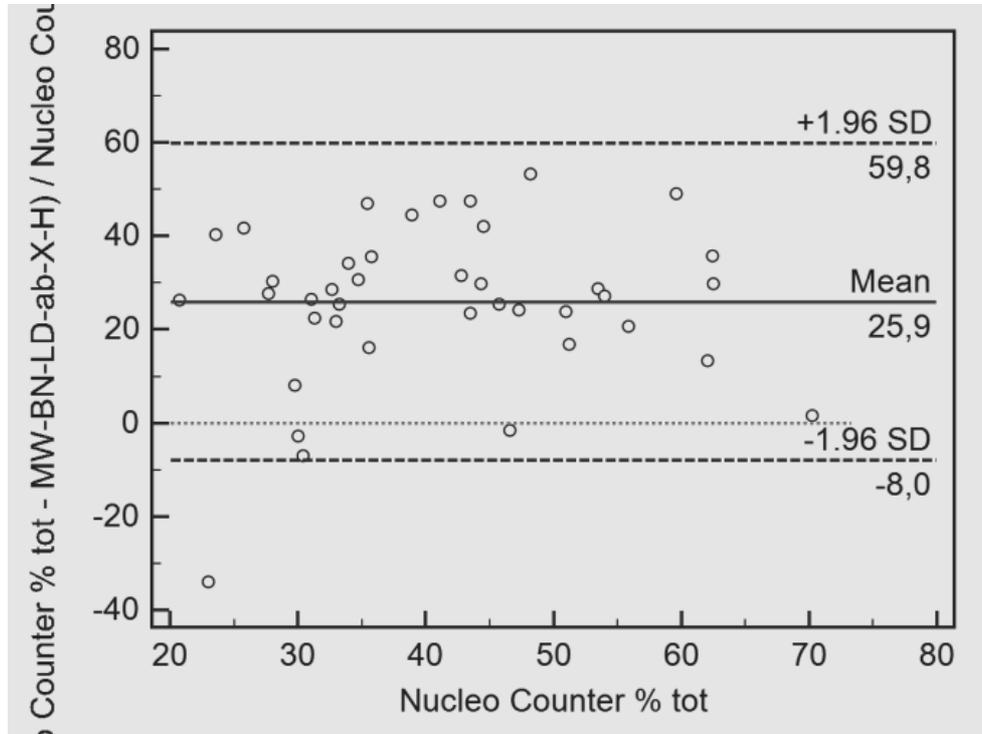
**Abbildung 11.57** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



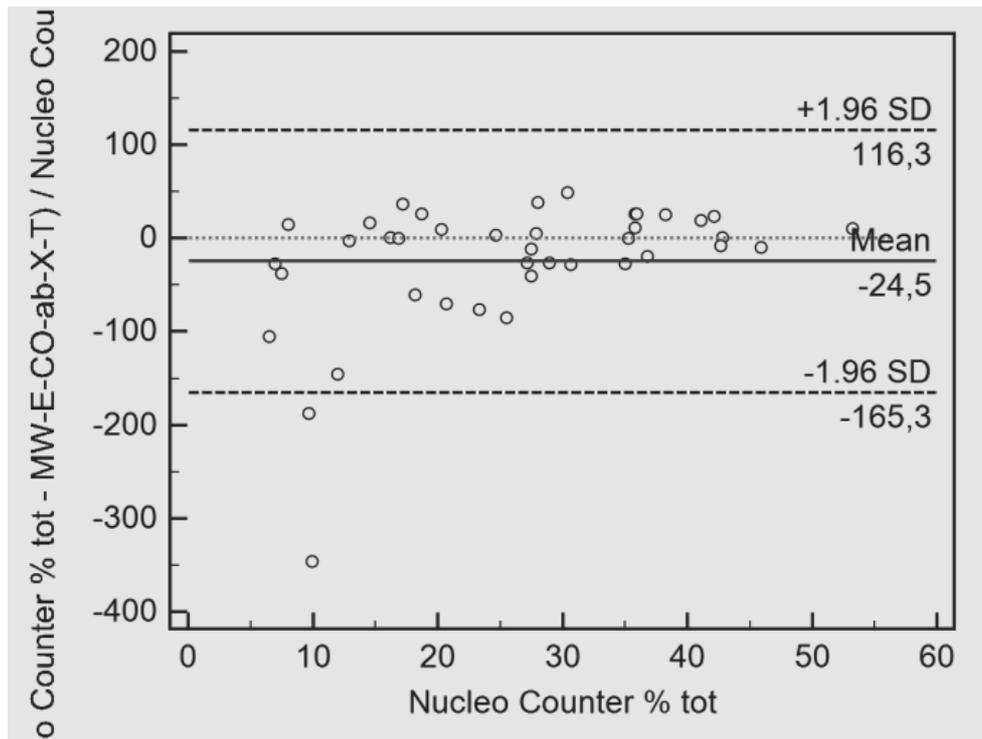
**Abbildung 11.58** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



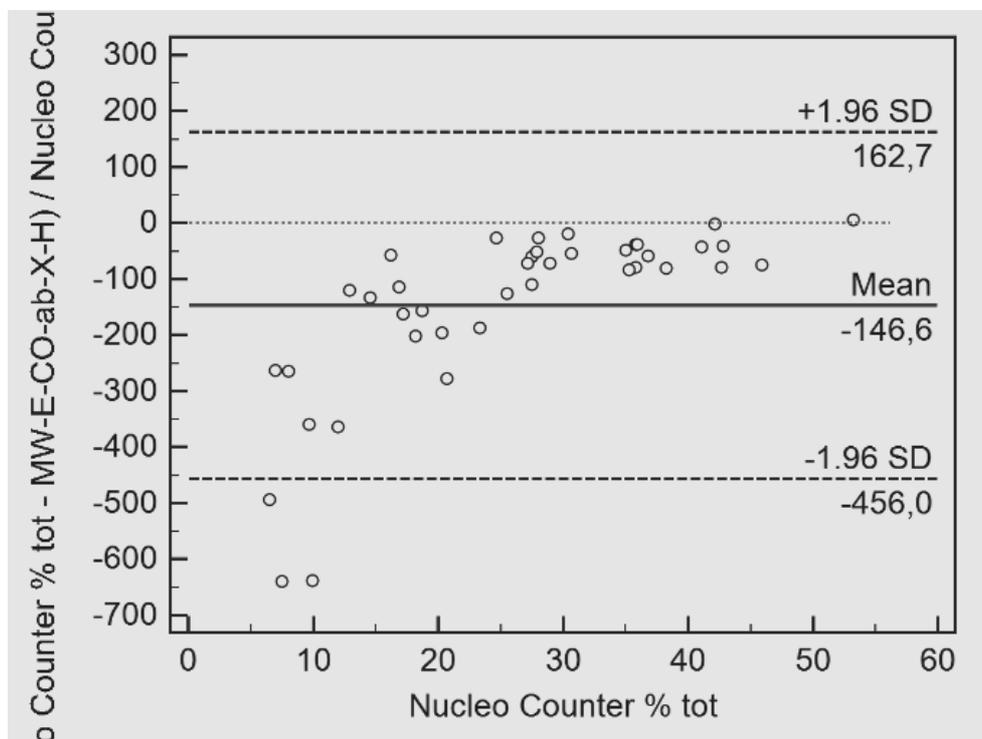
**Abbildung 11.59** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



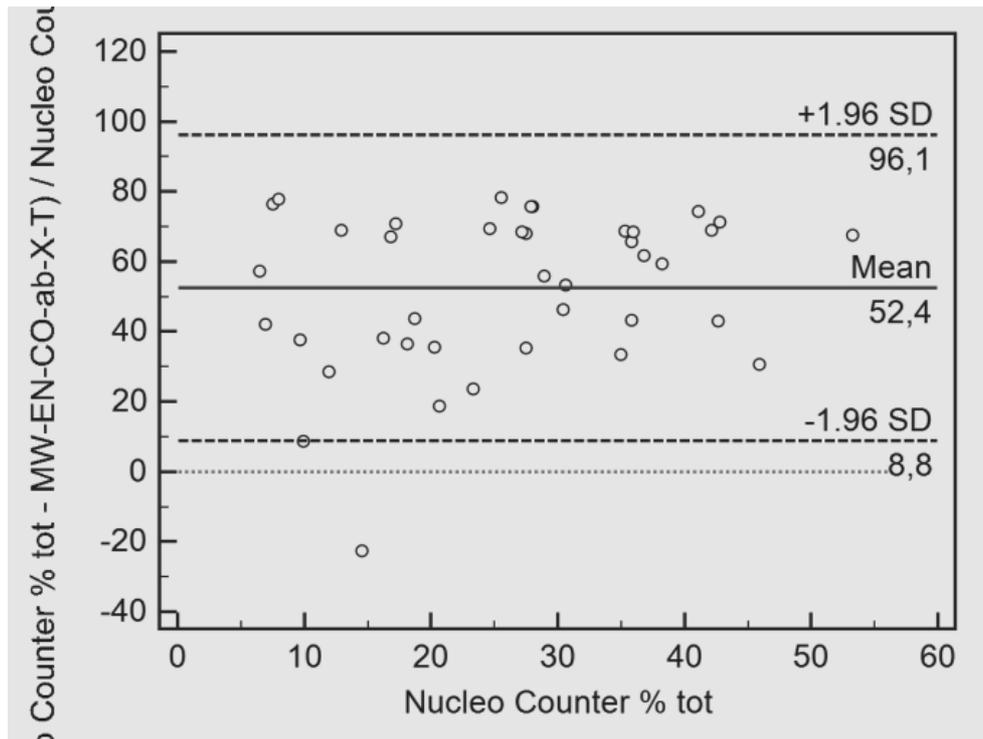
**Abbildung 11.60** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Rüde Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



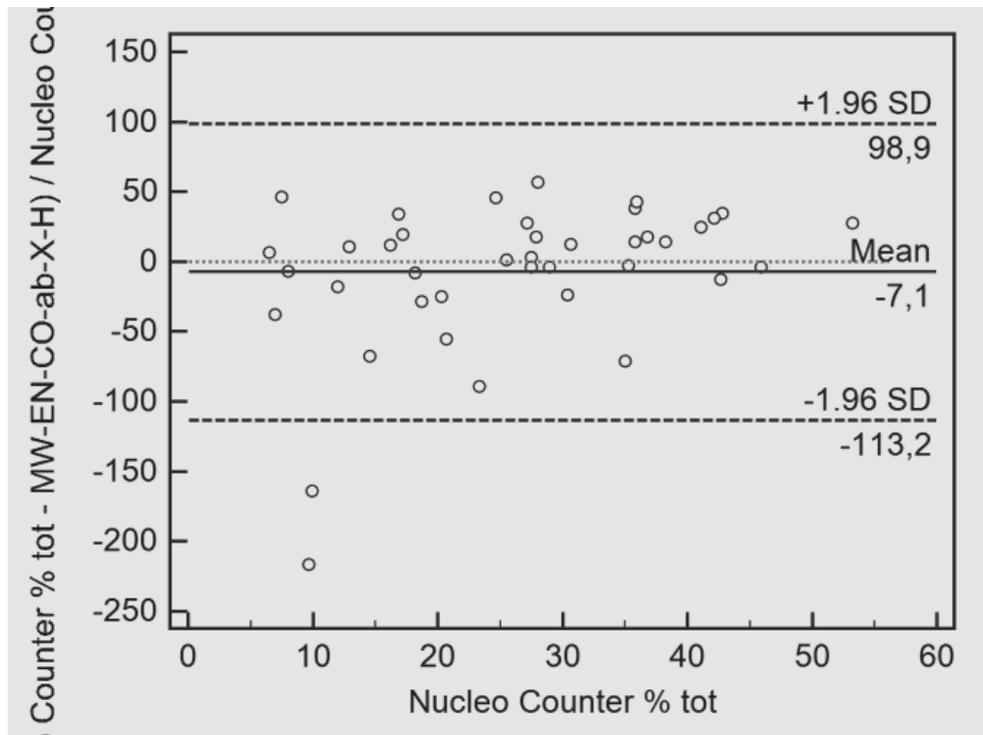
**Abbildung 11.61** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



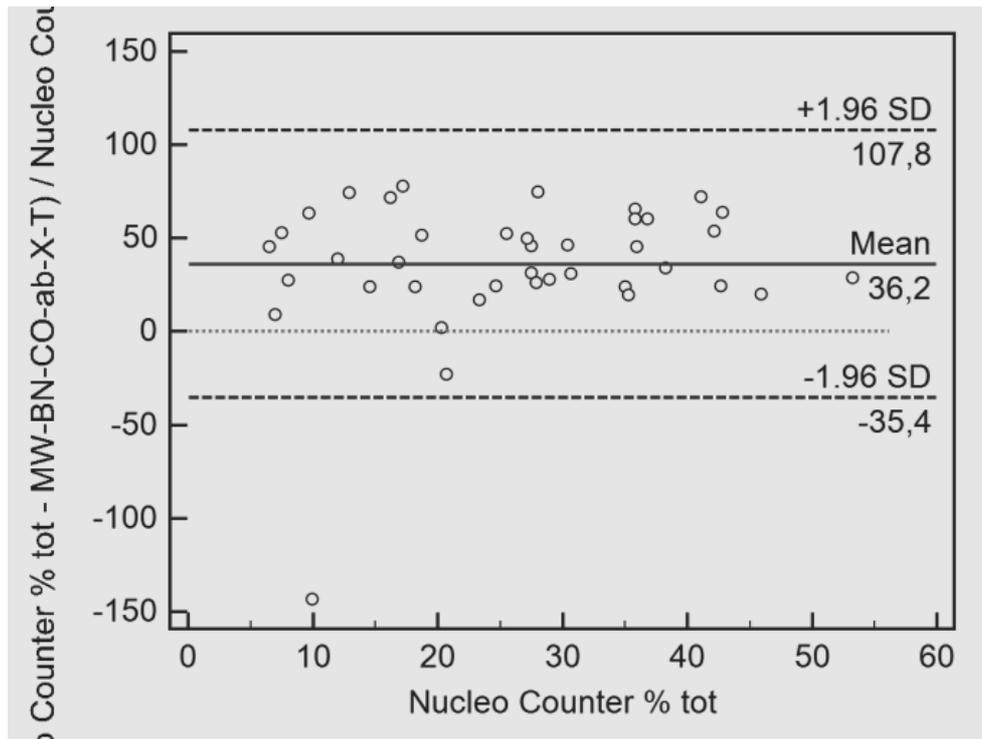
**Abbildung 11.62** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



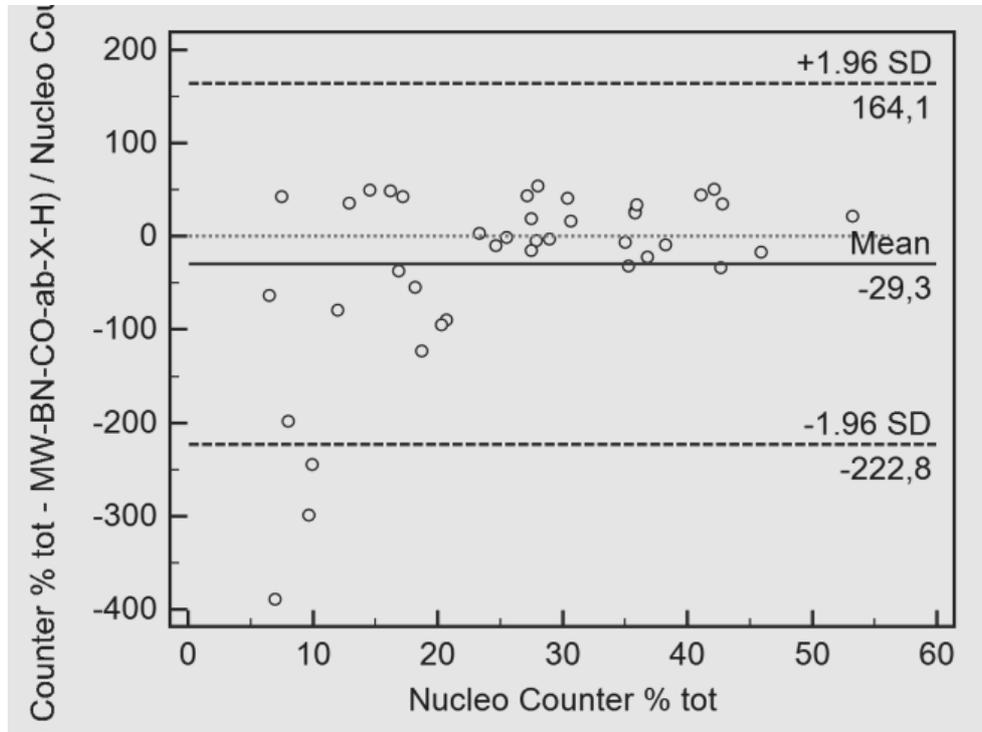
**Abbildung 11.63** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



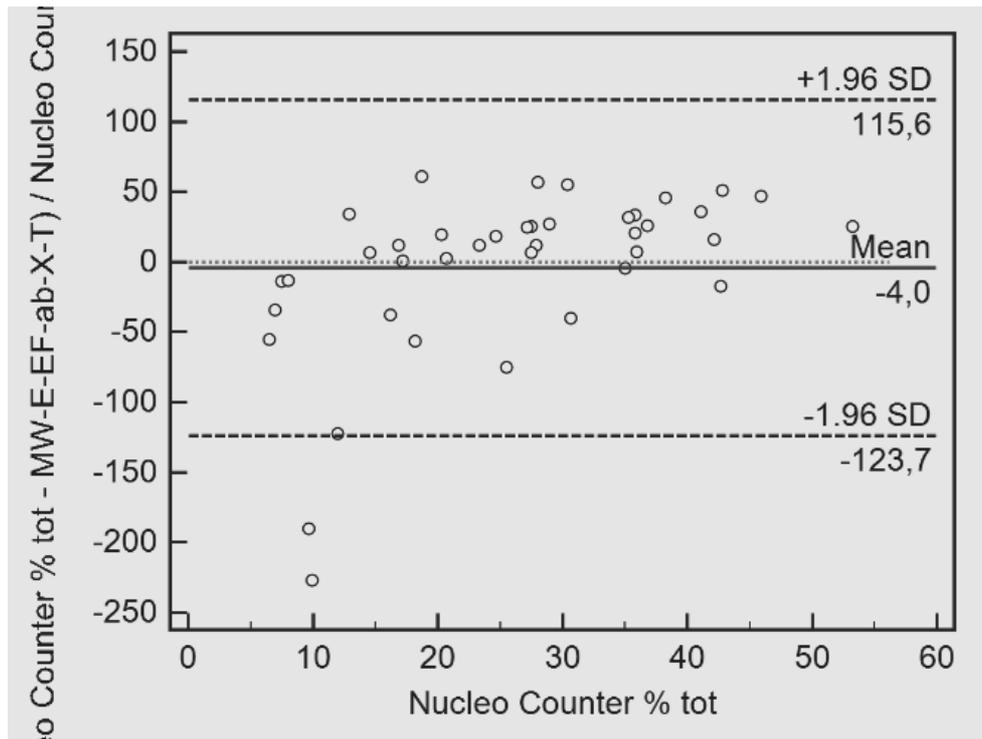
**Abbildung 11.64** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



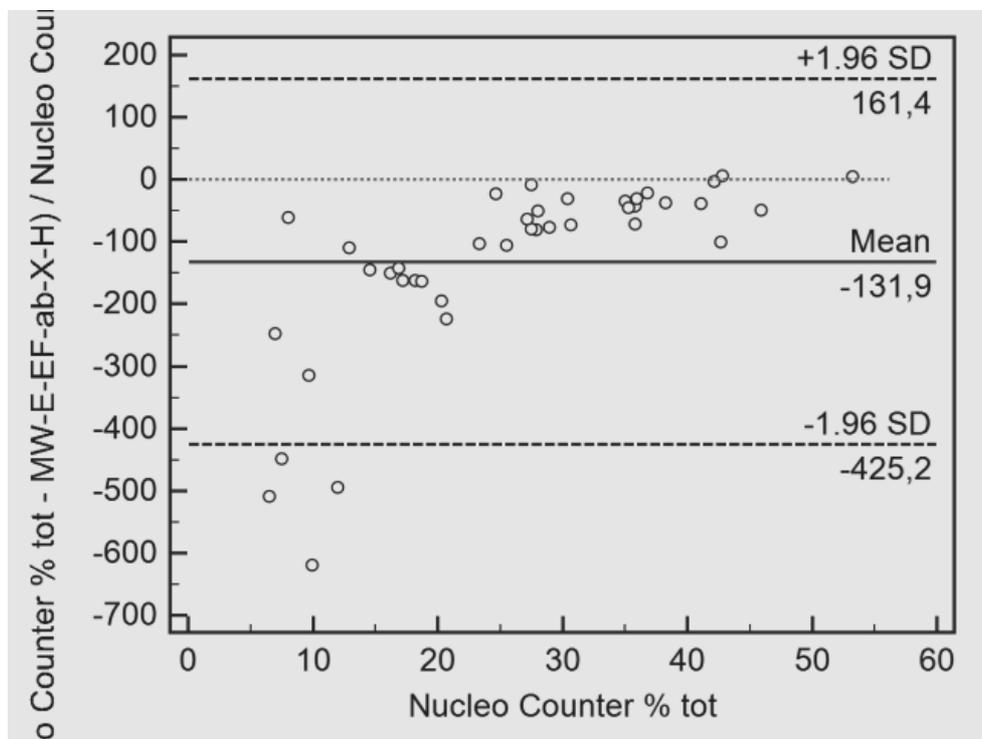
**Abbildung 11.65** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



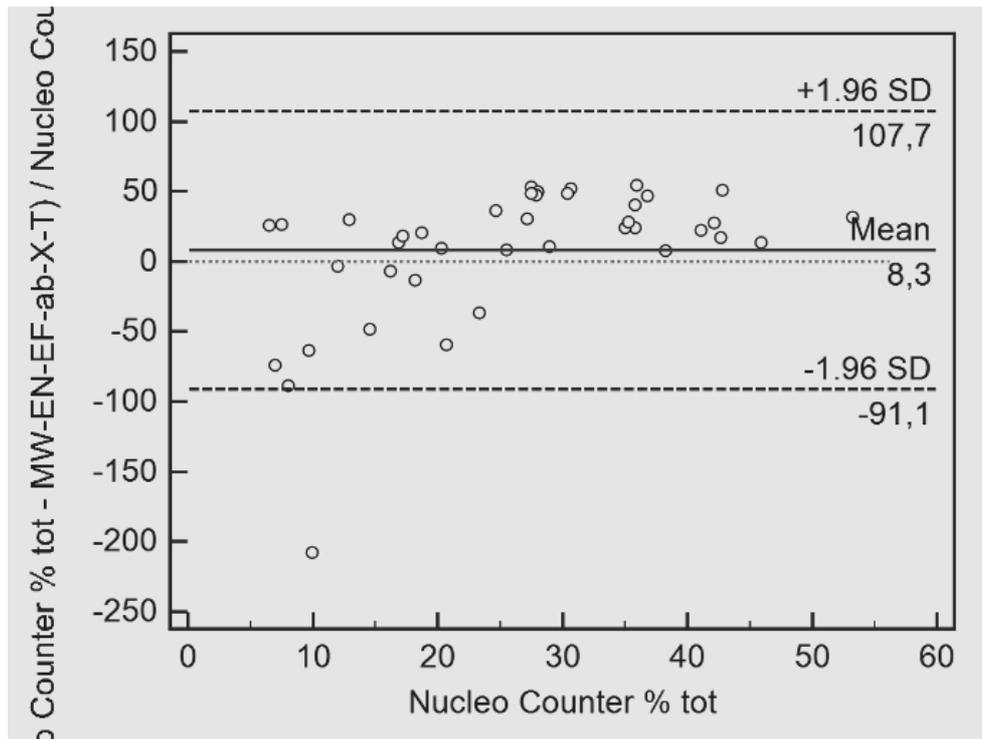
**Abbildung 11.66** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 1



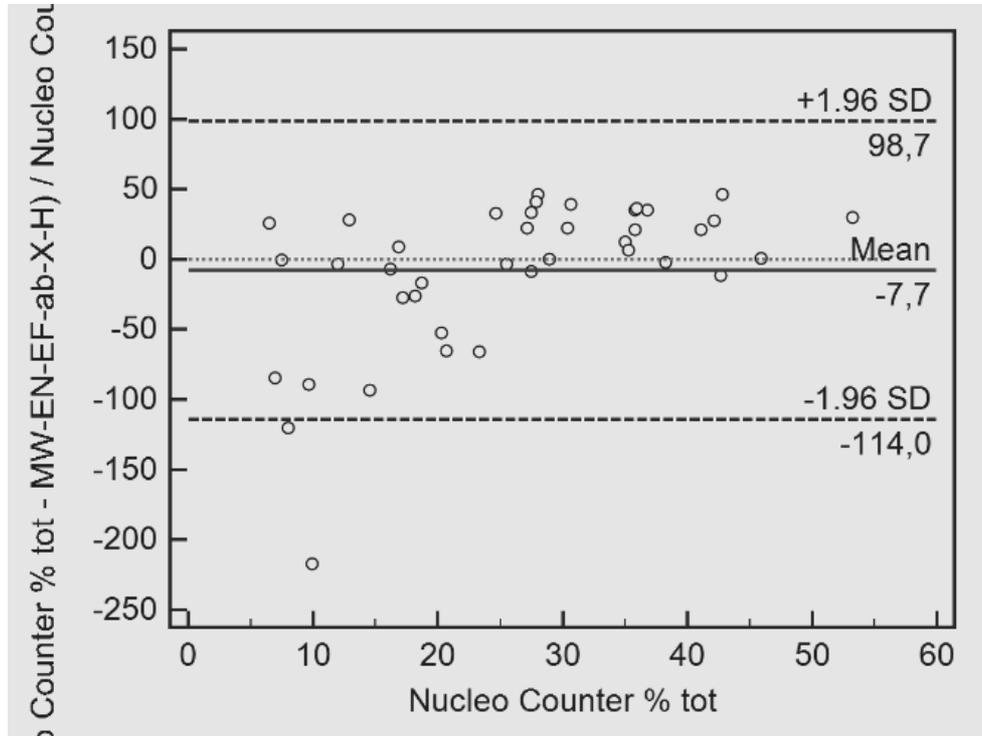
**Abbildung 11.67** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



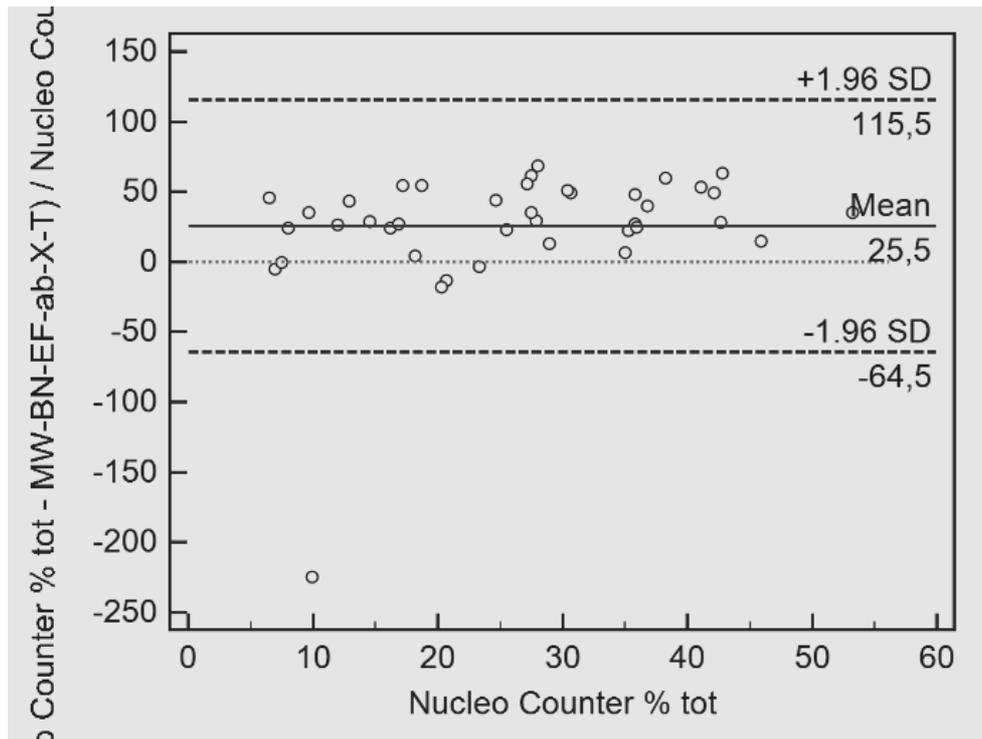
**Abbildung 11.68** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



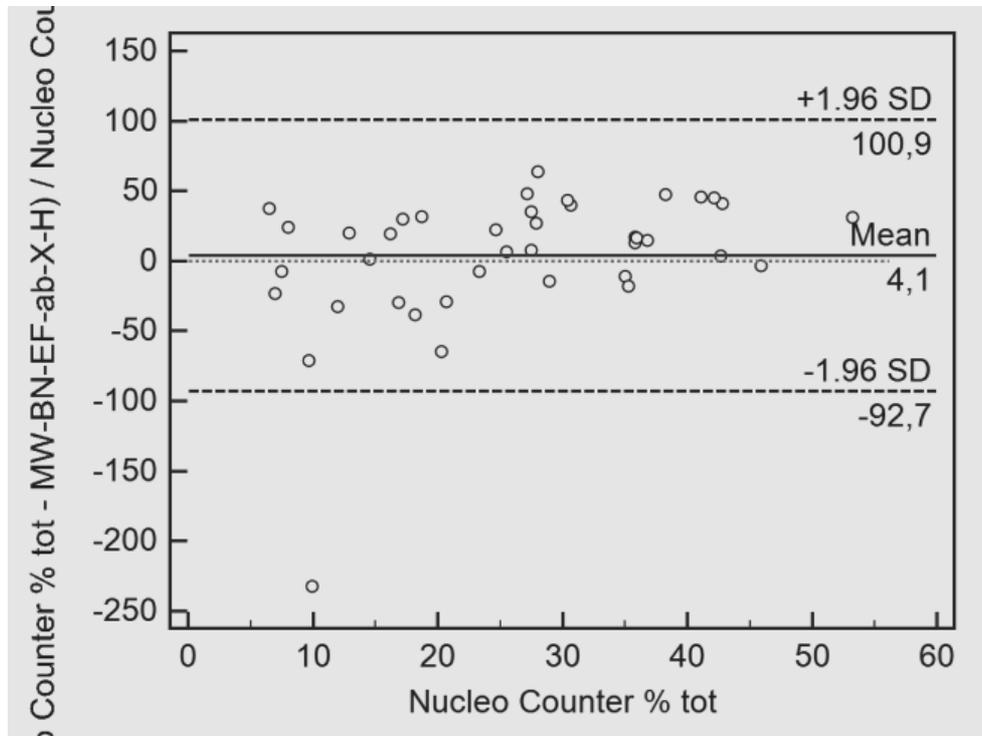
**Abbildung 11.69** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



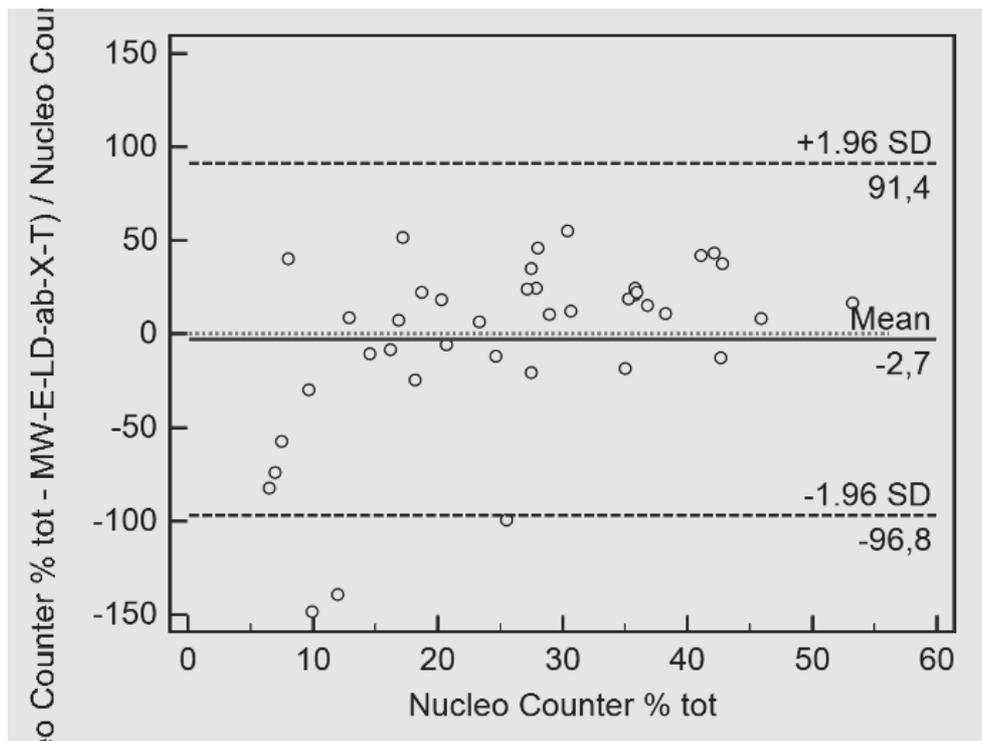
**Abbildung 11.70** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



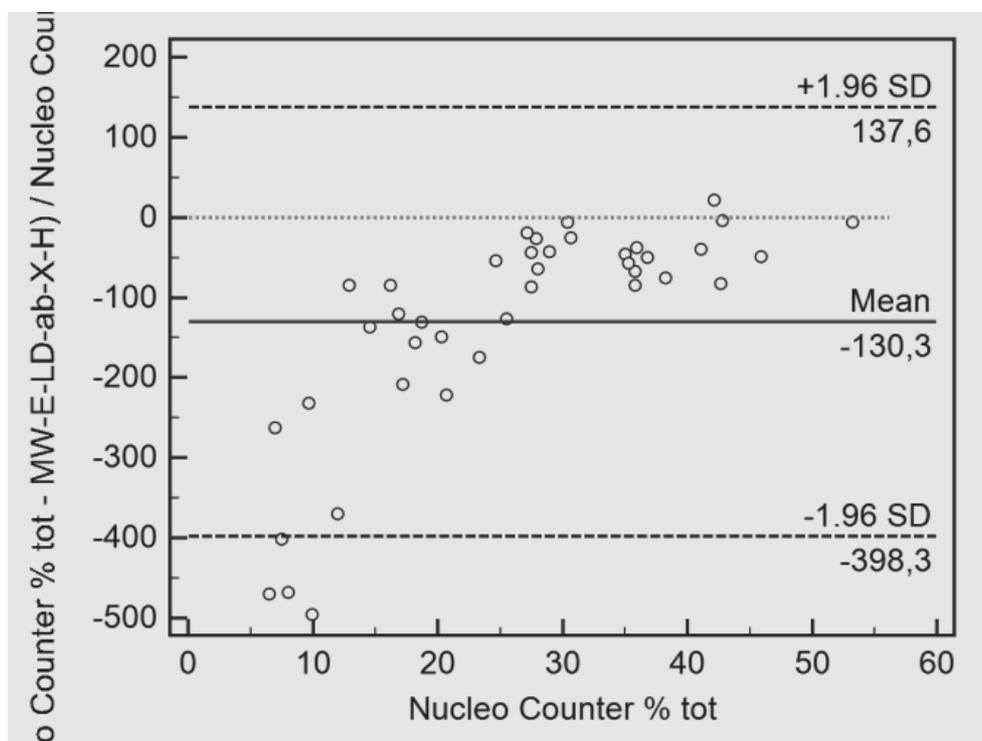
**Abbildung 11.71** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



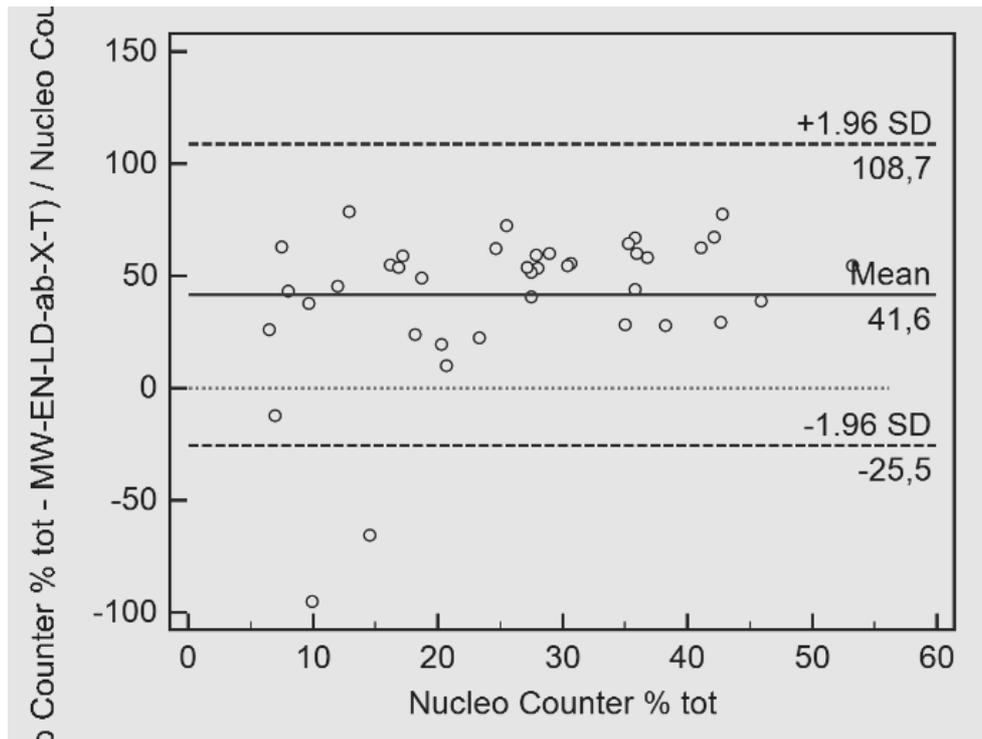
**Abbildung 11.72** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 2



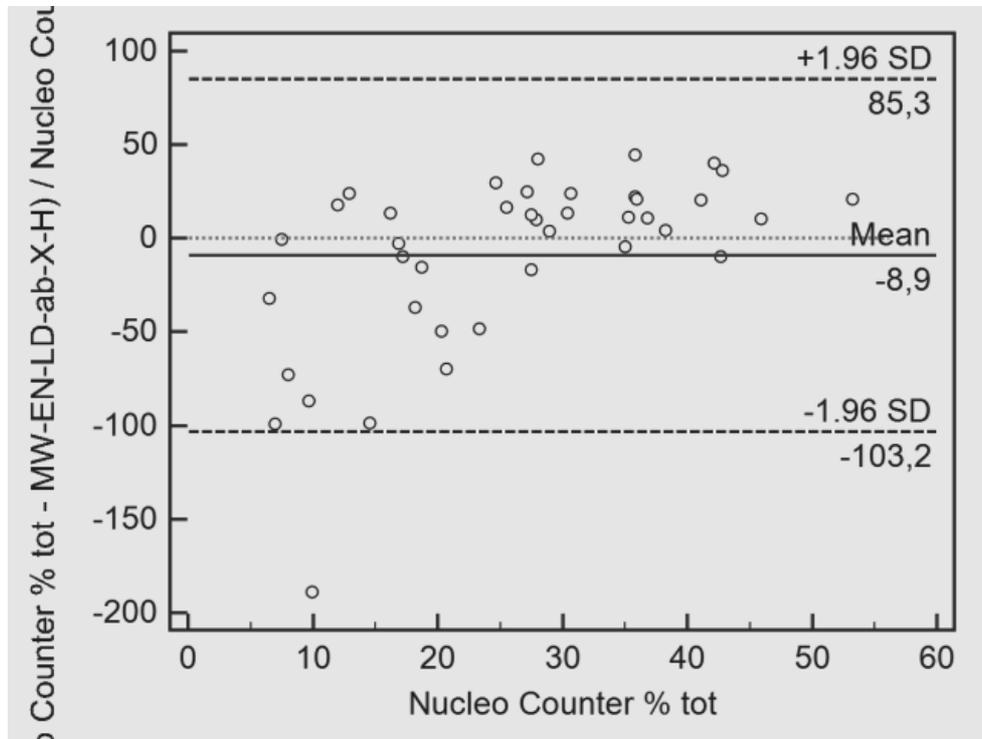
**Abbildung 11.73** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



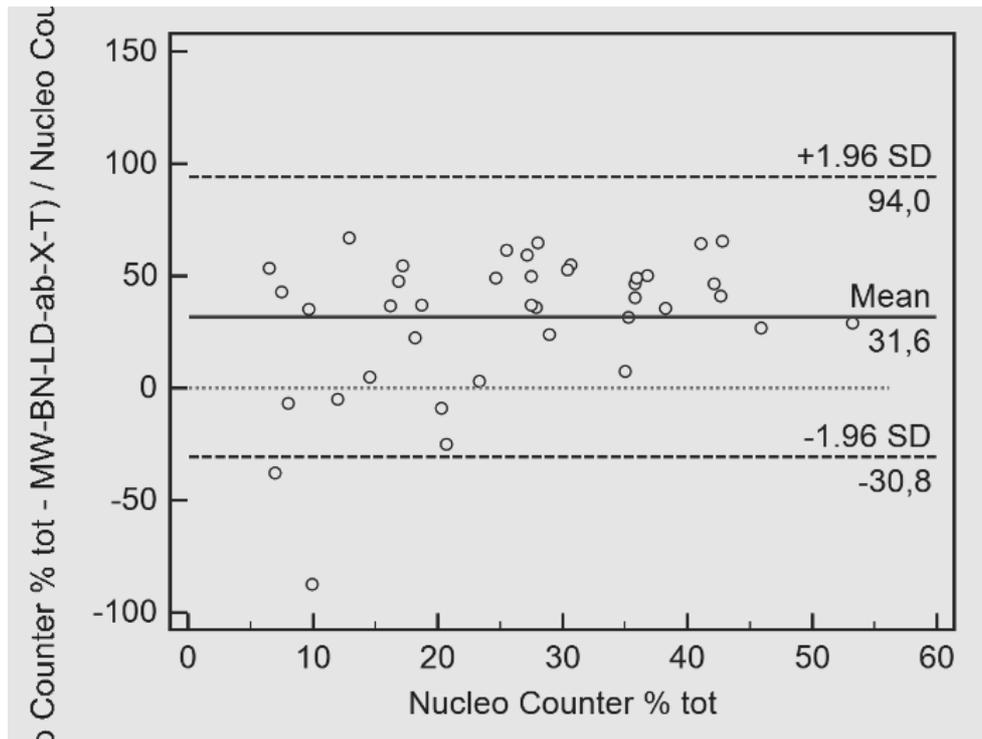
**Abbildung 11.74** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



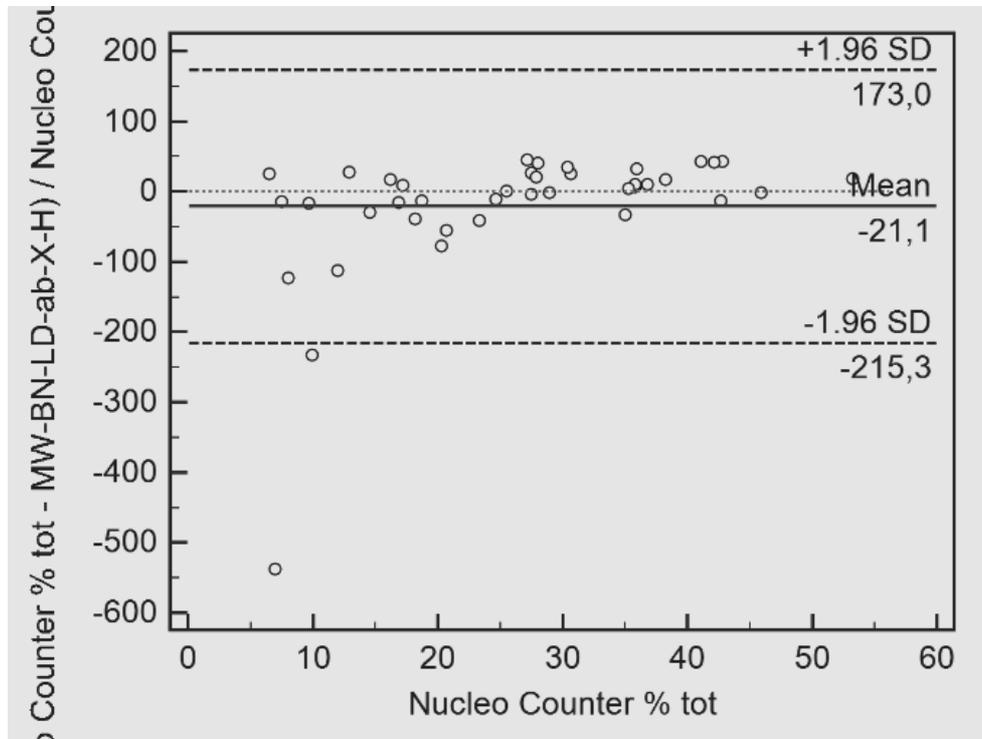
**Abbildung 11.75** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



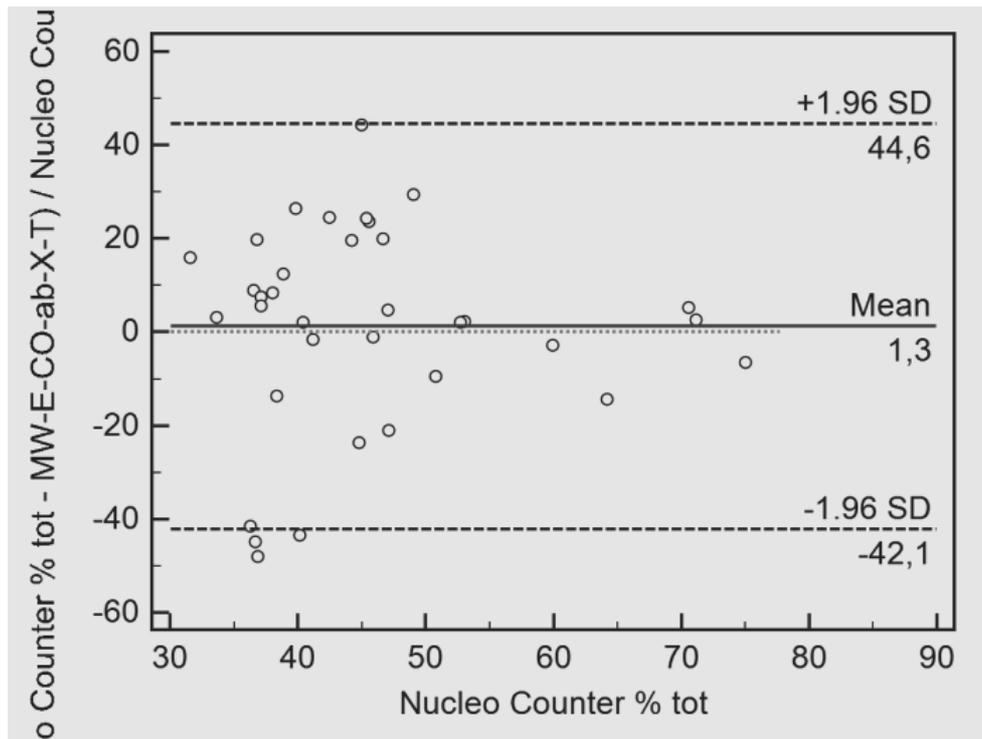
**Abbildung 11.76** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



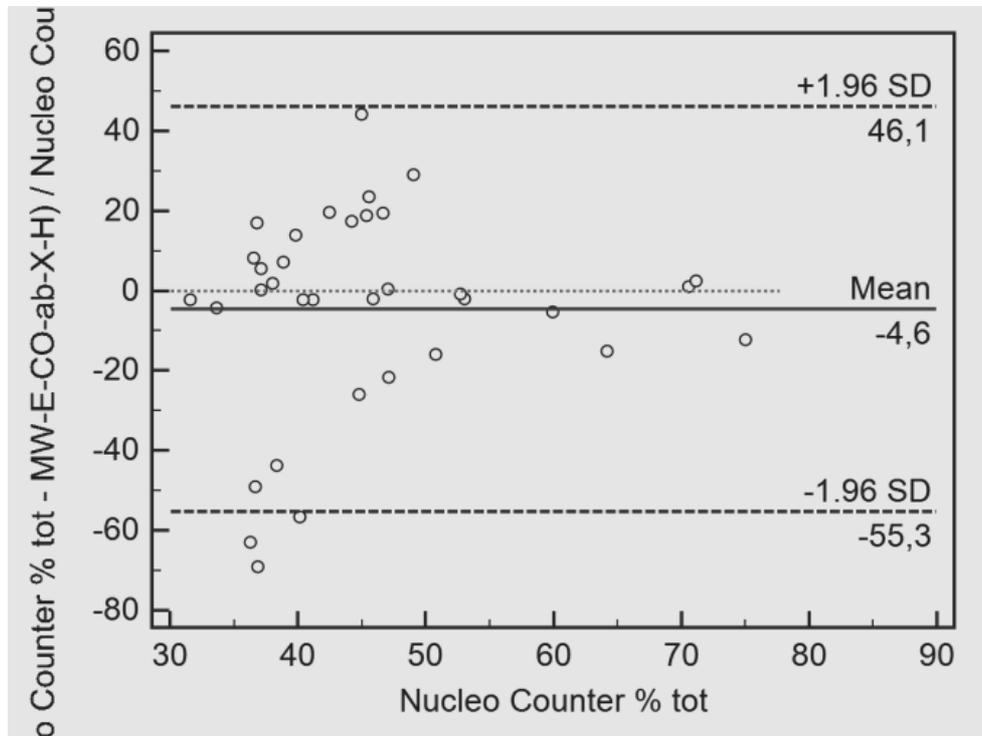
**Abbildung 11.77** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



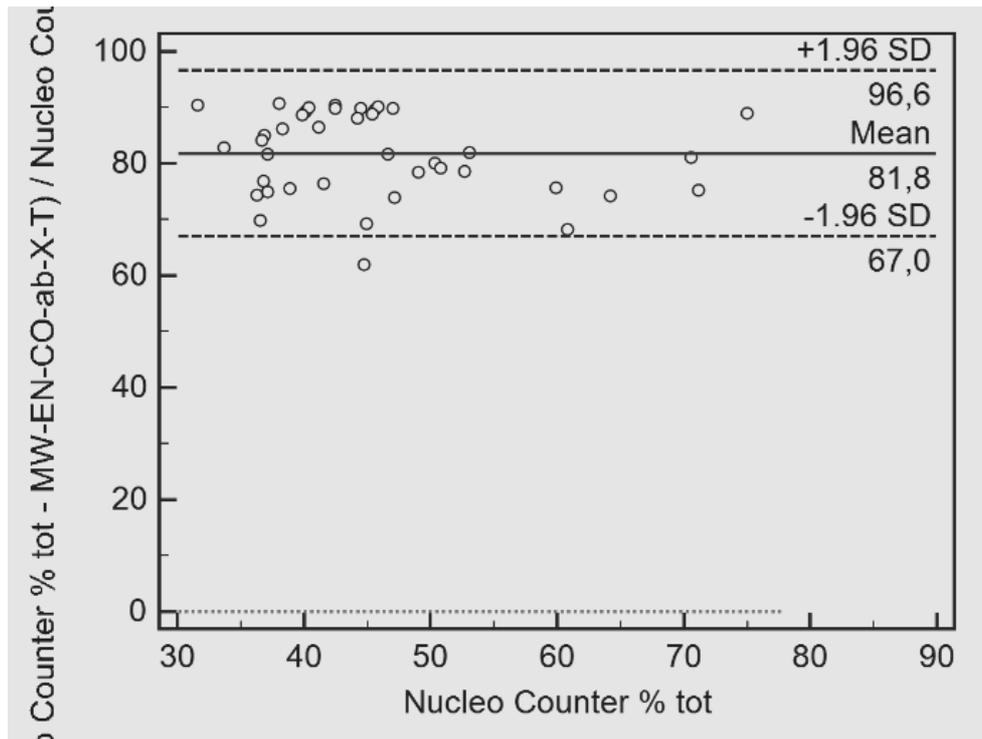
**Abbildung 11.78** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Frischsperma bei Untersucher 3



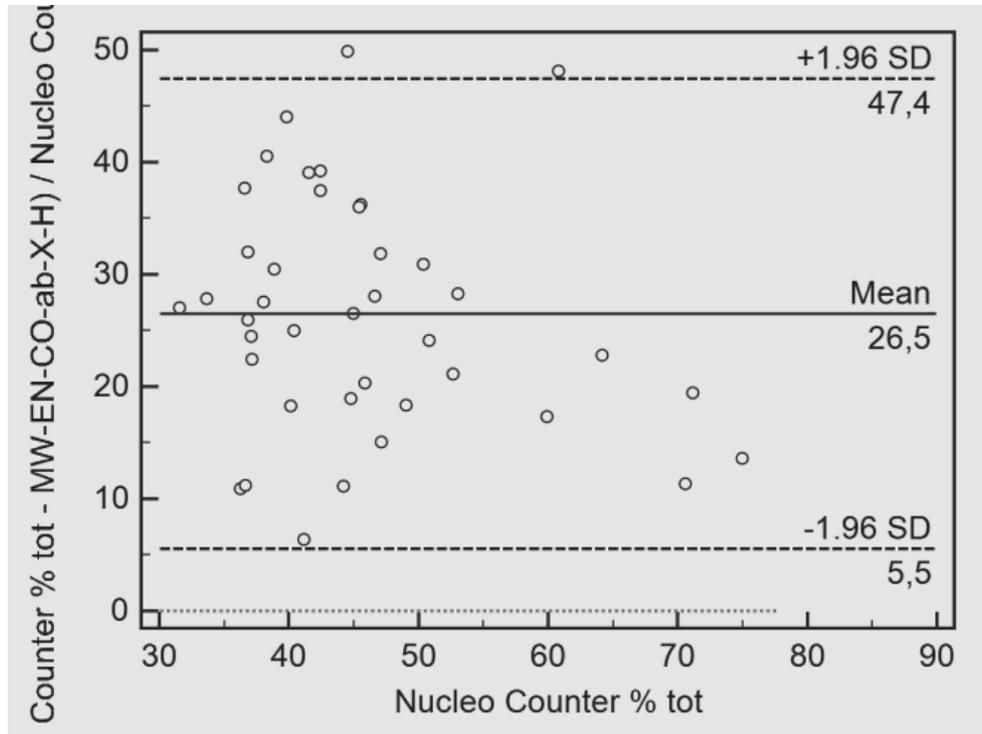
**Abbildung 11.79** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



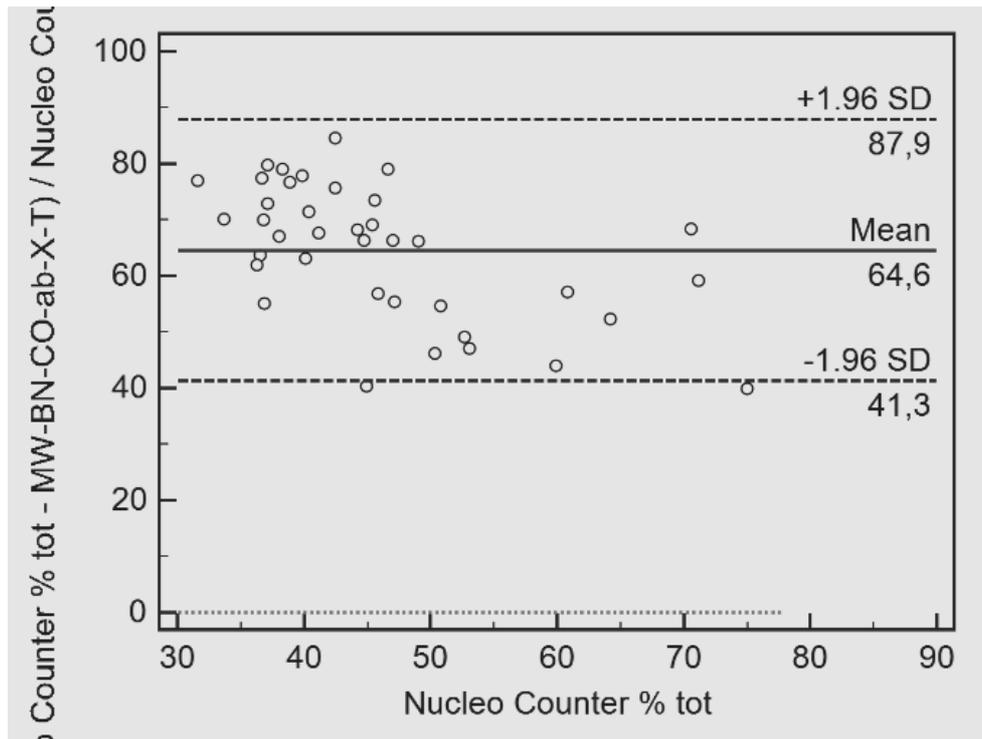
**Abbildung 11.80** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



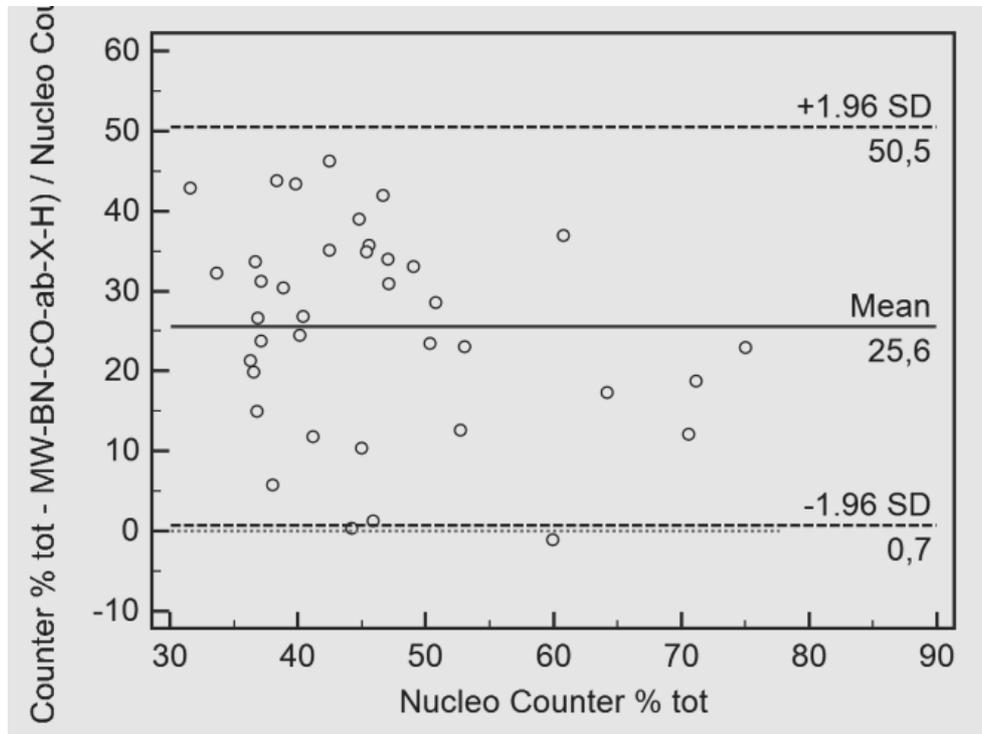
**Abbildung 11.81** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



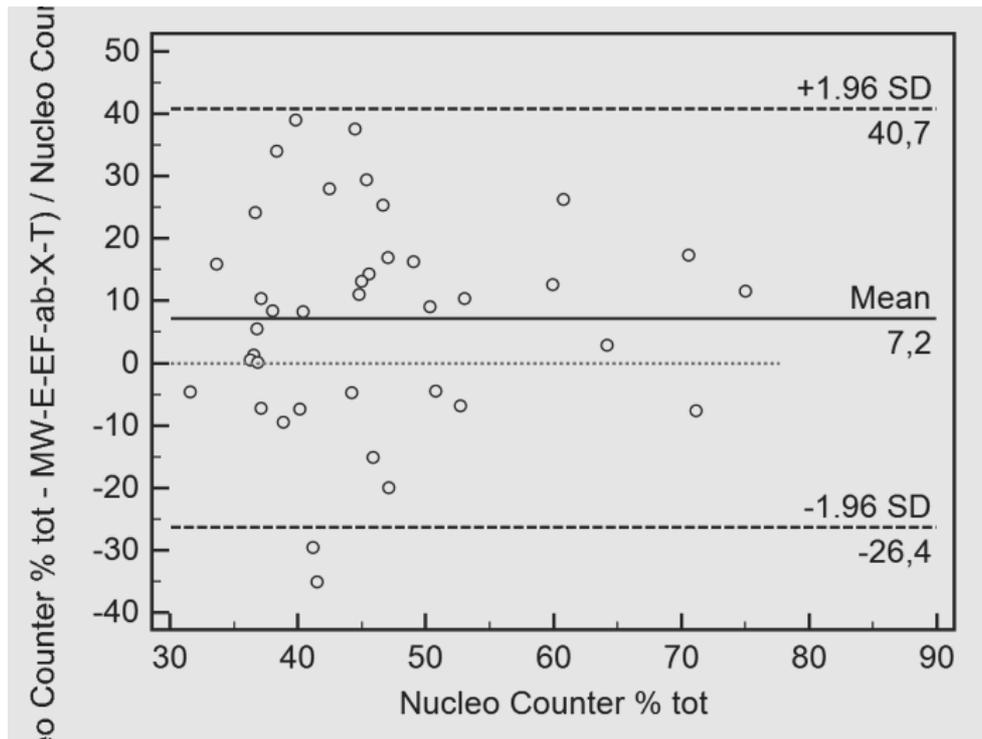
**Abbildung 11.82** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



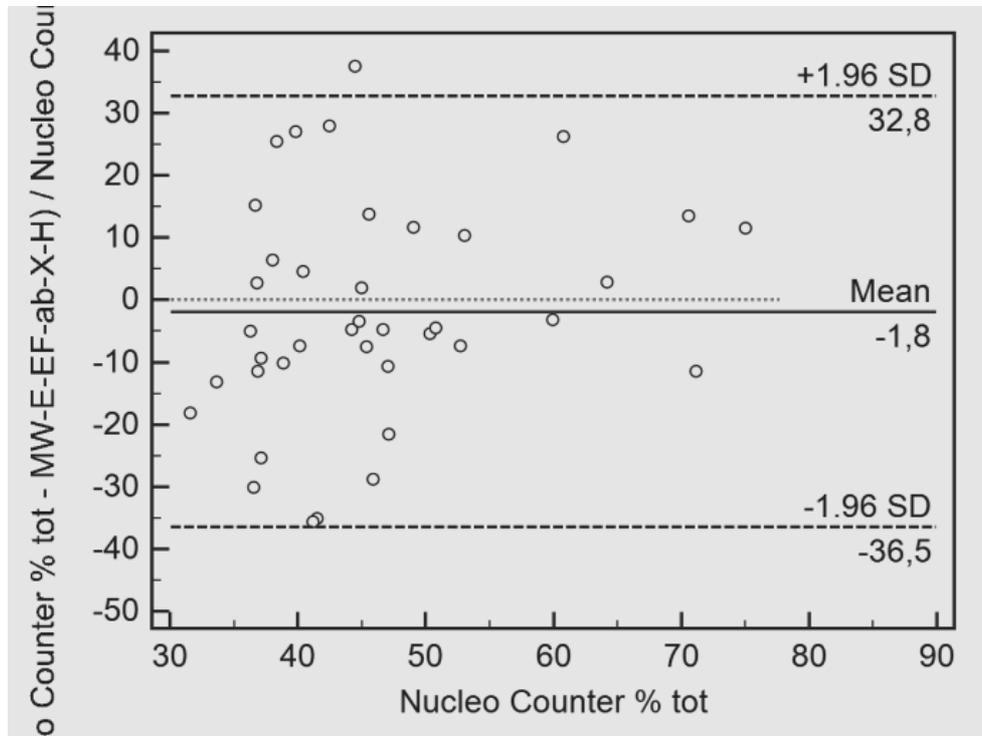
**Abbildung 11.83** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



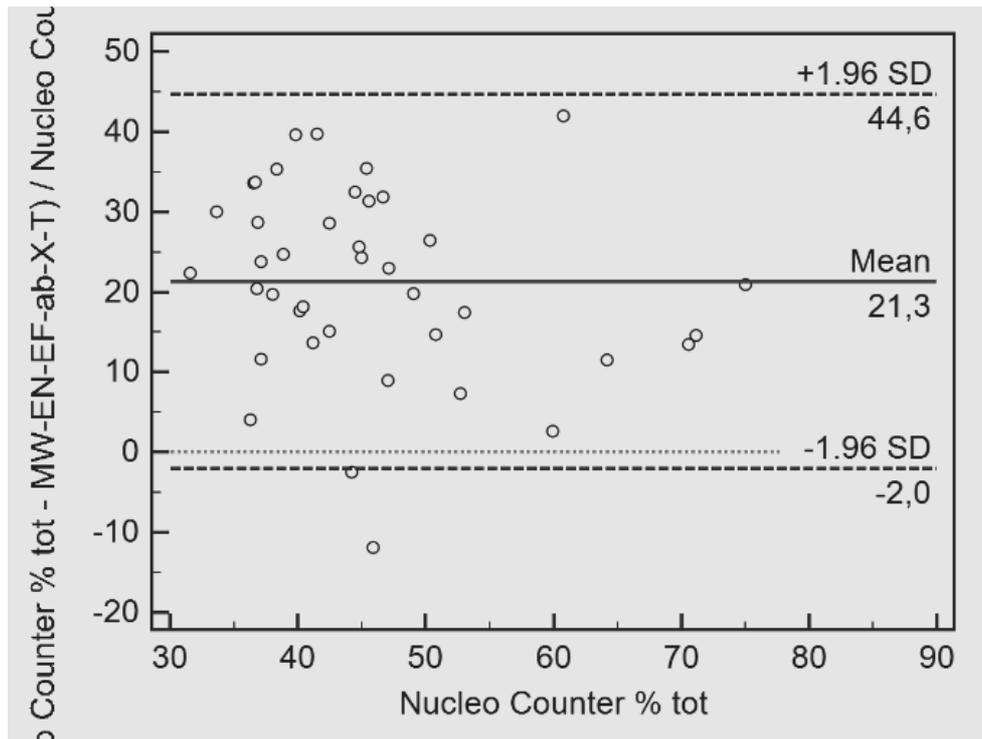
**Abbildung 11.84** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 1



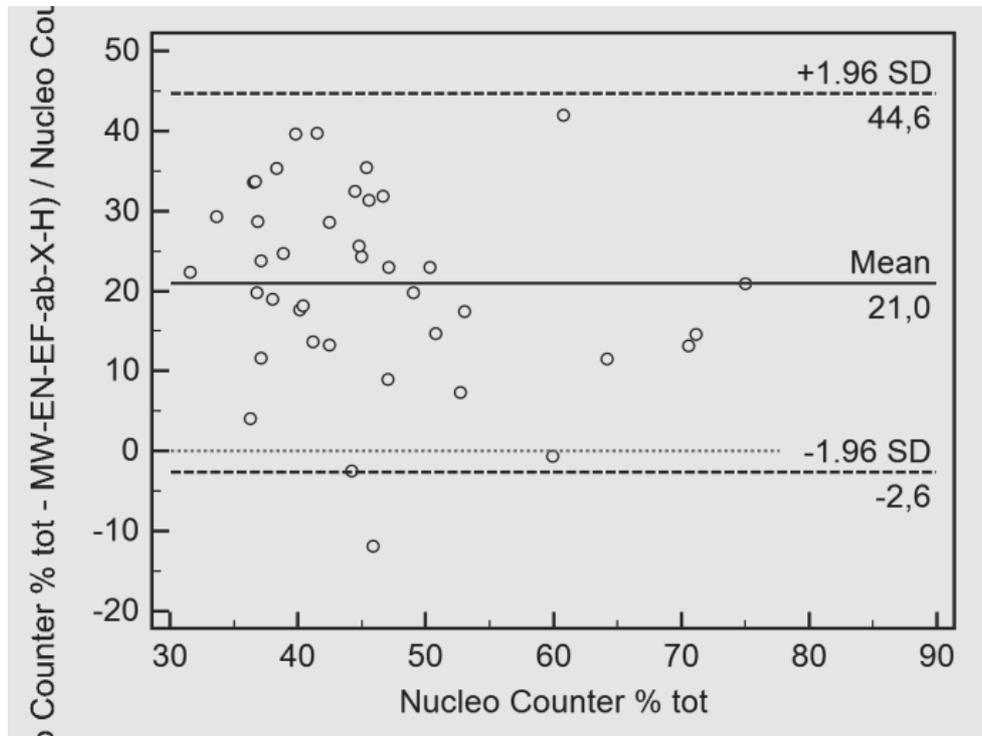
**Abbildung 11.85** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



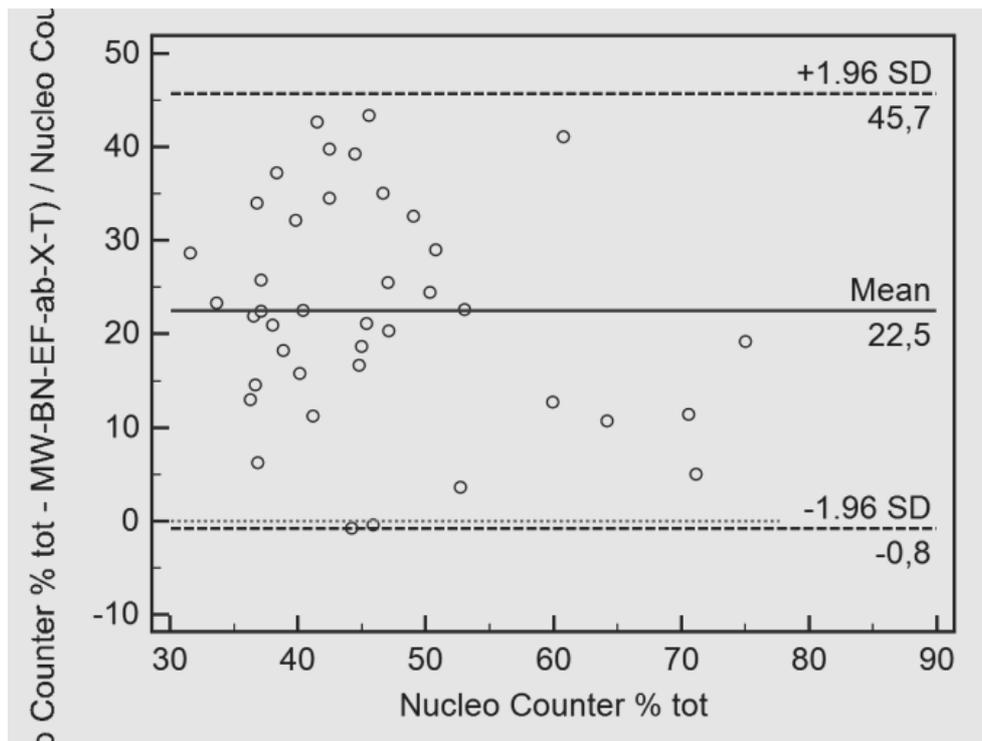
**Abbildung 11.86** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosinfärbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



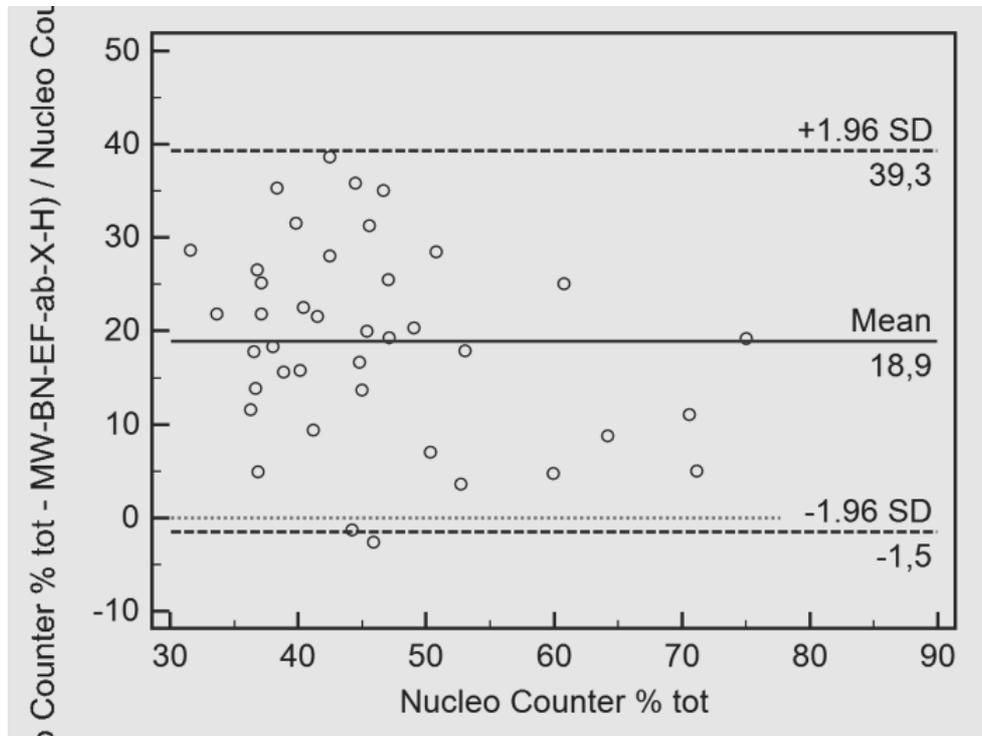
**Abbildung 11.87** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



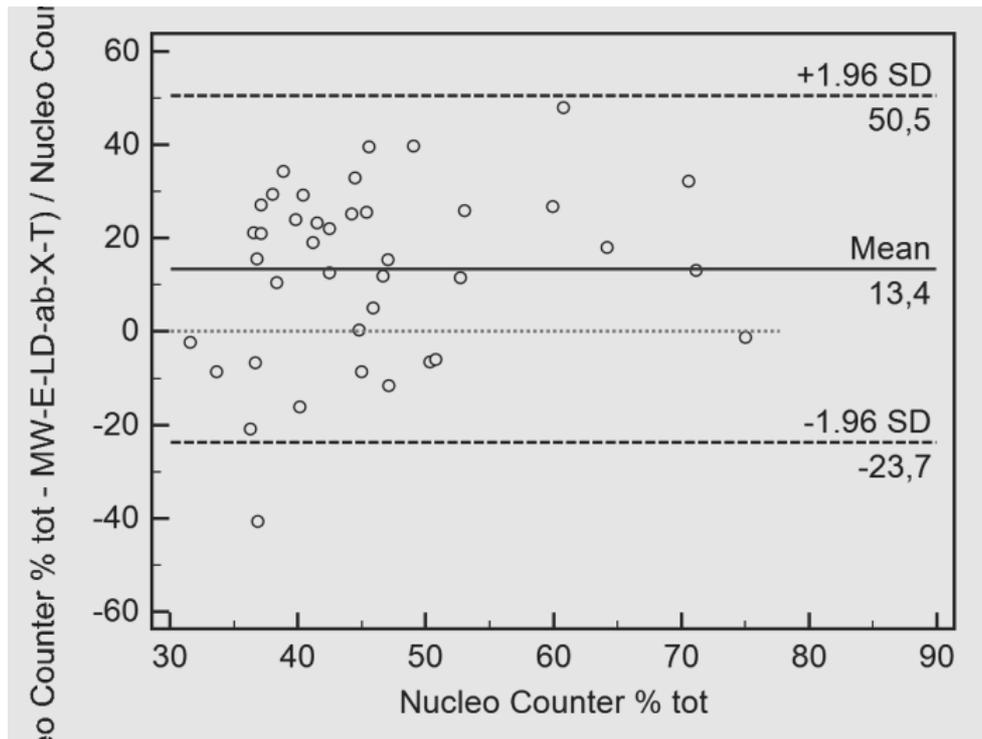
**Abbildung 11.88** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



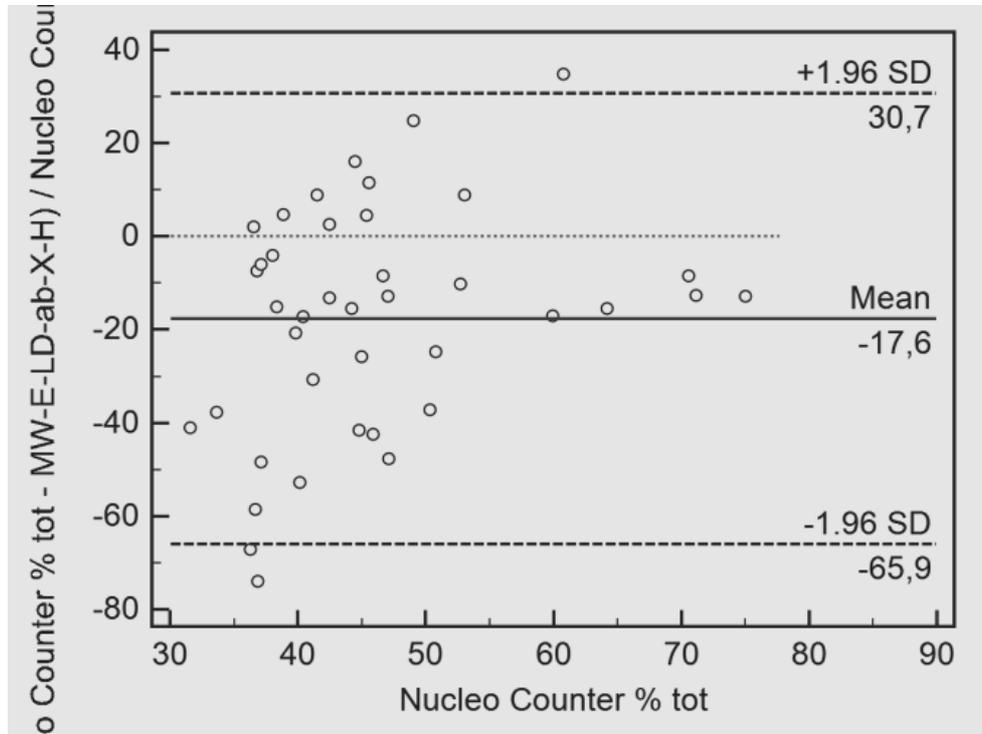
**Abbildung 11.89** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



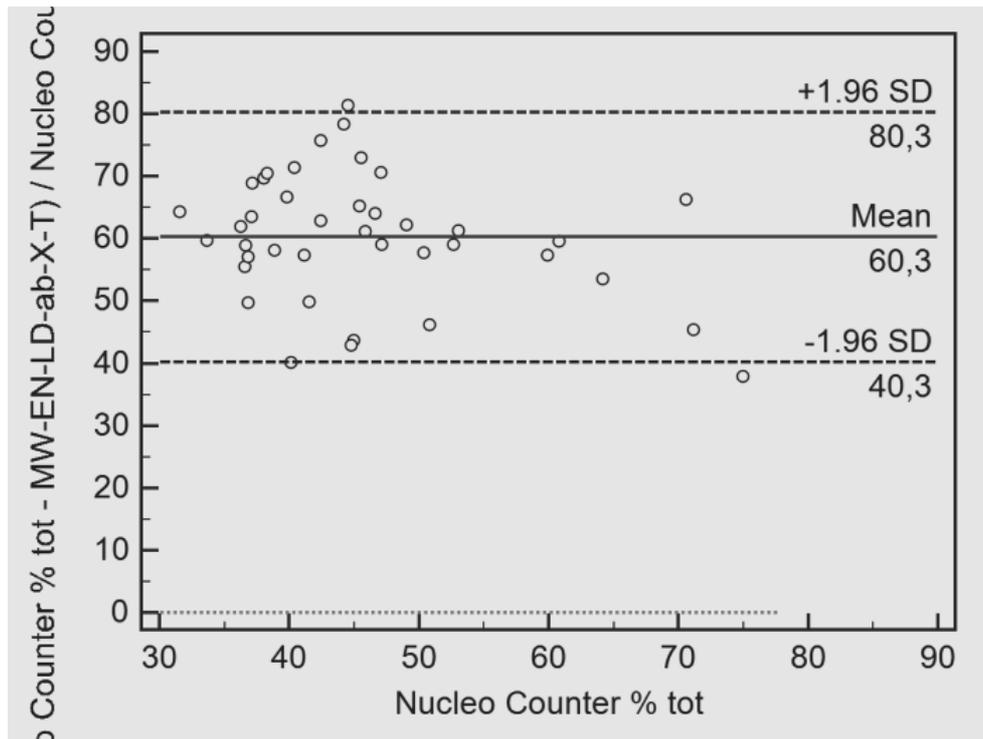
**Abbildung 11.90** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 2



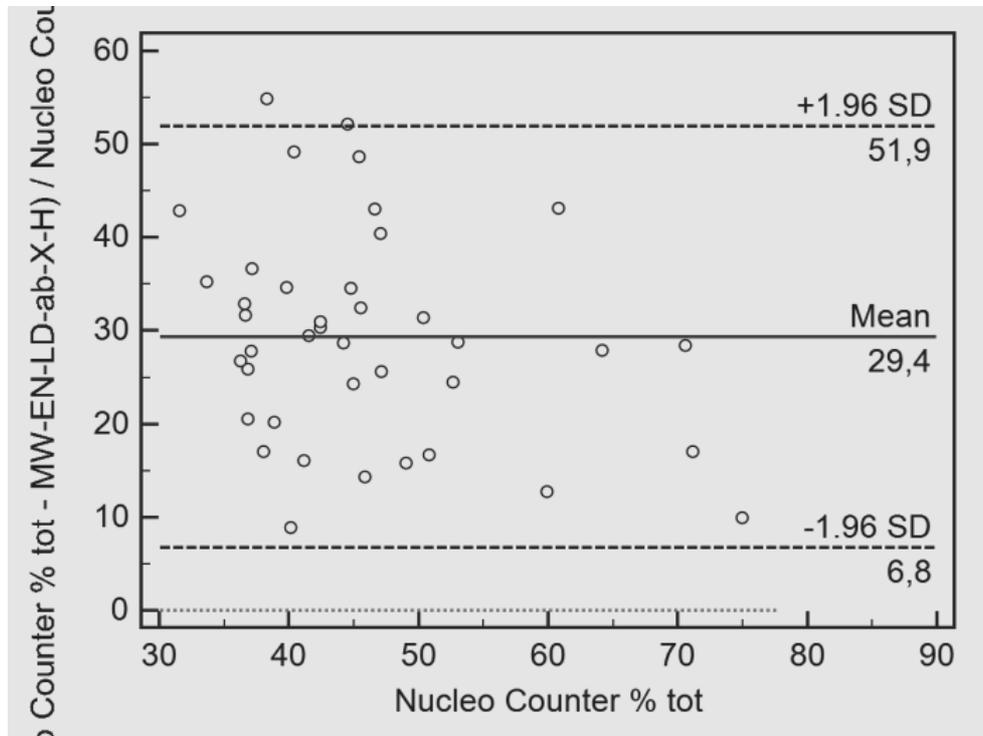
**Abbildung 11.91** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



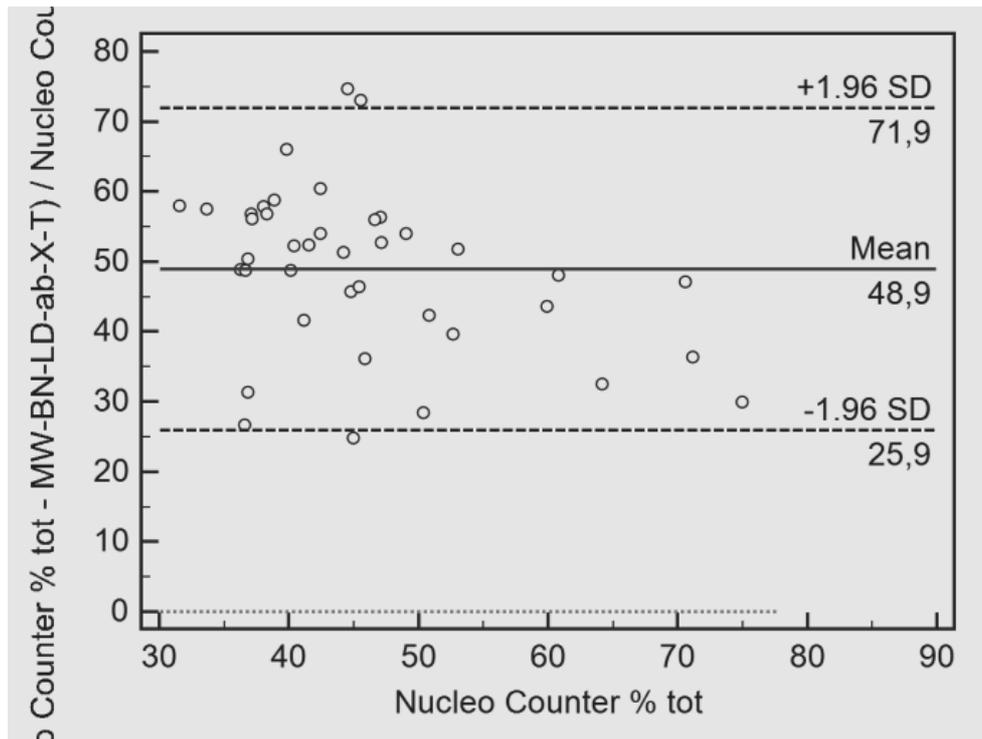
**Abbildung 11.92** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



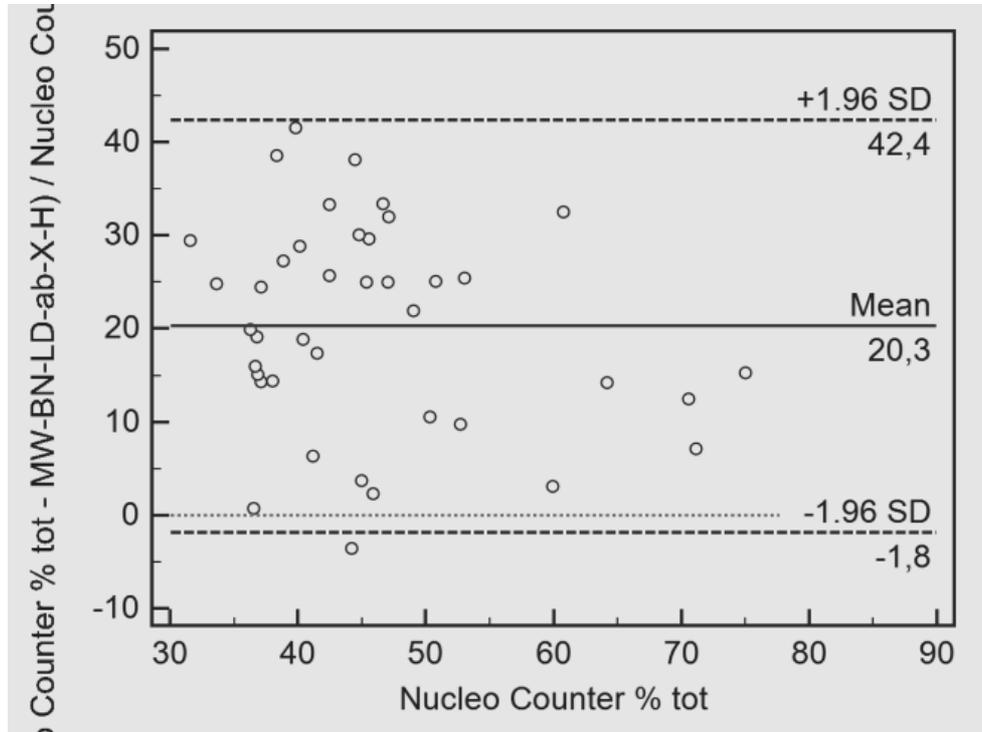
**Abbildung 11.93** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



**Abbildung 11.94** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Eosin-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



**Abbildung 11.95** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3



**Abbildung 11.96** Bland-Altman-Plot: NucleoCounter® im Vergleich zur Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (T+H) in der Gruppe Bulle Tiefgefriersperma bei Untersucher 3

**Tabelle 11.1** Rezeptur der Eosin-Färbung modifiziert nach HOFFMANN (2003)

2g	Eosin gelblich (E. Merck, Darmstadt)
3g	Natriumcitrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
100ml	Aqua dest.

**Tabelle 11.2** Rezeptur der Eosin-Nigrosin-Färbung nach WHO (2012)

0,67g	Eosin gelblich (E. Merck, Darmstadt)
0,9g	NaCl (Selectavet, Weyarn-Holzolling)
100ml	Aqua dest.
10g	Nigrosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

**Tabelle 11.3** Rezeptur der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung nach GEISLER (1990)

2g	Bromphenolblau (Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
10g	Nigrosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
100ml	Aqua dest.

## 12 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Braun möchte ich an erster Stelle für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung und konstruktive Kritik bei der Durchführung der Arbeit danken.

Für die großartige Betreuung durch Frau Dr. Christiane Otzdorff möchte ich mich herzlichst bedanken. Nicht nur für das unermüdliche Auszählen der Ausstriche, sondern auch insbesondere für die allseitige Hilfsbereitschaft.

Ebenso gilt mein Dank Frau Elke Fink, die als dritte Untersucherin diesen Studienaufbau mit ermöglichte. Danke für die geopferte Zeit und die aufbauenden Worte.

Ein großes Dankeschön geht an Herrn PD Dr. Sven Reese vom Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München für die Betreuung und kompetente Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Der Prüf- und Besamungsstation München-Grub e.V. (Bayern-Genetik GmbH) und dem Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e.V. danke ich für die Bereitstellung der Bullenproben.

Bei meiner Kollegin Anja Geyer möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und schöne Zeit bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gebührt meinen Eltern, die mir immer Sicherheit gegeben haben und mir nicht nur das Studium der Tiermedizin, sondern auch die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Freund Matthias, der mir zu jeder Zeit zur Seite gestanden ist und mir den Rücken gestärkt hat.