

Untersuchung von Ejakulatparametern und Hodendimensionen
fertiler Rüden unter 10 kg Körpergewicht

von Romy Zeller

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

Untersuchung von Ejakulatparametern und Hodendimensionen
fertiler Rüden unter 10 kg Körpergewicht

von Romy Zeller
aus Freiburg im Breisgau

München 2020

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

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Frau Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Mitbetreuung durch
Dr. Christiane Otdorff

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Wolfram Petzl

Tag der Promotion: 08. Februar 2020

Meiner geliebten Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Andrologische Untersuchung des Rüden	3
2.	Spermagewinnung	5
2.1.	Spermagewinnung durch manuelle Stimulation	5
3.	Spermauntersuchung	7
3.1.	Makroskopische Beurteilung	7
3.2.	Mikroskopische Beurteilung	8
3.2.1.	Motilität	8
3.2.2.	Morphologie	9
3.3.	Konzentration und Gesamtspermienzahl	10
3.4.	Spermienvitalität	12
3.5.	Computerassistierte Spermienanalyse (CASA)	14
3.5.1.	Motilitätsbeurteilung mittels CASA	15
3.5.2.	Morphologiebeurteilung mittels CASA	15
4.	Referenzwerte für Rüdenejakulate und Hodendimensionen	16
4.1.	Überblick Referenzwerte für Rüdenejakulate	17
4.1.1.	Spermaparameter in Bezug auf das Körpergewicht	18
4.1.2.	Spermaparameter in Bezug auf das Alter	20
4.2.	Hodendimensionen	21
III.	PUBLIKATION	24
IV.	DISKUSSION	41
V.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VI.	SUMMARY	51
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	53
VIII.	DANKSAGUNG	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

B	Breite
CASA	Computerassistierte Spermienanalyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSO	Daily spermatozoal output
H	Höhe
HOS	Hypoosmolarer Schwelltest
H _{VOL}	Hodenvolumen
IVF	In vitro Fertilisation
kg	Kilogramm
L	Länge
ml	Milliliter
n	Stichprobengröße
OWF	Oberwiesenfeld
PGF ₂ α	Prostaglandin 2 alpha
PI	Propidiumiodid
U/L	Enzymeinheit pro Liter
WHO	World Health Organization

I. EINLEITUNG

Die Beurteilung der Ejakulatbeschaffenheit eines Rüden stellt einen wichtigen Bestandteil einer andrologischen bzw. einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung dar (Root Kustritz 2007). Das Ejakulat wird hierbei sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf quantitative und qualitative Parameter untersucht. Um eine adäquate Aussage über die Beschaffenheit eines Ejakulates treffen zu können, werden Referenzwerte als Bezugsparameter verwendet. Referenzwerte für Ejakulate von Rüden existieren bereits seit vielen Jahrzehnten. Unterschiedliche Ansätze der Einteilung von Spermaparametern sind beschrieben. Durch Günzel-Apel et al. wurden im Jahr 1994 Spermaparameter von Rüden erstmals fünf unterschiedlichen Gewichtsklassen zugeordnet (Günzel-Apel et al. 1994). Sie konnten in ihrer Studie den Zusammenhang von Körpergewicht und Ejakulatvolumen sowie Gesamtspermienzahl aufzeigen. In den letzten Jahren beschäftigten sich weitere Arbeiten, mit dem Zusammenhang von Körpergewicht und Spermaparametern, und bestätigten die Ergebnisse von Günzel-Apel et al. (1994) (Rijsselaere et al. 2007, Goericke-Pesch und Failing 2013, Tesi et al. 2018). Die Gewichtsgruppenunterteilungen, die in der Literatur zu finden sind, enden hierbei bei einem Körpergewicht unter 10 kg; eine weitere Unterteilung hat bisher nicht stattgefunden.

Die vollständige Untersuchung der Hoden, inklusive die Bestimmung der Hodengröße, ist ebenfalls Teil jeder andrologischen Untersuchung. Richtwerte für Hodendimensionen wurden durch Günzel-Apel et al. (1994) auch nach dem Körpergewicht kategorisiert. Weitere Daten zu Hodendimensionen für kleine Rüden unter 10 kg Körpergewicht sind in der Literatur nicht zu finden; eine weitere Unterteilung hat auch hier bisher nicht stattgefunden.

Ein wichtiger Vorstellungsgrund in der Klinik ist neben der Abklärung von Fertilitätsstörungen auf Seiten des Rüden, die steigende Nachfrage für künstliche Besamungen, sowie Kryokonservierungen. Eine vollständige Spermauntersuchung ist für eine sinnvolle künstliche Besamung sowie vor Beginn des Einfrierprozesses unerlässlich (Günzel-Apel 1986, Johnston 1991).

Unter den zur Zuchttauglichkeits- bzw. Spermauntersuchung vorstelligen Rüden befinden sich zunehmend kleine, leichtgewichtige Hunderassen. Um diese Patienten adäquat zu untersuchen und ihre Fertilität bzw. Zuchttauglichkeit inklusive ihrer Hodendimensionen sowie ihrer Ejakulatbeschaffenheit zu beurteilen, müssen entsprechende Daten vorliegen.

Da es in der zugänglichen Literatur keine entsprechend differenzierten Referenzwerte für Rüden $\leq 10,0$ kg Körpergewicht gibt, bestand die Zielstellung der vorliegenden Arbeit darin Referenzwerte für Ejakulate sowie Hodendimensionen fertiler Rüden mit einem Körpergewicht $\leq 10,0$ kg zu erheben. Ein Vergleich der Parameter von Rüden $\leq 5,0$ kg mit Rüden von 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht sollte zeigen, ob sich die Erweiterung der bisherigen Referenzwerte um eine neue Gewichtsgruppe von Rüden $\leq 5,0$ kg als sinnvoll erweisen würde.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Andrologische Untersuchung des Rüden

Die andrologische Untersuchung ist ein wichtiges Instrument, um das Fertilitätspotential eines Rüden im Rahmen einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung zu beurteilen, sowie diagnostische Aussagen im Hinblick auf Erkrankungen des männlichen Geschlechtsapparates zu treffen. Sie dient der Überprüfung der gesundheitlichen Zuchttauglichkeit, welche die allgemeine Gesundheit, die phänotypische Erbgesundheit, die Gesundheit der Geschlechtsorgane umfasst sowie der geschlechtlichen Zuchttauglichkeit, welche die Begattungsfähigkeit (*Potentia coeundi*) und die Befruchtungsfähigkeit (*Potentia generandi*) eines Rüden beinhaltet (Aurich et al. 2017). Die Indikationen für die Durchführung einer andrologischen Untersuchung sind vielfältig. Neben der prophylaktischen Untersuchung eines Rüden vor dem ersten Zuchteinsatz, sowie der Abklärung von Fertilitätsproblemen oder Veränderungen der primären Geschlechtsorgane hat die andrologische Untersuchung eine wichtige Bedeutung für die Verwendung von Sperma im Rahmen einer künstlichen Besamung oder einem Konservierungsprozess (Günzel-Apel 2016).

Zu Beginn jeder Untersuchung ist eine ausführliche Anamnese zu erheben (Memon 2007, Root Kustritz 2007, Purswell et al. 2010). Hierbei sollen zunächst allgemeine Informationen über den Rüden wie Herkunft, Haltung, Fütterung, Impf- und Entwurmungsstatus, bisherige Erkrankungen, Medikamenteneinnahme sowie Auslandsaufenthalte eingeholt werden. Die Herkunft eines Rüden ist insofern von Bedeutung, als dass Rüden, die aus einer Inzucht stammen, eine verminderte Spermienkonzentration, vermehrte morphologisch veränderte Spermien sowie verminderte Trächtigkeitsraten zeigen und somit eine verminderte Fertilität aufweisen können (Wildt et al. 1982). Der Einfluss der Fütterung auf die Fertilität beziehungsweise die Spermaqualität ist Gegenstand vieler Forschungsprojekte. Positive Effekte auf die Ejakulatqualität durch Nahrungssupplemente sind für Menschen und verschiedene Tierarten beschrieben (Marin-Guzman et al. 2000, Brinsko et al. 2005, Gharagozloo und Aitken 2011). Der tatsächliche Einfluss wird hierbei kontrovers diskutiert, die Studien liefern zum Teil unterschiedliche und widersprüchliche Ergebnisse. Über den Einsatz von Futterergänzungsmitteln zur Verbesserung der Ejakulatqualität von Rüden gibt es bisher nur wenige Informationen

(Hess 2006). Aus humanmedizinischen Studien und Tiermodellen ist bekannt, dass die Spermaqualität durch Übergewicht negativ beeinflusst wird (Marco-Jimenez und Vicente 2017, Engin-Ustun et al. 2018, Palmer et al. 2012). Ein negativer Effekt bei übergewichtigen Rüden ist dementsprechend zu bedenken, in der zugänglichen Literatur sind bisher aber keine Studien zu finden, die einen Zusammenhang von Übergewicht mit einer verminderten Ejakulatqualität aufzeigen. Das Vorliegen von Krankheiten, die mit einer Hyperthermie einhergehen, sowie endokrinologische Erkrankungen wie z.B. Tumoren des Hypothalamus oder der Hypophyse etc. können sich ebenfalls negativ auf die Befruchtungsfähigkeit eines Rüden auswirken (Memon 2007, Soderberg 1986, Johnson 1986). Ebenso stehen verschiedene Medikamente im Verdacht, sich negativ auf die Fertilität oder die Spermienqualität auszuwirken (Feldmann 1996). Hunde, die unter einer Vincristin- oder Strahlentherapie im Rahmen einer Tumorbehandlung standen, zeigten eine signifikant verminderte Vorwärtsbeweglichkeit sowie einen signifikant erhöhten Anteil toter und morphologisch veränderter Spermien (Saratsis et al. 2000). Auch die Gabe bestimmter Antibiotika kann Einfluss auf die Ejakulatbeschaffenheit eines Rüden nehmen. Die orale Gabe von Chinolonen über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten führte bei Ratten und Hunden zu einer Beeinträchtigung der Spermatogenese, sowie zu einer Atrophie der Hoden (Wolfram et al. 1988). Für die Beurteilung eines Ejakulates ist die Information über den Einsatz sowie den Zeitpunkt einer medikamentellen Therapie somit von erheblicher Bedeutung.

Die allgemeine Anamnese wird um Fragen zum Reproduktionsstatus des Rüden erweitert, hierzu zählen die Anzahl gedeckter Hündinnen mit und ohne Deckzeitpunktbestimmung, die Trächtigkeitsrate, die Wurfgrößen, der letzte Deckeinsatz sowie die Libido und das Paarungsverhalten des Rüden während des Deckaktes. Aus der Anamnese können erste wichtige Hinweise auf eine vorliegende Problematik gewonnen werden (Feldmann 1996, Günzel-Apel 2016).

Um den aktuellen Gesundheitsstatus des Rüden zu prüfen, sollte vor Beginn der andrologischen Untersuchung eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt werden. Der eigentliche andrologische Untersuchungsgang beginnt mit der Adspektion und Palpation der primären männlichen Geschlechtsorgane. Hierbei werden das Skrotum, die Hoden, der Nebenhoden, der Samenstrang, das Präputium und der Penis im Hinblick auf Lage, Form, Größe, Symmetrie, Konsistenzveränderungen und Schmerzhaftigkeit untersucht (Günzel-Apel 2016). Der Penis sollte für

eine vollständige Beurteilung bis hinter den Bulbus glandis vorgelagert werden. Eine bakteriologische Untersuchung kann in bestimmten Fällen indiziert sein, hierzu sollte eine Tupferprobe der Glans penis entnommen werden. Bei Hinweisen auf Veränderungen ist eine transrektale Palpation der Prostata empfehlenswert. Nicht in jedem Fall sind Form- bzw. Größenveränderungen der Prostata transrektal palpierbar, weshalb diese Untersuchungsmethode für eine adäquate Beurteilung nicht ausreichend ist (Ruel et al. 1998). Den Goldstandard für die Untersuchung der Prostata stellt die Sonografie dar, sie ermöglicht eine genaue Beurteilung der Prostatabeschaffenheit, respektive Echogenität und Homogenität, sowie eine korrekte Vermessung der Dimensionen (Atalan et al. 1999). Die Ultraschalluntersuchung kann zusätzlich für die Hoden angewendet werden. Ultraschallwellen haben hierbei keinen schädlichen Effekt auf die Spermatogenese bzw. die Spermaqualität (Coulter und Bailey 1988). Die Prüfung der Echogenität und Homogenität des Hodengewebes kann Hinweise auf eine vorliegende Erkrankung zum Beispiel eines tumorösen Geschehens oder einer Orchitis geben, welche sich nachteilig auf die Spermaqualität auswirken können (England 1991, Moxon et al. 2015). Sollte bei einem Rüden der Verdacht auf hormonelle Imbalancen oder eine Infektionskrankheit vorliegen, kann die andrologische Untersuchung um eine Blutuntersuchung und funktionelle Hormontests erweitert werden (Feldmann 1996, Günzel-Apel 2016).

2. Spermagewinnung

Für die Gewinnung von Sperma eines Rüden sind verschiedene Verfahren beschrieben. Neben der Elektroejakulation und der Gewinnung von Sperma mittels künstlicher Scheide hat sich die manuelle Stimulation als erfolgreiche und einfache Methode in der Praxis etabliert (Kutzler 2005).

2.1. Spermagewinnung durch manuelle Stimulation

Die Spermagewinnung sollte in einer ruhigen Umgebung stattfinden und die Anzahl der im Raum Anwesenden so gering wie möglich gehalten werden, um eine Ablenkung oder Irritation des Rüden zu vermeiden (Günzel-Apel 2016). Ein rutschfester Boden ist empfehlenswert. Die Anwesenheit des Besitzers hilft manchen Rüden, sich in einer ungewohnten Umgebung wohler zu fühlen. Für die Durchführung

werden nur wenige Hilfsmittel benötigt. Zur Unterscheidung der drei Ejakulatfraktionen empfiehlt es sich, mehrere Samenauffangbeutel bereit zu halten (Kutzler 2005). Das individuelle Verhalten des Rüden muss bei der Spermagewinnung unbedingt beachtet werden. Rüden mit wenig Deckerfahrung bzw. Rüden, die noch vor ihrem ersten Deckakt zur Spermagewinnung vorstellig werden, können durch die unbekanntere Situation eingeschüchtert sein oder eine Manipulation des Penis verweigern. Hingegen zeigen Rüden mit Deckerfahrung weniger Probleme bei der manuellen Spermagewinnung. Ein ruhiger und vorsichtiger Umgang mit dem Tier ist in jedem Falle essentiell, Zwangsmaßnahmen dürfen in keinem Fall angewendet werden (Kutzler 2005). Dem Rüden sollte vor der Spermagewinnung die Möglichkeit gegeben werden, Urin abzusetzen (Freshman 2002). Traas und Kustritz (2004) und Kustritz und Hess (2007) konnten in ihren Studien zeigen, dass sich die Anwesenheit einer Hündin im Proöstrus bzw. Östrus positiv auf die Spermaqualität auswirkt. Dem Rüden sollte Zeit gegeben werden, die Hündin kennenzulernen. Nachdem er ausreichend stimuliert ist, kann durch vorsichtige Massage das Anschwellen des Bulbus glandis herbeigeführt werden. Dies geschieht bei manchen Rüden auch ohne manuelle Stimulation (Kutzler 2005). Anschließend wird das Präputium vorsichtig über den Bulbus glandis geschoben, dies muss vor der vollständigen Erektion geschehen, da sich das Präputium sonst nicht mehr über den geschwollene Bulbus glandis verschieben lässt. Hinter dem Bulbus wird der Penis dann vorsichtig zwischen Zeigefinger und Daumen fixiert (Günzel-Apel 2016). Sobald der Rüde mit den Friktionsbewegungen beginnt, sollte der Samenauffangbeutel vorsichtig über den Penis gestülpt werden. Die drei Ejakulatfraktionen können durch Wechsel des Beutels differenziert werden. Die meisten Rüden deuten während der Spermagewinnung das Umsteigen an. Der Penis sollte dann durch den Untersucher um 180° nach kaudal umgelegt werden (Johnston 1991, Kutzler 2005, Günzel-Apel 2016). Nach der Absamung muss darauf geachtet werden, dass der Penis abschwilt und vollständig in das Präputium zurückverlagert wird und sich dieses nicht nach Innen einstülpt. Der Gebrauch von Gleitgel kann die Rückverlagerung des Penis in das Präputium erleichtern (Kutzler 2005).

3. Spermauntersuchung

Die Spermauntersuchung ist ein wesentlicher Untersuchungsbestandteil der andrologischen Untersuchung. Sie dient dazu eine, Ejakulatprobe auf quantitative und qualitative Parameter zu untersuchen und daraus Hinweise auf das Fertilitätspotential eines Rüden zu erlangen (Martinez 2004, Root Kustritz 2007, Moce und Graham 2008). Eine herabgesetzte Spermaqualität geht mit schlechteren Befruchtungsergebnissen einher. Eine gute Spermienqualität sollte im Regelfall zufriedenstellende Befruchtungsergebnisse liefern, ist jedoch kein Garant dafür. Die Zeugungsfähigkeit eines Rüden kann nur durch eine erfolgreiche Konzeption sicher nachgewiesen werden (Amann und Hammerstedt 1993, Kolster 2018).

Die Untersuchung des Ejakulates muss unmittelbar im Anschluss an die Gewinnung stattfinden, um eine Veränderung der Spermaparameter durch Temperaturveränderungen und Standzeiten zu vermeiden (Root Kustritz 2007, Appell et al. 1977). Die zur Untersuchung nötigen Materialien sollten vorbereitet sein.

3.1. Makroskopische Beurteilung

Im ersten Schritt der Untersuchung wird das gewonnene Ejakulat makroskopisch beurteilt. Hierbei wird die Menge der einzelnen Fraktionen in Millilitern bestimmt. Das Volumen ist abhängig von der Körper- bzw. Hodengröße des Rüden (Olar et al. 1983, England 1991, Günzel-Apel et al. 1994). Das Volumen dient später der Berechnung der Gesamtspermienzahl im Ejakulat. Anschließend wird die Farbe der Ejakulatfraktionen beurteilt, diese variiert mit dem Spermiengehalt und sollte bei einer guten Spermienkonzentration in der zweiten Fraktion weißlich sein (Boucher et al. 1958). Eine gräuliche Farbe kann hinweisend auf das Vorliegen eines verminderten Spermiengehaltes (Oligozoospermie) sein (Root Kustritz 2007). Bräunliche oder rötliche Verfärbungen können durch Blutbeimengungen verursacht werden. Eine gelbliche Verfärbung kann durch eine Verunreinigung mit Urin entstehen (Freshman 2002). Die dritte Ejakulatfraktion, die durch das Prostatasekret bestimmt wird, sollte eine klare transparente Farbe aufweisen, Blutbeimengungen in dieser Fraktion können im Zusammenhang mit Prostataerkrankungen stehen (Root Kustritz 2007). Die Konsistenz des Spermas kann ebenfalls erste Hinweise auf den Spermiengehalt geben. Bei einer guten Spermienkonzentration ist die Konsistenz milchig bis molkig. Eine wässrige zweite Ejakulatfraktion enthält voraussichtlich weniger Spermien. Das Ejakulat sollte geruchsneutral sein. Es besteht zusätzlich

die Möglichkeit mit einem pH-Streifen den pH-Wert der dritten Ejakulatfraktion zu bestimmen. Er sollte physiologisch zwischen 6,5 und 6,8 liegen. Im Falle einer Infektionserkrankung kann der pH-Wert unter Berücksichtigung eines Antibiogrammes hilfreich bei der Auswahl eines geeigneten Antibiotikums sein (Freshman 2002).

3.2. Mikroskopische Beurteilung

Die mikroskopische Untersuchung schließt sich direkt an die makroskopische Beurteilung der Ejakulatprobe an.

3.2.1. Motilität

Die Motilität der Spermien ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal einer Ejakulatprobe. Eine schlechte Spermienmotilität wurde mit schlechteren Befruchtungsraten in Zusammenhang gebracht (Farris 1949, Macleod und Gold 1951, Hirano et al. 2001). Eine gute (Vorwärts-) Beweglichkeit setzt das Vorliegen einer normalen Struktur (Morphologie) und eine physiologische Membranintegrität voraus (Smith et al. 1992, Ellington et al. 1993, Kumi-Diaka 1993, Agarwal et al. 2003). Die Vorwärtsbeweglichkeit sollte > 80 % betragen (Iguer-Ouada und Verstegen 2001). Verschiedene Autoren beschreiben allerdings unterschiedliche, zum Teil deutlich niedrigere Mindestwerte (Johnston 1991, Günzel-Apel et al. 1994). Johnston (1991) setzt einen Anteil von > 70% vorwärtsmotiler Spermien für einen normale Rüden voraus. Günzel-Apel et al. (1994) geben einen Minimalwert von 50% für die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien an. Für eine erfolgreiche künstliche Übertragung von aufgetautem Tiefgefriersperma wird eine Vorwärtsbeweglichkeit > 40 % als ausreichend betrachtet (Linde-Forsberg et al. 1999).

Für die Beurteilung der (Vorwärts-) Beweglichkeit der Spermien stehen dem Untersucher verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Auf die Beurteilung der Motilität mithilfe von computergestützten Methoden wird in Kapitel 3.5.1. eingegangen. Die gebräuchlichste und kostengünstigste Methode ist die subjektive Motilitätsbeurteilung. Hierbei wird ein Tropfen der zweiten Ejakulatfraktion, welche die Spermien enthält, auf einen auf 37 °C vorgewärmten Glasobjektträger gegeben und unter einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die Motilität wird hierbei in Prozent wiedergegeben (Johnston 1991). Dieses Verfahren ist stark von der Qualität des Mikroskops sowie der Erfahrung des Untersuchers abhängig (Iguer-Ouada und

Verstegen 2001). In verschiedenen Studien wurden Ejakulate von unterschiedlichen Personen mit unterschiedlichem Erfahrungsgrad beurteilt. Die Ergebnisse variierten hierbei erheblich. Die Auswahl des Untersuchers ist somit für die Motilitätsbeurteilung von großer Bedeutung (Dunphy et al. 1989). Studien hierzu zeigen, dass die subjektive Motilitätsbeurteilung stark anfällig für Schätzfehler ist und Untersuchungsprotokolle unbedingt eingehalten werden müssen (Dunphy et al. 1989). Objektivere Messverfahren für eine präzisere Motilitätsbeurteilung sollten in Betracht gezogen werden (Iguer-Ouda und Verstegen 2001, Yeung et al. 1997).

3.2.2. Morphologie

Die Morphologie ist ein weiteres wichtiges Qualitätsmerkmal einer Ejakulatprobe, da morphologische Spermienveränderungen im Zusammenhang mit eingeschränkter Fertilität bzw. Infertilität stehen, nicht zuletzt da sie mit der Motilität eines Spermiums in engem Zusammenhang stehen (Renton et al. 1986, Oettle 1993). Humanmedizinische Studien zeigen, dass der Prozentsatz an morphologisch normalen Spermien positiv mit erfolgreicher In-Vitro-Fertilisation (IVF) korrelierte (Chan et al. 1989, Hinting et al. 1990, Hirano et al. 2001).

Die Ursachen für morphologisch veränderte Spermien sind vielfältig. Zunehmendes Alter, Krankheiten, die mit einer Hyperthermie einhergehen oder den Hormonhaushalt beeinflussen, der Einsatz bestimmter Medikamente, Inzucht aber auch Stress können sich negativ auf die Spermienmorphologie auswirken (Caminos-Torres et al. 1977, Wildt et al. 1982, Freshman 1989, Martinez 2004, Millsop et al. 2013). Ein erhöhter Anteil morphologisch veränderter Spermien wird als Teratozoospermie bezeichnet. Sie entsteht entweder durch fehlerhafte Vorgänge während der Spermatogenese im Hoden selbst oder während der Reifungs- und Transportphase durch Nebenhoden bzw. den Ductus deferens und kann je nach Entstehungsort in primäre und sekundäre Schäden unterteilt werden (Feldman 1996). Die Einteilung kann zusätzlich nach Lokalisation des Defektes am Spermium erfolgen (Christiansen 1984). Verschiedene Schemata zur Erkennung von morphologischen Abweichungen für Rüdensperma sind beschrieben oder werden von anderen Tierarten modifiziert übernommen (Morton und Bruce 1989, Kolster 2018). Im Allgemeinen werden 200 bis 300 Spermien eines Ejakulates auf Kopf-, Mittelstück- und Schwanzveränderungen untersucht. Die Veränderungen sind hierbei sehr vielfältig und von unterschiedlicher Relevanz in Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit des Spermiums. Nicht jede morphologische Veränderung führt zu einer Einschränkung.

Dennoch werden auch sekundäre Veränderungen mit Infertilität in Zusammenhang gebracht (Oettle und Soley 1985, Pena et al. 2007). Johnston et al. (2001a) setzen einen Wert von 80 % morphologisch normaler Spermien voraus, um eine Befruchtungsfähigkeit zu gewährleisten. Oettle ermittelte in seiner Studie von 1993 verminderte Trächtigkeitsraten für Ejakulate mit > 40 % veränderten Spermien.

Für die Morphologiebeurteilung werden Spermien unter einem Phasenkontrast- oder Lichtmikroskop mit oder ohne Färbung beurteilt. Eine Vitalitätsfärbung lässt sich mit der morphologischen Beurteilung einfach verbinden. Die Papanicolau-, Shorr- oder Diff-Quik Färbeverfahren werden nach Richtlinien der World Health Organisation (WHO) für die Untersuchung von menschlichem Sperma empfohlen (WHO 2010). Viele weitere Färbeverfahren stehen zur Verfügung (Rauhaus 1990). Studien zeigen jedoch, dass das Färbeverfahren die Spermien potentiell schädigen und somit das Ergebnis der morphologischen Beurteilung verfälschen kann (Salisbury et al. 1942, Harasymowycz et al. 1976, Root Kustritz et al. 1998). Es ist sehr wichtig, dass Untersuchungsstandards während der Färbeverfahren und der Beurteilung eingehalten werden. Ebenso wie die subjektive Motilitätsbeurteilung ist auch die Morphologiebeurteilung abhängig von der Erfahrung des Untersuchers. In einer Studie von Jequier und Ukombe (1983) variierten die Ergebnisse der morphologischen Spermauntersuchung einer Ejakulatprobe zwischen verschiedenen Untersuchern von 5 % bis 85 %. Offensichtliche Veränderungen wie abgebrochene Spermienköpfe- bzw. Schwänze konnten hierbei leichter erkannt werden, wohingegen komplexere Veränderungen, wie unterschiedliche Kopfgrößen oder Akrosomenveränderungen nur von erfahrenen Untersuchern erkannt wurden (Baker und Clarke 1987, Dunphy et al. 1989, Eustache und Auger 2003). Dem Einsatz von computergestützter Morphologiebeurteilung wird dementsprechend mehr und mehr Bedeutung beigemessen (Baker und Clarke 1987). Auf dieses Verfahren wird in Kapitel 3.5.2 eingegangen.

3.3. Konzentration und Gesamtspermienzahl

Die Spermienkonzentration beschreibt die Anzahl von Spermien pro Milliliter Ejakulat. Sie ist der wichtigste quantitative Parameter der Spermauntersuchung und dient der Berechnung der Gesamtspermienzahl in einem Ejakulat.

Eine Verminderung der Spermienkonzentration bzw. Gesamtspermienzahl (Oligozoospermie) kann durch verschiedene Erkrankungen, Inzucht aber auch durch

einen frequenten Deckeinsatz bzw. häufiges Absamen verursacht werden (Boucher et al. 1958, Günzel-Apel 1990, England 1999, Taha et al. 2008). England (1999) konnte bereits bei einer zweiten Absamung nach ca. einer Stunde eine deutlich niedrigere Gesamtspermienzahl ermitteln. Auch eine mangelnde oder unzureichende Stimulation oder Stress bei der Spermagewinnung können zu einer reduzierten Gesamtspermienzahl führen (Martinez 2004, Hess 2006). Eine weitere Ursache für eine verminderte Spermienkonzentration ist die unvollständige Ejakulation, welche sich durch den Nachweis der alkalischen Phosphatase in der dritten Ejakulatfraktion identifizieren lässt und bei einer vollständigen Ejakulation bei > 5000 U/L liegen sollte (Johnston 1991, Stornelli et al. 2003, Memon 2007). Ein saisonaler Einfluss auf die Gesamtspermienzahl konnte durch Taha et al. (1981) gezeigt werden. Sie stellten höhere Werte für die Gesamtspermienzahl im späten Frühjahr bis frühen Sommer fest. Albrizio et al. konnten in ihrer Studie aus dem Jahr 2013 keinen saisonalen Einfluss auf die Gesamtspermienzahl feststellen. Hess (2002) und Kustritz und Hess (2007) konnten durch die subkutane Applikation von $\text{PGF}_2\alpha$ die Gesamtspermienzahl in Ejakulaten erhöhen.

Die klassische Konzentrationsbestimmung erfolgt durch die Zählung der Spermien in Zählkammern, welche auch in der Humanmedizin nach Richtlinien der WHO Anwendung finden (WHO 2010, Brito et al. 2016). Dies ermöglicht eine Konzentrationsbestimmung ohne großen apparativen und finanziellen Aufwand. Die Routine des Untersuchers spielt ebenfalls eine maßgebliche Rolle für die Genauigkeit der Ergebnisse (Jequier und Ukombe 1983).

Zusätzlich zur Bestimmung der Spermienkonzentration mittels Zählkammer stehen verschiedene maschinelle Zählssysteme zur Verfügung. Mithilfe von durchflusszytometrischen Verfahren sowie Fluoreszenzmikroskopie wird die Spermienkonzentration in nur wenigen Sekunden ermittelt. Diese Verfahren liefern Ergebnisse mit hoher Präzision und Reproduzierbarkeit (Hansen et al. 2006, Brito et al. 2016). Die Durchflusszytometrie zeigte in einem Vergleich von verschiedenen Konzentrationsbestimmungsmethoden die genauesten Messergebnisse mit niedrigen Variationskoeffizienten (Prathalingam et al. 2006). Der NucleoCounter[®], welcher in der vorliegenden Studie zur Bestimmung von Spermienkonzentration und Viabilität verwendet wurde, ist ein Fluoreszenzmikroskop. Es detektiert Signale des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumiodid (PI), welcher an die DNA gebunden ist

(Shah et al. 2006, ChemoMetec 2014). Propidiumiodid kann nur an die DNA der Zelle binden, wenn die Zelle bereits abgestorben ist. Zur Ermittlung der Gesamtspermienzahl in einer Ejakulatprobe müssen dementsprechend in einem vorherigen Untersuchungsschritt alle Spermien abgetötet werden, damit der Fluoreszenzfarbstoff an die DNA binden kann. In einer Studie von Shah et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass der NucleoCounter® die intra- und interindividuelle Untersuchervariabilität reduziert und somit ein wertvolles und präzises Instrument für die Spermienzählung darstellt.

3.4. Spermiovitalität

Die Spermiovitalität bzw. Membranintegrität ist ein bedeutendes qualitatives Merkmal einer Ejakulatprobe. Im Rahmen der Spermauntersuchung dient sie der Bestimmung des Anteiles membrangeschädigter bzw. toter Spermien. Tote Spermien weisen eine defekte Membranintegrität auf. Diese ist für den Reifungsprozess des Spermiums (Kapazitation), welcher im Uterus der Hündin stattfindet, sowie den Prozess der Akrosomenreaktion wichtig. Demzufolge wird die Befruchtungsfähigkeit eines Spermiums durch seine Membranintegrität beeinflusst (Pena et al. 1998, Graham und Moce 2005).

Ein erhöhter Anteil toter bzw. membrangeschädigter Spermien kann durch verschiedene Erkrankungen aber auch durch Fehler während der Spermagewinnung und -verarbeitung verursacht werden. Sind alle Spermien in einem Ejakulat abgestorben, spricht man von einer Nekrozoospermie.

Membrangeschädigte Spermien zeigen eine erhöhte Permeabilität für verschiedene Farbstoffe. Dies macht man sich bei der Bestimmung des Anteils membrangeschädigter Spermien zu Nutze. Hierzu werden in der Regel 200 Spermien, die zuvor einem Färbeverfahren unterzogen wurden, beurteilt. Gefärbte Spermien werden als tot, ungefärbte Spermien als lebend beurteilt. Verschiedene Färbemethoden für Rüdenejakulate sind beschrieben. Die Eosin-Nigrosin Färbung ist eine häufig angewandte Färbetechnik, welche sich neben der Beurteilung der Vitalität mit der Morphologiebeurteilung verbinden lässt (Wales 1959, Dott und Foster 1972). Weitere beschriebene Verfahren sind die Erythrosin-Nigrosin- (Wales 1959), Bromphenolblau- (Geisler 1990) und Bromphenol-Nigrosin-Färbung (Rauhaus 1990). Färbemethoden zur Vitalitätsbeurteilung sind einfach und kostengünstig. Unvollständig gefärbte Spermien erschweren eine adäquate Beurteilung. Als weitere Nachteile

dieser Untersuchungsmethode sind die Subjektivität sowie die geringe Anzahl an untersuchten Spermien zu nennen. In einer Studie von Daub et al. (2016), in der verschiedene Färbemethoden miteinander verglichen wurden schnitt die Bromphenol-Nigrosin Färbung zur Vitalitätsbeurteilung am besten ab und lieferte reproduzierbare Ergebnisse.

Die Durchflusszytometrie ist ein weiteres Verfahren, welches die simultane Bestimmung von Spermienkonzentration und Vitalität ermöglicht. Mithilfe von membrangängigen sowie membranundurchgängigen Fluoreszenzfarbstoffen werden Spermien angefärbt und in einem Fluoreszenzmikroskop detektiert. Der Anteil vitaler Spermien bzw. die Spermienkonzentration wird dann anhand der Fluoreszenzemission der Spermien berechnet (Pena et al. 1998). Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe sind beschrieben. Eine Doppelfärbung mit SYBR 14 und PI hat sich als erfolgreich erwiesen (Garner und Johnson 1995, Christensen et al. 2004, Rijsselaere et al. 2005). Die Durchflusszytometrie liefert in wenigen Sekunden hochpräzise Ergebnisse mit hoher Reproduzierbarkeit, weshalb sie für die Beurteilung einer Spermaprobe von großer Relevanz ist (Gillan et al. 2005). In der Studie von Daub et al. (2016) konnten in einem Vergleich von manuellen Färbemethoden und dem Einsatz des NucleoCounter SP-100[®] (Chemometec A/S, Allerød, Dänemark), welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid arbeitet, signifikant niedrigere Variationskoeffizienten für die maschinelle Messung gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für Hengstejakulate ermittelt (Foster et al. 2011). Vorteile der maschinellen Vitalitätsbestimmung sind der geringere zeitliche Aufwand sowie die hohe Messgenauigkeit.

Eine einfachere und kostengünstige Methode zur Überprüfung der Membranintegrität ist die Anwendung des Hypoosmolaren Schwelltestes (HOS-Test). Die Spermien werden hierbei für 30 min, bei 37 °C in eine hypoosmolare Lösung verbracht (Goericke-Pesch und Failing 2013) und anschließend unter einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Vitale Spermien, mit einer physiologisch intakten Plasmamembran reagieren auf die hypoosmolare Lösung nach dem Prinzip der Osmose mit einem Einstrom von Flüssigkeit in die Samenzelle, was als Anschwellen und Einrollen des Spermischwanzes unter dem Mikroskop sichtbar und prozentual beurteilbar wird (Jeyendran et al. 1984, Jeyendran et al. 1992). Das Verfahren des

HOS-Tests findet sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin für verschiedene Tierarten Anwendung (Jeyendran et al. 1984, Kumi-Diaka 1993, Correa und Zavos 1994, Vazquez et al. 1997, Lechniak et al. 2002, Comercio et al. 2013). Eine positive Korrelation zwischen der Membranintegrität und dem Anteil morphologisch normaler Spermien sowie der Motilität konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Smith et al. 1992, Kumi-Diaka 1993, Goericke-Pesch und Failing 2013). In einer humanmedizinischen IVF – Studie konnten positive Korrelationen zwischen HOS-Test und der Befruchtungsfähigkeit der Spermien festgestellt werden (Jeyendran et al. 1992). Solche Untersuchungen existieren für Rüdenejakulate bis dato nicht (Karger et al. 2014).

3.5. Computerassistierte Spermienanalyse (CASA)

Verschiedene Studien der Humanmedizin und Veterinärmedizin zeigen, dass subjektive Untersuchungsmethoden wie die Motilitäts- und Morphologiebeurteilung von Spermien nicht immer zuverlässige und reproduzierbare Werte liefern (Jequier und Ukombe 1983). Unterschiedliche laboratorische Ausstattung, Färbemethoden sowie die Qualität und Erfahrung der Untersucher haben erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse und erschweren den objektiven Vergleich von untersuchten Ejakulaten erheblich. Ein weiterer Nachteil konventioneller, subjektiver Untersuchungsmethoden ist die geringe Anzahl an evaluierten Spermien, die nur einen kleinen Ausschnitt einer Ejakulatprobe darstellen. Für die diagnostische Beurteilung einer Spermaprobe sind objektivere Untersuchungsmethoden, die mehrere hundert Spermien einer Ejakulatprobe evaluieren, somit von großer Bedeutung (Amann und Katz 2004).

Die Entwicklung der computerassistierten Spermienanalyse, kurz CASA, bietet eine wertvolle Möglichkeit, die genannten Probleme zu reduzieren (Iguer-Ouada und Verstegen 2001). CASA ist ein hilfreiches Instrument, um die Analyse von Ejakulaten zu präzisieren und objektiv durchzuführen (Davis et al. 1992, Amann und Waberski 2014). Sie zeigen deutlich geringere Variationskoeffizienten im Vergleich zu manuellen, subjektiven Untersuchungsmethoden (Ginsburg et al. 1988) und finden in der Tiermedizin seit Jahrzehnten Anwendung. Sie ergänzen konventionelle Untersuchungsmethoden, indem sie objektiv mehrere tausend Spermien in sehr kurzer Zeit auf verschiedenste Parameter untersuchen. Moderne Systeme sind in der Lage die Motilität, die Konzentration, die Membranintegrität sowie die Morphologie zu untersuchen (Amann und Waberski 2014). Auch für Rüdenejakulate

gewinnt CASA zunehmend an Bedeutung. Günzel-Apel et al. (1993) beschrieben erstmalig den Einsatz von CASA für Rüden.

3.5.1. Motilitätsbeurteilung mittels CASA

Um die Motilität der Spermien einer Ejakulatprobe zu ermitteln, analysiert die CASA-Software die Bewegung einzelner Spermien. Hierzu wird die Position eines Spermienkopfes markiert und seine Trajektorien aus aufeinanderfolgenden Bildsequenzen (je nach Hersteller des Gerätes unterschiedliche Bildanzahlen) rekonstruiert (Rijsselaere et al. 2012). Eine Wiedergabevorrichtung der Bildsequenzen ist für die meisten Geräte verfügbar und dient der Überprüfung, ob tatsächlich alle Spermienköpfe markiert bzw. ob Fremdzellen fälschlicherweise als Spermien detektiert wurden. Aus der Rekonstruktion berechnet die Software simultan verschiedene Motilitätsparameter. Neben der Gesamtmotilität, der progressiven (unterteilt in schnell und langsam) und lokalen Motilität sowie der Immotilität berechnet die Software zusätzlich die Linearität der Bewegung, die Amplitude der seitlichen Kopfbewegung des Spermiums sowie multiple Geschwindigkeitsparameter. All diese Parameter sind mit einer konventionellen visuellen Motilitätsbeurteilung nicht bestimmbar. Es wird somit möglich in kurzer Zeit ein detailliertes Motilitätsprofil für ein Ejakulat zu erstellen (Rijsselaere et al. 2012). Die Aussagekraft von CASA-Ergebnissen in Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit eines Rüden wird diskutiert. In einer humanmedizinischen Studie von Hirano et al. (2001) konnten positive Korrelationen für Motilitätsparameter und erfolgreiche IVF ermittelt werden.

Um CASA-Systeme sinnvoll einzusetzen müssen auch hierbei Untersuchungsstandards und -protokolle unbedingt eingehalten werden (Davis und Katz 1992, Holt et al. 1994). Fehler in der Anwendung sowie unterschiedliche Softwareeinstellung von verschiedenen Untersuchern führen zu unzureichenden, nicht vergleichbaren Ergebnissen (Smith und England 2001, Verstegen et al. 2002).

3.5.2. Morphologiebeurteilung mittels CASA

Neben der Spermienkonzentrationsbestimmung, der Membranintegrität sowie der Motilitätsbeurteilung ist es möglich, die Morphologie eines Spermiums mithilfe von CASA-Systemen zu untersuchen. In den meisten veterinärmedizinischen Laboratorien dominiert jedoch noch die subjektive Morphologiebeurteilung (Wang et al. 2011). Die CASA gestützte Morphologiebeurteilung ist Gegenstand verschiedener, hauptsächlich humanmedizinischer Studien. Für Rüden ist hierzu bisher nur

wenig Literatur zu finden (Rijsselaere et al. 2004). Die Studien von Dahlbom et al. (1997) und Soler et al. (2017) beschäftigten sich im Speziellen mit der Kopfmorphometrie und -morphologie caniner Spermien. Beurteilt werden, wie nach der konventionellen Untersuchungsmethode, der Kopf, das Mittelstück und der Schwanz des Spermiums (Abbiramy und Shanthi 2010, Wang et al. 2011). Untersuchungen hierzu liefern vergleichbare Ergebnisse zwischen der CASA und der konventionellen Morphologiebeurteilung (Steigerwald und Krause 1998). Die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse ist dabei abhängig von den Softwareeinstellungen sowie der Spermienkonzentration in der vorliegenden Probe (Rijsselaere et al. 2004). Die Erkennung morphologisch normaler Mittelstücke durch das CASA-System erwies sich als unzureichend, ähnliche Probleme gab es bei der Erkennung von eingerollten bzw. abgeknickten Spermischwänzen (Steigerwald und Krause 1998). Ein weiterer Nachteil ist der hohe zeitliche Aufwand morphologischer CASA Beurteilung, eine konventionelle subjektive Morphologiebestimmung durch einen erfahrenen Untersucher ist unter Umständen schneller durchzuführen (Steigerwald und Krause 1998). Folglich stellt die computergestützte Morphologiebeurteilung für Rüdenejakulate noch keine ausreichende Alternative zur konventionellen visuellen Beurteilung dar, bietet aber die Möglichkeit, detaillierte morphometrische Parameter zu erfassen und zeigt niedrigere Variationskoeffizienten im Vergleich zu subjektiven Methoden (Coetzee et al. 1999, Rijsselaere et al. 2004).

4. Referenzwerte für Rüdenejakulate und Hodendimensionen

Referenzbereiche für labordiagnostische Parameter finden zur Validierung von Untersuchungsergebnissen und zur Erstellung von medizinischen Befunden Anwendung. Sie bilden die Grundlage für die Bewertung von Ergebnissen aus individuell ermittelten Labormessungen (Solberg 1987). Das Vorliegen von Referenzwerten für Ejakulate sowie Grenzwerte für Hodendimensionen von Rüden ist somit essentiell, um eine Aussage über die Quantität und Qualität einer Ejakulatprobe sowie die Physiologie der Hoden treffen zu können und das Fertilitätspotential eines Rüden einordnen zu können.

4.1. Überblick Referenzwerte für Rüdenejakulate

Schon seit vielen Jahren beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Beschaffenheit von Rüdenejakulaten. Eine erste Beschreibung von Rüdensperma erfolgte bereits 1678 durch van Leeuwenhoek (Schierbeek 1953). Mann fasste in seinem Buch „the biochemistry of semen“ aus dem Jahre 1954 Ergebnisse verschiedener Untersucher für unterschiedliche Tierarten zusammen, hierunter auch Rüdenejakulate. Erste ausführliche Untersuchungen für Rüden führte Bartlett 1962 durch. In seiner Studie untersuchte er drei Mischlingsrüden über einen Zeitraum von drei Jahren mit unterschiedlichen Absamungsfrequenzen. In detaillierten Tabellen sind in seiner Arbeit Mittelwerte für Spermaparameter zu finden (Abb. 1 und 2). Viele weitere Arbeiten zu Spermaparametern von Rüden existieren in der Literatur. Die meisten Studien basieren hierbei auf der Untersuchung von Standardhunderassen wie Beagle, Labradorern, Retrievern und Deutschen Schäferhunden (Boucher et al. 1958, England und Allen 1989, Iguer-Ouada und Versteegen 2001). Des Weiteren sind Studien zu finden, die nur Spermaparameter einer einzelnen Hunderasse betrachten (Heywood und Sortwell 1971, James et al. 1979, Hesser et al. 2017). Zum Teil wird in der Literatur nicht ersichtlich, wie viele Hunde bzw. welche Rassen für die Erstellung der Richtwerte untersucht wurden (Olar et al. 1983, Johnston 1991). Häufig ist unklar, ob die in den Studien untersuchten Rüden fertil waren bzw. Fertilität wird durch die Untersucher nicht definiert.

	<i>Unfractionated ejaculate</i>	<i>1st fraction</i>	<i>2nd fraction</i>	<i>3rd fraction</i>	<i>No. ejaculates</i>
Duration of ejaculation	11 ± 0.2 min **	27 ± 0.3 sec **	52 ± 0.4 sec *	8 ± 0.1 min **	332, 50, 50, 50
Ejaculate vol. ml	12.0 ± 0.2 **	0.9 ± 0.0 **	2.6 ± 0.1 **	9.2 ± 0.3 **	319, 131, 131, 131
ml/100 kg live weight	81 ± 1.4 **				319, 0, 0, 0
Sperm conc. cells × 10 ⁶ /ml	53 ± 2.1 **		247 ± 9.9 **	10 ± 0.8 **	139, 0, 157, 157
Sperm content cells × 10 ⁶	528 ± 25.8 **		637 ± 31.7 **	76 ± 6.9 **	139, 0, 157, 157
% Dead sperm at 18 to 23° C.	20 ± 1.0 **		15 ± 0.8 **		104, 0, 91, 0

Abbildung 1: Ejakulatparameter von Rüden nach Bartlett Teil 1 (1962)

	<i>Total spermatozoa</i>	<i>'Live' spermatozoa</i>	<i>'Dead' spermatozoa</i>	<i>No. ejaculates</i>
Abnormal spermatozoa	15 ± 1.6 n.s.	5 ± 0.8 ** (6 ± 0.8 **)	10 ± 1.2 n.s. (60 ± 4.6 **)	30
Head abnormalities	11 ± 1.4 n.s.	3 ± 0.6 ** (4 ± 0.7 **)	8 ± 1.2 n.s. (48 ± 5.0 n.s.)	30
Neck abnormalities	5 ± 1.5 **	1 ± 0.4 n.s. (1 ± 0.7 n.s.)	4 ± 1.2 ** (21 ± 4.5 **)	30
Midpiece abnormalities + c.d.	21 ± 5.0 **	20 ± 4.8 ** (24 ± 5.9 **)	2 ± 0.3 n.s. (15 ± 2.7 n.s.)	30
— c.d.	2 ± 0.5 n.s.	1 ± 0.4 n.s. (2 ± 0.5 *)	1 ± 0.3 n.s. (8 ± 2.3 n.s.)	30
Tail abnormalities	7 ± 0.8 n.s.	4 ± 0.6 ** (5 ± 0.8 *)	3 ± 0.4 n.s. (17 ± 2.6 n.s.)	30

** Significant difference between dogs, $P < 0.01$

* Significant difference between dogs, $P < 0.05$

n.s. No significant difference between dogs, $P > 0.05$

'Live' and 'dead' sperm abnormalities are expressed as a percentage of the total sperm population, and also, in parentheses, as a percentage of the 'live' or 'dead' sperm in the total population. c.d. indicates the inclusion (+) or the exclusion (−) of cytoplasmic droplets as abnormalities.

Abbildung 2: Ejakulatparameter von Rüden nach Bartlett Teil 2 (1962)

4.1.1. Spermaparameter in Bezug auf das Körpergewicht

Eine mögliche Einteilung von Spermaparametern erfolgt nach dem Körpergewicht des untersuchten Rüden. Der Einfluss des Körpergewichtes auf bestimmte Spermaparameter wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen. Hendrikse und Antonisse (1984) konnten eine Korrelation von Gesamtspermienzahl und Körpergewicht feststellen. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Olar et al. (1983) überein, die einen Zusammenhang der Hodengröße, welche abhängig vom Körpergewicht des Rüden ist, mit der Gesamtspermienzahl feststellen konnten. Bartlett (1962) unterteilte die Spermaparameter nicht nach Gewichtsklassen bzw. Körpergröße der Rüden errechnete jedoch eine Ejakulatmenge von $81 \pm 1,4$ ml / 100 kg Körpergewicht (Abb. 1). Eine Unterteilung von Spermaparameter nach Körpergewicht erfolgte durch Günzel-Apel et al. im Jahre 1994. Sie kategorisierten Ejakulate von 243 Rüden, 70 unterschiedlicher Rassen. Die Rüden wurden fünf unterschiedlichen Gewichtsgruppen von < 10 kg, 11 bis 20 kg, 21 bis 40 kg, 41 bis 60 kg und > 60 kg Körpergewicht zugeteilt (Abb. 3). Die Relation zwischen Körpergewicht und Gesamtspermienzahl zeigte die Autorin anhand geringerer Tierzahlen schon in vorherigen Studien, in denen sie die untersuchten Parameter kleinen, mittelgroßen und großen Rüden zuordnete (Günzel-Apel 1986, Günzel-Apel 1990). Auch aktueller Untersuchungen befassen sich mit dem Zusammenhang von Körpergröße bzw.

Körpergewicht und Spermaparametern. Rijsselaere et al. bestätigten in ihrer Studie von 2007 erneut den Zusammenhang von Körpergewicht und Gesamtspermienzahl. Sie unterschieden hierbei drei Gewichtsgruppen von < 20 kg, 20 bis 40 kg sowie > 40 kg Körpergewicht. Goericke-Pesch und Failing (2013) unterteilten Spermaparameter in drei Gewichtsgruppen von < 10 kg (klein), 10 bis 30 kg (mittelgroß), sowie > 30 kg (groß) Körpergewicht (Abb. 4). In dieser Studie konnten nur geringe Unterschiede der Gesamtspermienzahl zwischen den Untergruppen festgestellt werden. Da in dieser Studie keine Selektion auf Fertilität stattfand, vermuten die Autoren, dass sub- bzw. infertile Rüden die geringen Gewichtsklassenunterschiede verursachen. Tesi et al. (2018) unterteilten in ihrer Studie ebenfalls in drei Gewichtsgruppen von < 15 kg (klein), 16 bis 40 kg (mittelgroß) und > 40 kg (groß) Körpergewicht (Abb. 5). Eine Korrelation von Körpergewicht, Ejakulatvolumen, Gesamtspermienzahl sowie signifikante Unterschiede dieser Parameter zwischen den unterschiedlichen Gewichtsgruppen wurden auch in dieser Studie festgestellt. Die Spermienkonzentration sowie Motilitäts- und Morphologieparameter verhielten sich in nahezu allen Studien unabhängig vom Körpergewicht.

Ejakulatmerkmal	Körpergewicht (kg)				
	≤ 10	11–20	21–40	41–60	> 60
Volumen insgesamt in ml (min.)	5–10 (5)	5–10 (5)	10–20 (5)	15–>30 (10)	15–>30 (10)
Volumen der spermienreichen Ejakulatfraktion in ml	0,5–1,0	0,5–2,0	1,0–2,0	1,0–3,0	1,0–3,0
Spermiengesamtzahl, 10 ⁶ (min.)	450 (300)	800 (500)	1200 (800)	1500 (1000)	1500 (1000)
vorwärtsbewegliche Spermien in % (min.)	60–70 (50)				
membrangeschädigte Spermien in % (max.)	5–10 (15)				
formabweichende Spermien in % (max.)	10–25 (30)				

Abbildung 3: Ejakulatparameter von Rüden in Bezug auf das Körpergewicht nach Günzel-Apel (1994)

Table 2. Median (\bar{x}) results and first and third quartile (Q_1/Q_3) of ejaculate analysis of the sperm-rich fraction in respect to category of body weight of dogs: Samples of small dogs (< 10 kg, n = 54), medium size dogs (10–30 kg, n = 164) and large dogs (> 30 kg, n = 182)

Parameter	Small dogs	Medium size dogs	Large dogs
	\bar{x} (Q_1/Q_3)	\bar{x} (Q_1/Q_3)	\bar{x} (Q_1/Q_3)
Volume (ml)	1.1 (0.8/1.5)	1.7 (1.0/2.4)	2.0 (1.5/3.5)
pH	6.2 (6.2/6.4)	6.2 (6.2/6.4)	6.4 (6.2/6.4)
% Progressively motile sperm	80 (70/90)	80 (75/90)	80 (70/90)
% Live spermatozoa	87.0 (72/90)	87.0 (76.5/90.6)	85.0 (73.5/90.0)
% Pathomorphology	20.0 (15.5/30.5)	22.5 (14.9/38.5)	22.0 (13.1/34.5)
Concentration ($\times 10^6$ /ml)	270 (160/360)	300 (197.5/412.5)	250 (110/390)
Total sperm count ($\times 10^6$)	344 (175/450)	522.5 (300/810)	497.5 (275/862)
% Non-curved tails (HOS)	5.0 (3.0/10.9)	6.5 (4.3/9.5)	7.0 (5.0/10.9)
% Spermatozoa with detached acrosomes (Spermac [®])	1.5 (1.0/2.0)	1.0 (0.5/2.0)	1.5 (1.0/2.5)

Abbildung 4: Ejakulatparameter von Rüden in Bezug auf das Körpergewicht nach Goericke-Pesch und Failing (2013)

	Volume (ml)	Sperm concentration ($\times 10^6$)	Total sperm number ($\times 10^6$)	Subjective motility (%)
Cryopreservation	3.73 \pm 0.62 ^b (n = 18)	297.8 \pm 53.3 ^a (n = 18)	683.1 \pm 84.3 ^a (n = 18)	75.1 \pm 3.5 (n = 18)
AI	5.21 \pm 0.29 ^a (n = 48)	123.5 \pm 11.8 ^b (n = 48)	564.0 \pm 49.1 (n = 48)	76.6 \pm 3.0 (n = 47)
Research	3.48 \pm 0.39 ^b (n = 26)	206.5 \pm 18.7 ^a (n = 26)	647.8 \pm 84.1 (n = 26)	83.4 \pm 1.7 (n = 26)
Evaluation	4.28 \pm 0.45 ^b (n = 46)	132.0 \pm 14.9 ^b (n = 46)	453.6 \pm 48.1 ^b (n = 46)	69.4 \pm 3.7 (n = 45)
ANOVA	GLM	GLM	GLM	K-W
P-value	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.05	P > 0.05
Large size	5.34 \pm 0.45 ^b (n = 31)	164.4 \pm 26.2 (n = 31)	692.6 \pm 83.4 ^b (n = 31)	69.3 \pm 4.4 (n = 31)
Medium size	4.24 \pm 0.27 ^b (n = 93)	166.6 \pm 13.0 (n = 93)	551.3 \pm 33.7 ^b (n = 93)	77.9 \pm 1.9 (n = 91)
Small size	3.22 \pm 0.40 ^a (n = 14)	153.2 \pm 39.1 (n = 14)	309.6 \pm 45.4 ^a (n = 14)	71.4 \pm 6.2 (n = 14)
ANOVA	GLM	GLM	GLM	K-W
P-value	P < 0.01	P > 0.05	P < 0.01	P > 0.05
Young	4.24 \pm 0.37 (n = 29)	169.4 \pm 19.5 (n = 29)	577.2 \pm 59.8 (n = 29)	77.3 \pm 3.8 (n = 29)
Adult	4.79 \pm 0.33 (n = 74)	151.4 \pm 12.4 (n = 74)	572.5 \pm 46.0 (n = 74)	74.3 \pm 2.7 (n = 72)
Old	3.65 \pm 0.34 (n = 35)	188.8 \pm 31.6 (n = 35)	513.4 \pm 54.7 (n = 35)	75.7 \pm 2.5 (n = 35)
ANOVA	GLM	GLM	GLM	K-W
P-value	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05

GLM: General linear model. K-W: Kruskal Wallis test. Values with different superscripts within the same column and group of variables are statistically different (a \neq b, c \neq d; P < 0.05).

Abbildung 5: Ejakulatparameter von Rüden in Bezug auf den Grund der Ab-samung, das Körpergewicht und das Alter nach Tesi et al. (2018)

4.1.2. Spermaparameter in Bezug auf das Alter

Der Einfluss des Alters auf die Beschaffenheit eines Ejakulates, bzw. qualitativer und quantitativer Spermaparameter ist in verschiedenen humanmedizinischen Studien beschrieben (Kidd et al. 2001, Fisch et al. 1996, Rolf et al. 1996). Beobachtet wurden ein Rückgang der Gesamtspermienzahl sowie eine verringerte Spermienmotilität mit zunehmendem Alter bei Männern (Fisch et al. 1996, Rolf et al. 1996). Diese Beobachtungen konnte in Mausmodellen bestätigt werden (Parkening et al. 1988, Wang et al. 1993). Diese humanmedizinischen Erkenntnisse ließen sich auf verschiedene Tierarten übertragen (Dowsett und Knott 1996). Auch das Alter von Rüden und der potentielle Effekt auf ihre Fertilität ist Gegenstand aktueller Forschung. Mehrere Studien konnten für Rüden einen Zusammenhang zwischen Alter

und dem Anteil morphologisch veränderter Spermien herstellen (Rijsselaere et al. 2007, Brito et al. 2018, Tesi et al. 2018). In der Studie von Brito et al. (2018) wurden deutlich höhere Werte für Spermienanomalien für senile Rüden im Vergleich zu jungen Rüden festgestellt (Abb. 6). Ein Rückgang der Gesamtspermienzahl wurde durch Hendriske und Antonisse (1984) festgestellt und durch Goericke-Pesch und Failing (2013) bestätigt. Auch Bhanmehchao et al. (2018) beschäftigten sich mit dem Einfluss des Alters auf Spermparameter und untersuchten hierzu das Sperma aus den Nebenhoden kastrierter Rüden unterschiedlichen Alters. Sie konnten deutliche Qualitätseinbußen im Sinne von vermehrt morphologisch veränderten Spermien, verringerter Motilität sowie verminderter Vitalität für ältere bzw. senile Rüden feststellen.

Variable	Young	Senile	p
Sexual libido score (1-3)	2.76 ± 0.05	2.5 ± 0.06	0.0007
Volume of the ejaculate (ml)	1.88 ± 0.11	1.95 ± 0.14	0.7273
Ejaculate aspect score (1-3)	2.59 ± 0.06	2.44 ± 0.06	0.0808
Sperm concentration (million sperm/ml)	468.35 ± 39.16	415.43 ± 30.08	0.2329
Spermatic motility (%)	79.67 ± 1.46	73.14 ± 1.37	0.0001
Sperm vigour (0-5)	3.34 ± 0.07	2.98 ± 0.06	<0.0001
Plasmatic membrane integrity (%)	86.28 ± 1.49	82.91 ± 1.15	0.0232
Acrosomal membrane integrity (%)	96.49 ± 0.53	95.56 ± 0.38	0.1056
Major sperm defects (%)	10.24 ± 0.98	32.66 ± 2.16	<0.0001
Minor sperm defects (%)	6.31 ± 0.64	6.56 ± 0.66	0.7835
Total sperm defects (%)	16.54 ± 1.42	39.22 ± 2.17	<0.0001
Sperm Proximal droplet (%)	1.59 ± 0.37	23.18 ± 2.27	<0.0001
Sperm Distal droplet (%)	1.25 ± 0.18	2.66 ± 0.52	0.0109

Note. NA: not applicable. Bold values differ between young and senile dogs (p < 0.05).

Abbildung 6: Ejakulatparameter für Rüden in Bezug auf das Alter nach Brito et al. (2018)

4.2. Hodendimensionen

Die Hoden sind der Ort der Spermienproduktion. Die Menge an Hodengewebe (bzw. die Hodenmaße) korreliert mit der Spermienproduktion (Olar et al. 1983). Das Spermienproduktionspotential kann somit aus dem Hodengewicht abgeleitet werden (Olar et al. 1983). Um zu entscheiden, ob ein Rüde ausreichend Spermien produziert ist die Ermittlung der Hodenmaße im Rahmen der andrologischen Untersuchung ein wichtiger Untersuchungsschritt. Ebenso lassen sich über die Bestimmung der Hodengröße Hinweise auf ein pathologisches Geschehen im Sinne einer

pathologischen Vergrößerung oder Verkleinerung erlangen (Günzel-Apel 2016). Das Hodengewicht wird bestimmt durch die Hodengröße, welche wiederum bestimmt wird durch die Körpergröße des Rüden (Günzel-Apel 1994, Amann 1986). Der Hodenumfang korreliert direkt mit dem Hodengewicht (Olar et al. 1983, Woodall und Johnstone 1988). Aufgrund der extremen Größenunterschiede verschiedener Hunderassen muss die Hodengröße eines Rüden immer in Bezug auf sein Körpergewicht betrachtet werden (Olar et al. 1983, Woodall und Johnstone 1988).

Auch für andere Tierarten spielen die Hodendimensionen bei der Prüfung der Zuchttauglichkeit eine maßgebliche Rolle. Der Hodenumfang eines Bullen ist ein wichtiges Kriterium bei der Zuchttauglichkeitsuntersuchung (Chenoweth und McPherson 2016, Palmer 2016). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Hodenumfang bzw. das daraus resultierende Hodengewicht positiv mit der Spermienproduktion korrelierte (Foote et al. 1977, Kastelic et al. 2001). Aus dem Hodenumfang, respektive dem Hodengewicht, lässt sich die Spermienproduktion, der „daily sperm output“ (DSO) eines Bullen abschätzen (Hahn et al. 1969). Auch für Hengste wird der Hodenumfang, bzw. das Hodenvolumen genutzt, um den DSO abzuschätzen (Love et al. 1991, Thompson et al. 2004). Olar et al. (1983) übertragen diese Ansätze für Rüden und konnten ebenfalls einen Zusammenhang von Hodenumfang und dem DSO ermitteln.

Verschiedene Untersuchungsmethoden ermöglichen die Vermessung der Hoden. Eine einfache und günstige Methode der Hodengrößenbestimmung ist die Anwendung einer Schieblehre (Taskinen et al. 1996). Verglichen mit moderneren Untersuchungsmethoden liefert die Schieblehre allerdings ungenauere Ergebnisse (Anatol et al. 2006). Das Hodenvolumen lässt sich aus der Höhe (H), Breite (B) und Länge (L) berechnen. Verschiedene Formeln zur Berechnung des Volumens wurden miteinander verglichen, wobei sich mit der Formel $H_{VOL} = L * H * B * 0,71$ Volumina berechnen ließen, die mit dem tatsächlichen Hodenvolumen am engsten korrelierten (Paltiel et al. 2002, Sakamoto et al. 2007). Durch den Vergleich der Hoden eines Rüden mit einem Orchidometer lässt sich das Hodenvolumen ohne Rechenaufwand kostengünstig und einfach bestimmen. In einer Vergleichsstudie verschiedener Messmethoden wurde das Hodenvolumen durch die orchidometrische Bestimmung allerdings geringfügig überschätzt (Anatol et al. 2006). Erfahrene

Untersucher konnte das Volumen mittels Orchidometrie genauer bestimmen als unerfahrene (Behre et al. 1989). Die präzisen Werte für eine Volumenbestimmung liefert eine sonografische Vermessung der Hoden (Fuse et al. 1990). Diese Untersuchungsmethode ist der Goldstandard für die Beurteilung der Hoden, da sie neben der Messung die strukturelle Beurteilung des Hodengewebes ermöglicht, woraus wichtige Hinweise auf pathologische Veränderungen im Hoden gewonnen werden können (Pugh et al. 1990, England 1991). Ultraschallwellen haben hierbei keinen schädlichen Einfluss auf die Spermatogenese bzw. die Spermaqualität (Coulter und Bailey 1988). Anders als bei Moxon et al. (2015), welche eine Korrelation von Hodenechogenität und Anteil morphologisch normaler Spermien feststellen konnten, konnten in einer Studie von England et al. (2017) keine Erkenntnisse über zukünftige quantitative oder qualitative Spermaparameter durch die Sonografie gewonnen werden.

Um zu überprüfen, ob ein Rüde normale Hodendimensionen aufweist werden, ebenso wie zu der Beurteilung der Ejakulatparameter, Referenzwerte benötigt. Da die Hodengröße abhängig von der Körpergröße des Rüden ist, liegt eine Einteilung der Referenzwerte für Hodendimensionen nach Körpergewicht nahe. Günzel-Apel et al. (1994) lieferten in ihrer Studie Richtwerte für fünf unterschiedliche Gewichtsgruppen (Abb. 7). Vergleichswerte werden auch in vorherigen Studien von Günzel-Apel (1990), sowie von Amann (1986) gegeben, allerdings wird hierbei nur grob nach kleinen, mittelgroßen und großen Rüden unterschieden.

Tab. 4-4 Richtwerte und noch tolerierbare Grenzwerte (min.) der Hodengröße (-länge, -breite) von Rüden entsprechend ihrem Körpergewicht (Günzel-Apel et al. 1994)

Hodenmaße in cm	Körpergewicht (kg)				
	≤10	11–20	21–40	41–60	>60
Länge (min.)	2,5 (2,0)	3,5 (2,8)	3,8 (3,0)	4,3 (3,4)	4,5 (3,6)
Breite (min.)	1,8 (1,4)	2,4 (1,9)	2,7 (2,2)	3,1 (2,5)	3,1 (2,5)

Abbildung 7: Richtwerte für Hodengrößen von Rüden in Bezug auf das Körpergewicht nach Günzel-Apel (1994)

III. PUBLIKATION

Semen parameters and testicular dimensions in small breed dogs below ten-kilogram bodyweight

R. Zeller¹, med. vet.

A. Meyer-Lindenberg¹, Prof., Dr. med. vet.

B. Walter¹, Dr. med. vet., Dipl. ECAR

C. Leykam¹, med.vet.

U. Flock¹, Dr. med. vet.

S. Reese², PD, Dr. med. vet.

C. Otzdorff¹, Dr. med. vet., Dipl. ECAR

¹ Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

² Veterinary Department, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Ludwig Maximilians University, Veterinaerstrasse 13, 80539 Munich, Germany

Accepted, 1st July 2019

Received: 16 May 2019 | Accepted: 1 July 2019

DOI: 10.1111/rda.13504

ORIGINAL ARTICLE

Reproduction in Domestic Animals WILEY

Semen parameters and testicular dimensions in small breed dogs below ten-kilogram bodyweight

Romy Zeller¹  | Andrea Meyer-Lindenberg¹ | Beate Walter¹ | Christian Leykam¹ | Ulrike Flock¹ | Sven Reese² | Christiane Otzdorff¹

¹Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

²Veterinary Department, Institute of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Ludwig Maximilians University, Munich, Germany

Correspondence
Romy Zeller, Clinic of Small Animal Surgery and Reproduction, Center for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany.
Email: Romy.Zeller@gmx.de

Abstract

Because of few available data on semen parameters in small breed dogs, the study aimed to analyse semen and measure testes of dogs ≤ 10.0 kg bodyweight. Semen was collected from 41 fertile stud dogs, which were divided based on bodyweight: group 1 ≤ 5.0 kg and group 2 between 5.1 and 10.0 kg. Median values for ejaculate volume (group 1: \bar{x} 1.2 ml; group 2: \bar{x} 2.2 ml), total sperm output (group 1: \bar{x} 110.7×10^6 ; group 2: \bar{x} 215.1×10^6) and testicular volume (group 1: left testicle \bar{x} 2.8 ml, right testicle \bar{x} 2.7 ml; group 2: left testicle \bar{x} 5.5 ml, right testicle \bar{x} 5.0 ml) were lower in group 1 compared to dogs of group 2 ($p = .001$; $p = .001$; both testes: $p < .001$). There was no difference in sperm concentration ($p = .985$). Based on these results, introduction of an additional weight group to the commonly used reference values is recommended, since values for ejaculate volume, total sperm output and testicular dimensions for dogs ≤ 5.0 kg bodyweight differed significantly from values of dogs with a bodyweight from 5.1 to 10.0 kg.

KEYWORDS

bodyweight, canine, dogs, semen, testes

1. Introduction

Semen analysis is a major part during andrological and breeding soundness examinations in dogs.^{1 2} The evaluation can distinguish between fertile, sub- and infertile dogs and determine whether sperm is suitable for cryopreservation and serves for calculation of insemination doses for artificial inseminations.³

Most reference values for semen parameters in dogs are derived from semen samples obtained from medium-sized or large breed dogs such as Beagles, Retrievers or German shepherds.⁴⁻⁶ In addition many studies are lacking the information if the examined dogs have ever successfully sired offspring.⁶⁻⁹ Günzel-Apel and others set up reference values for semen parameters based on the bodyweight (BW) of the dogs.¹⁰ The group with the lowest BW (< 10 kg) comprised 33 fertile dogs. There is no information which breeds were assessed or how weight distribution was in this group. Semen parameters differed significantly between different weight groups. Furthermore, Rijsselaere and others,¹¹ Tesi and others¹² and Goericke-Pesch and others¹³ also examined semen parameters in relation to BW with their lightest groups at below 20 kg, below 15 kg and below 10 kg.

To the best of our knowledge, there is no published data on semen parameters of small breed dogs with a BW below 5.0 kg. There is also a lack of data on testicular dimensions for small breed dogs.¹⁰ The popularity for small and toy dog breeds is increasing over the last years. At the same time stud dogs of toy breeds are presented for andrological examinations or semen collection for preservation purposes and artificial inseminations. Therefore, more data on semen parameters, testicular dimensions and reference values for dogs ≤ 10.0 kg BW and particular for dogs <5.0 kg BW are needed.

The objective of this study was the semen evaluation and the determination of testicular dimensions of healthy fertile dogs with a maximum BW of 10.0 kg. The comparison of the results of dogs ≤ 5.0 kg and the dogs between 5.1 to 10.0 kg BW served to reveal potential differences between the two groups and to establish new reference values for dogs ≤ 5.0 kg BW.

2. Materials and methods

The study was conducted according to the German animal welfare law (approved by Ethics Commission, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Ludwig Maximilians University Munich, Germany; reference number 110-04-02-2018).

2.1 Dogs

Study participants were privately owned stud dogs. All owners were informed about the purpose of the study and gave their written consent. Only clinically healthy and fertile dogs were included. Dogs were considered to be fertile when they had sired at least one litter within the previous 12 months and no clinical evidence for impaired fertility was given. Forty-one stud dogs of 14 different breeds (12 Miniature Poodles, eight Chihuahuas, six Toy Poodle, three Dachshunds, two Russian Toyterriers, two Parson Russell Terriers and one of each of the following breeds Australian Silky Terrier, Norfolk Terrier, Italian Greyhound, Prague Rattler, Chinese Crested, Miniature Pinscher, Miniature Dachshund and Bolonka Zwetna) were examined in the present study.

2.2 Physical and andrological examination

Prior to semen collection medical and breeding history were recorded. Pedigree, mating records, pregnancy outcome, date of last mating and litter sizes of each dog were recorded, as recommended by Purswell and others.¹ Body temperature and vital parameters were assessed. Peripheral lymph nodes and abdomen were palpated. Libido, penis and prepuce were evaluated during the semen collection procedure. Scrotum, testes, spermatic cord and epididymes were examined for symmetry, consistency and location.

Testicular length (L), width (W) and height (H) were estimated using a linear 10.0 MHz ultrasound probe (LOQIC V2/ LOQIC V1, © 2015 General Electric Company, Solingen, Germany). Testicular volume (T_{VOL}) was calculated using the formula $T_{VOL} = L \times W \times H \times 0.71$.^{14 15}

2.3 Semen collection

Semen collection was performed in a clinical setting, in presence of a teaser bitch in oestrus. Semen was collected into a plastic semen collection bag (Minitube, Germany) by manual massage of the *bulbus glandis*, without differenti-

ation of particular ejaculate fractions. Dogs were presented for a second semen collection with a time delay of at least one week.

2.4 Semen analysis

Volume, colour and consistency were recorded immediately after semen collection. Sperm concentration and number of non-viable sperm were determined using a NucleoCounter[®] (SP-100; ChemoMetec, Allerød, Denmark), according to the manufacturer's recommendation. For evaluation of sperm morphology, a bromphenol-nigrosin-staining was prepared and analysed by one experienced observer. Sperm motility parameters (total motility, progressive, fast, slow, local motility and immotile sperm) were assessed with the CASA system AndroVision[®] (Minitube, Germany). Software settings of the AndroVision[®] used in the present study are given in Table 1. Prior to analysis semen was diluted to a concentration of 50×10^6 sperms per mL using a Biladyl A extender (Minitube, Germany). Seven different randomly selected microscopic fields were assessed.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 24.0 (SPSS Inc. Headquarters, Chicago, USA). The dogs were divided into two groups based on their BW. Group 1 (G1) consisted of 21 dogs weighing ≤ 5.0 kg. Group 2 (G2) consisted of 20 dogs with a BW from 5.1 to 10.0 kg. The distribution of the collected data did not follow a normal distribution. Mean values of the two semen samples of each dog were used to avoid pretending a higher sample size. For description of the data medians (\tilde{x}) and quartiles (Q_1/Q_3) are given. Comparison of both groups was performed using Mann-Whitney test. The C28-A3 guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were applied to estimate reference values for semen parameters.¹⁶ For lower reference limits the fifth centile (P_5), for upper reference limits the ninety-fifth centile (P_{95}) is given. Left and right testes were summarized as a mean value for the two-sided reference interval with the 2.5th and 97.5th centile ($P_{2.5}/P_{97.5}$). Values were tested for outliers according to Tukey. The Spearman's rho-correlation analysis across all dogs was used to evaluate correlation of the measurements with BW and age. Values were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Dogs

Mean age (\pm SD) of the dogs in G1 (n=21) and G2 (n=20) was 2.9 (1.6) years (range: 1.2 to 6.4) and 4.3 (2.6) years (range: 1.0 to 11.6), respectively (difference $P = 0.016$). Mean BW was 3.0 (0.8) kg (range: 1.8 to 4.6) in G1 and 6.9 (1.3) kg (range: 5.1 to 9.2) in G2.

3.2 Semen parameters and testicular measurements

Because of relatively low ejaculate volumes it was not possible to differentiate between the three ejaculate fractions as it is regularly performed.^{17 18} Ejaculates were greyish to white in colour, except of one containing sanguine discharge. The consistency varied from watery to milky. Table 2 shows median values and their first and third quartile (Q_1/Q_3) for semen characteristics for all dogs ≤ 10.0 kg BW and separated for dogs ≤ 5.0 kg and 5.1 to 10.0 kg BW. Ejaculate volume ($P = 0.001$) and TSO ($P < 0.001$) were lower in dogs of G1 compared to G2. With a median (\bar{x}) ejaculate volume of 2.2 mL ejaculate volume and a TSO of 215.1×10^6 , G2 showed twice as much ejaculate volume and TSO compared to G1. There were no differences in all other semen parameters evaluated.

Length, H and W of both testes were significantly smaller in G1 compared to G2. Consequently, T_{VOL} also differed significantly (Table 3).

3.3 Reference values

Reference values for quantitative and qualitative semen parameters of unfractionated ejaculate and testicular dimensions for dogs ≤ 5.0 kg and 5.1 to 10.0 kg BW were estimated (Table 4). A one-sided reference interval appeared to be more appropriate, as higher values are unlikely to have detrimental effects on fertility, the fifth centile (P_5) was used as the lower limit. For the percentage of dead sperms, TMA and immotile and local motile sperms the ninety-fifth centile (P_{95}) was used as the upper limit. Only parameters that showed a significant difference between G1 and G2 are presented separately for each weight group. The upper limit for TMA was 52.5%. Two dogs were detected as outliers for TMA, both belonging to G2. Therefore, those values were excluded and the upper reference limit without the outliers (39.3%) is given in parentheses. Values for testicular dimensions are given as a two-sided reference interval, since both reduction and enlargement of the

testes can be pathological.

3.4 Correlation of semen parameters and testicular dimensions to bodyweight and age

Results of the correlation analysis are given in Table 5. Positive correlations were observed between BW and ejaculate volume, TSO and T_{VOL} , respectively. Motility parameters and TMA were not significantly related to the BW. The age of the dogs was positively correlated with ejaculate volume; there was no correlation of age to all other evaluated semen parameters. The two oldest dogs showed high percentages for TMA (57% and 53.8%, respectively) including high percentages for proximal cytoplasmic droplets (33%; 43,3%).

4. Discussion

The relation between BW, semen parameters and testicular dimensions in dogs has been the subject of different studies before.¹⁰⁻¹³ While these studies showed that there are significant differences in ejaculate volume, TSO and testicular dimensions between different weight groups, limited data is available about these parameters in dogs weighing less than 10 kg BW. Therefore, the aim of this study was to describe more detailed the semen parameters and testicular dimensions of dogs weighing less than 10.0 kg BW and to especially estimate reference values for dogs ≤ 5.0 kg BW.

Previous studies determined a median value of 464×10^6 and 344×10^6 for TSO of dogs < 10 kg BW, but no data specifically for dogs ≤ 5.0 kg BW were reported.¹⁰⁻¹³ In the present study a lower median TSO of 155×10^6 for dogs ≤ 10 kg BW was observed. The lower TSO in the present study might be explained due to the evaluation of smaller dogs, since half of the study participants were ≤ 5.0 kg BW.

The present study showed a significant difference for the TSO between dogs ≤ 5.0 kg and dogs between 5.1 and 10.0 kg BW. Dogs of G2 had a median TSO of 215.1×10^6 compared to 110.7×10^6 in dogs of G1. There was no difference for sperm concentration between the two weight groups. A weight relation for TSO has been reported by Amann and others.¹⁹ It was assumed that the TSO is related to testicular size, which is lower in smaller dogs. Results of the correlation analysis

in this study confirmed this, since BW was correlated with TSO and T_{VOL} , and T_{VOL} correlated with TSO. Values for TSO of approximately 150×10^6 can be identified as normal for dogs below 10 kg BW. This should be considered when small dogs are presented for breeding soundness examinations.

The ejaculate volume was significantly lower in dogs ≤ 5.0 kg compared to 5.1 to 10.0 kg BW. The ejaculate volume is mainly determined by the prostatic secretion and prostatic size, respectively. Although the prostatic size was not evaluated in this study, it is well known that prostatic size is related to the BW.²⁰⁻²³

Due to the significant differences between G1 and G2, it appeared appropriate to establish reference values for a weight group of dogs ≤ 5.0 kg BW. To the best of the authors knowledge the present study is the first to determine values for semen parameters and testicular dimensions for dogs ≤ 5.0 kg BW. As expected, motility and morphology were independent of BW, therefore commonly used reference limits for morphology and motility apply to dogs of all weight groups. The upper limit for TMA (52.5%) appeared to be quite high compared to other reference values.^{10 13} When the two outlier dogs were excluded a value of 39.3% (n=39) resulted for TMA which seems to be more consistent with previous reports. The two excluded dogs were the oldest study participants. It has to be noted that the CLSI recommends higher sample sizes for the establishment of reference values.¹⁶ Since our sample size was rather low, further semen evaluation of small breed dogs is necessary to provide more precise reference limits.

The ultrasonographic examination of the testes delivered highly precise values for testicular dimensions compared to classic measurement methods.^{14 15 24} Measurements of G2 are comparable to results for dogs < 10 kg BW of Günzel-Apel and others.¹⁰ The present study is the first to give detailed values for testicular dimensions for dogs ≤ 5.0 kg BW.

Regarding to age, only a correlation with ejaculate volume could be determined. This might be explained due to benign prostatic enlargement of ageing dogs since the ejaculate volume is influenced by the amount of prostatic fluid.^{20 21} In contrast to other studies that determined an increase of morphological abnormalities in ageing dogs the author did not find a relation between age and TMA.^{11 12} However the two oldest dogs of the study (11.6 years; 6.7 years) showed high percentages for TMA and proximal cytoplasmic droplets, which appears

consistent with other studies.^{11 12 13 27} Proximal cytoplasmic droplets are suspected to impair fertilisation.²⁸ Brito and others detected correlations between age and motility parameters which could not be confirmed in this study.²⁷ However, mean age of the study participants was quite low (mean age < 5 years for G1 and G2), a lack of relation between age and the ejaculate characteristics in this study can be explained.

The relation of BW and TSO has again been demonstrated in this study. The study showed lower median values for ejaculate volume and TSO in dogs below 10 kg BW. Furthermore, there were significant differences in ejaculate volume, TSO and testicular dimensions between dogs ≤ 5.0 kg and dogs from 5.1 to 10.0 kg BW. Based on these results an additional weight group of dogs ≤ 5.0 kg BW should be added to the commonly used reference values for semen parameters and testicular dimensions.

Sperm number is also an important parameter in artificial insemination. An insemination dose of 150 to 200 x 10⁶ normal sperm is recommended^{29 30}. In order to fulfil this requirement, several semen collections are necessary in small breed dogs because of their lower TSO, especially in dogs ≤ 5.0 kg BW. A previous study showed a pregnancy rate of 85% when seven bitches were inseminated with inseminations doses ranging from 30 to 35 x 10⁶ normal sperm.³¹ Subsequent research has to be done to achieve good pregnancy rates with lower insemination doses for small breed dogs.

6. Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in public, commercial, or not-for-profit sectors. Preliminary results were presented at the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress, Venice, 22nd - 24th June 2018. We sincerely thank Prof. Dr. Joachim Braun and Dr. Angelika von Heimendahl for linguistic and textual adjustments.

7. Conflict of interest

Declarations of interest: none

References

1. Purswell BJ, Althouse GC, Kustritz MVR. Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. *Clinical Theriogenology*. 2010;2:51-9.
2. Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1991;21(3):545-51.
3. Root Kustritz MV. The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 2007;68(3):329-37.
4. England GC, Allen WE. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec*. 1989;125(15):399.
5. England GC. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology*. 1999;52(6):981-6.
6. Heywood R, Sortwell RJ. Semen evaluation in the Beagle dog. *J Small Anim Pract*. 1971;12(6):343-6.
7. Boucher JH, Foote RH, Kirk RW. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet*. 1958;48(1):67-86.
8. Bartlett DJ. Studies on dog semen. *J Reprod Fertil*. 1962;3:190-205.
9. Christiansen IJ. Reproduction in the dog and cat. London: *Baillière Tindall*. 1984.
10. Günzel-Apel A-R, Terhaer P, Waberski D. Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte. *Kleintierpraxis* 1994;7(3):S. 483-6
11. Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G et al. Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Reprod Domest Anim*. 2007;42(2):143-8.
12. Tesi M, Sabatini C, Vannozzi I et al. Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study. *Theriogenology*. 2018;118:34-9.
13. Goericke-Pesch S, Failing K. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS)

test and acrosomal evaluation using Spermac. *Reprod Domest Anim.* 2013;48(2):213-7.

14. Sakamoto H, Saito K, Oohta M et al. Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. *Urology.* 2007;69(1):152-7.

15. Paltiel HJ, Diamond DA, Di Canzio et al. Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. *Radiology.* 2002;222(1):114-9.

16. Horowitz GL. EP28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-third edition. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2010.

17. Freshman JL. Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2002;17(3):104-7.

18. Kutzler MA. Semen collection in the dog. *Theriogenology.* 2005;64(3):747-54.

19. Amann RP. Reproductive Physiology and the Endocrinology of the Dog. In: Morrow DA, ed. *Current Therapy in Theriogenology 2*, Philadelphia: Saunders, 1986.

20. Atalan G, Holt PE, Barr FJ. Ultrasonographic estimation of prostate size in normal dogs and relationship to bodyweight and age. *J Small Anim Pract.* 1999;40(3):119-22.

21. Ruel Y, Barthez PY, Mailles A et al. Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 1998;39(3):212-6.

22. O'Shea JD. Studies on the canine prostate gland: I. Factors influencing its size and weight. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.* 1962;72:321-31.

23. Moxon R, Bright L, Pritchard B et al. Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. *Anim Reprod Sci.* 2015;160:112-9.

24. Behre HM, Nashan D, Nieschlag E. Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the technique and comparison with

orchidometer estimates. *Int J Androl.* 1989;12(6):395-403.

25. Fuse H, Takahara M, Ishii H et al. Measurement of testicular volume by ultrasonography. *Int J Androl.* 1990;13(4):267-72.

26. Wheaton LG, de Klerk DP, Strandberg JD et al. Relationship of seminal volume to size and disease of the prostate in the beagle. *Am J Vet Res.* 1979;40(9):1325-8.

27. Brito MM, Angrimani DSR, Lucio CF et al. A case trial study of the effect of ageing on fresh and post-thaw sperm in dogs. *Andrologia.* 2018:e13123.

28. Pena AI, Barrio M, Becerra JJ et al. Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate: investigation of the significance for sperm functionality in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2007;42(5):471-8.

29. Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991;21(3):467-85.

30. Hollinshead FK, Hanlon DW. Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology.* 2017;101:62-72.

31. Wilson MS. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993;47:307-11.

Table 1

Software settings of AndroVision® (Minitube, Germany)

Parameter	Cut-off value
Temperature of analysis (°C)	37°C
Immotile sperm	
ALH (µm)	< 4
BCF (Hz)	< 4
Local motile sperm	
VCL (µm/s)	< 20
VSL (µm/s)	< 10
Slow motile sperm	
VCL (µm/s)	< 80

ALH, amplitude of lateral head displacement; BCF, beat-cross frequency;
VCL, curvilinear velocity; VSL, straight-line velocity

Table 2

Semen parameters for unfractionated ejaculate of all dogs ≤ 10.0 kg and separated for dogs ≤ 5.0 kg and 5.1 to 10.0 kg bodyweight

Parameter	≤ 10.0 kg (n=41)	G1: ≤ 5.0 kg (n=21)	G2: 5.1 to 10.0 kg (n=20)
	\tilde{x} (Q ₁ / Q ₃)	\tilde{x} (Q ₁ / Q ₃)	\tilde{x} (Q ₁ / Q ₃)
VOL (mL)	1.65 (1.15/2.4)	1.2 (0.9/1.8) ^a	2.2 (1.5/2.9) ^b
CONC (x10 ⁶ /mL)	99.2 (76.0/146.6)	99.2 (69.4/170.0) ^a	103.0 (78.0/142.3) ^a
TSO (x10 ⁶)	155.0 (110.5/215.1)	110.7 (84.9/156.1) ^a	215.1 (156.3/258.8) ^b
DEAD (%)	12.1 (7.3/14.9)	14.2 (9.8/14.6) ^a	11.7 (8.8/14.2.0) ^a
TMA (%)	18.3 (15.8/25.6)	18.2 (14.1/29.1) ^a	18.4 (16.4/24.2) ^a
MOT (%)	93.1 (90.7/95.5)	93.1 (89.8/96.0) ^a	93.0 (91.0/95.6) ^a
PROG (%)	90.7 (87.3/94.0)	90.7 (86.7/94.1) ^a	90.8 (87.8/94.2) ^a
FAST (%)	76.6 (71.5/83.0)	76.5 (68.7/82.3) ^a	77.4 (72.2/84.0) ^a
SLOW (%)	13.1 (10.4/17.1)	13.3 (10.8/18.6) ^a	13.0 (9.7/14.8) ^a
LOC (%)	2.2 (1.6/3.3)	2.0 (1.6/3.1) ^a	2.4 (1.3/3.4) ^a
IMMOTILE (%)	6.9 (4.6/9.0)	6.9 (4.7/9.8) ^a	6.9 (4.4/8.9) ^a

Values are given as median (\tilde{x}) and their first and third quartile (Q₁/Q₃). Values with different superscripts within the same row are statistically different. VOL, ejaculate volume; CONC, sperm concentration; TSO, total sperm output; DEAD, dead sperm; TMA, total morphological abnormalities; MOT, total motility; PROG, progressive motility; FAST, fast motility; SLOW, slow motility; LOC, local motility; IMMOTILE, immotile sperm

Table 3Ultrasonographic testicular measurements in dogs ≤ 5.0 kg and 5.1 to 10.0 kg bodyweight

	G1: ≤ 5.0 kg (n=21)	G2: 5.1 - 10.0 kg (n=20)
	\tilde{x} (Q ₁ / Q ₃)	\tilde{x} (Q ₁ / Q ₃)
Right testis		
L (cm)	2.0 ^a (1.8/2.3)	2.6 ^b (2.3/2.7)
H (cm)	1.3 ^a (1.2/1.4)	1.5 ^b (1.4/1.6)
W (cm)	1.4 ^a (1.3/1.6)	1.8 ^b (1.6/2.0)
T _{VOL} (mL)	2.7 ^a (2.0/3.0)	5.0 ^b (3.7/6.0)
Left testis		
L (cm)	2.0 ^a (1.9/2.4)	2.4 ^b (2.3/2.8)
H (cm)	1.3 ^a (1.1/1.4)	1.5 ^b (1.4/1.7)
W (cm)	1.5 ^a (1.4/1.6)	1.9 ^b (1.7/2.2)
T _{VOL} (mL)	2.8 ^a (2.2/3.9)	5.5 ^b (4.3/6.0)

Values are given as medians (\tilde{x}) and their first and third quartile (Q₁/Q₃). Values with different superscripts within the same row are statistically different. L, length; H, height; W, width; T_{VOL}, testicular volume

Table 4

Reference values for unfractionated ejaculate and testicular dimensions in dogs ≤ 5.0 kg and 5.1 to 10.0 kg bodyweight

	≤ 5.0 kg (n=21)	5.1 - 10.0 kg (n=20)
Parameter	Lower limit (P₅)	
VOL (mL)	0.5	0.8
TSO (10 ⁶)	35.3	113.0
CONC (10 ⁶ /mL)	37.8	
MOT (%)	83.2	
PROG (%)	79.0	
FAST (%)	56.4	
	Upper limit (P₉₅)	
DEAD (%)	22.0	
SLOW (%)	26.8	
LOC (%)	4.8	
IMMOTILE (%)	16.9	
TMA (%)	52.5 (39.3)	
	Reference interval (P_{2.5} – P_{97.5})	
Testicular L (cm)	1.6 – 2.5	1.8 – 3.2
Testicular H (cm)	1.1 – 1.5	1.2 – 2.0
Testicular W (cm)	1.3 – 1.9	1.3 – 2.4
T _{VOL} (mL)	1.5 – 4.3	2.2 – 10.0

VOL, ejaculate volume; CONC, sperm concentration; TSO, total sperm output; DEAD, dead sperm; MOT, total motility; PROG, progressive motility; FAST, fast motility; SLOW, slow motility; LOC, local motility; IMMOTILE, immotile sperm; TMA, total morphological abnormalities, value in parentheses for TMA without outliers (n=39); L, length; H, height; W, width; T_{VOL}, testicular volume

Table 5

Spearman correlations and P - values between the sperm characteristics, T_{VOL} and the body-weight and the age of the dogs (n=41)

Parameter	Bodyweight		Age	
	Correlation	P - value	Correlation	P - value
VOL (mL)	0.502	0.001	0.455	0.003
CONC (10 ⁶ /mL)	0.119	0.459	-0.266	0.155
TSO (10 ⁶)	0.644	< 0.001	0.255	0.107
DEAD (%)	-0.25	0.157	0.078	0.627
MOT (%)	0.091	0.571	-0.026	0.874
PROG (%)	0.045	0.788	-0.026	0.872
FAST (%)	0.130	0.417	-0.174	0.267
SLOW (%)	-0.042	0.793	0.184	0.250
LOC (%)	0.046	0.774	-0.036	0.824
IMMOTILE (%)	-0.090	0.577	0.023	0.888
TMA (%)	0.058	0.771	0.134	0.402
T _{VOL} left (mL)	0.733	<0.001	0.341	0.029
T _{VOL} right (mL)	0.776	<0.001	0.231	0.146

Values in bold are statistically significant (p<0.05). VOL, ejaculate volume; CONC, sperm concentration; TSO, total sperm output; DEAD, dead sperm; MOT, total motility; PROG, progressive motility; FAST, fast motility; SLOW, slow motility; LOC, local motility; IMMOTILE, immotile sperm; TMA, total morphological abnormalities; T_{VOL}, testicular volume

IV. DISKUSSION

Die Spermauntersuchung ist ein elementarer Bestandteil jedes andrologischen Untersuchungsganges. Sie dient dazu, Aussagen über das Fertilitätspotential eines Rüden im Rahmen einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung zu treffen sowie Ursachen einer Sub- bzw. Infertilität zu klären. Zusätzlich wird die spermatologische Untersuchung benötigt, um die Eignung einer Ejakulatprobe für eine künstliche Übertragung oder eine Kryokonservierung zu prüfen und Besamungsdosen zu errechnen (Martinez 2004, Root Kustritz 2007).

Für die Untersuchung und Beurteilung eines Ejakulates werden Referenzwerte als Bezugsparameter benötigt. In der Literatur sind verschiedene Referenz- bzw. Richtwerte für Rüdenejakulate beschrieben. Da in mehreren Studien ein direkter Zusammenhang zwischen Ejakulatparametern und dem Körpergewicht von Rüden nachgewiesen werden konnte, erscheint die Einteilung der Parameter nach dem Körpergewicht sinnvoll, insbesondere da durch die große Vielfalt an verschiedenen Rassen extreme Gewichtsunterschiede zwischen den Hunden vorzufinden sind. Günzel-Apel et al. unterteilten in ihrer Studie von 1994 in fünf unterschiedliche Gewichtsklassen von < 10 kg, 11 bis 20 kg, 21 bis 40 kg, 41 bis 60 kg und > 60 kg Körpergewicht. In neueren Studien von Goericke-Pesch und Failing (2013), Tesi et al. (2018) sowie Rijsselaere et al. (2007) wird ebenfalls nach dem Körpergewicht der Rüden unterschieden. Die Gewichtsklassen der Rüden mit dem niedrigsten Körpergewicht enden hierbei bei < 20 kg, < 15 kg und < 10 kg. Im Rahmen einer andrologischen Untersuchung werden neben der Ejakulatqualität auch die Hoden eines Rüden untersucht und beurteilt. Für die Beurteilung der Hodengröße werden ebenfalls Referenzwerte benötigt, um pathologische Größenabweichungen ermitteln zu können. Hierzu liefert die Literatur für Rüden unter 10 kg Körpergewicht nur wenig Information (Günzel-Apel et al. 1994).

Aus der vorliegenden Literatur wird ersichtlich, dass ein direkter Zusammenhang von Körpergewicht mit einzelnen Spermaparametern sowie der Hodengröße besteht. Dennoch wird deutlich, dass die Einteilung anhand der Körpergröße des Rüden uneinheitlich durchgeführt wurde und die Einteilung für kleine, mittelgroße und große Hunde unterschiedlichen Definitionen unterliegt. Dies erschwert die praktische Anwendung genannter Richt- bzw. Referenzwerttabellen für den Tierarzt.

Subjektiv scheint das Vorkommen kleiner Hunde, respektive leichtgewichtiger Rassen in den letzten Jahren gestiegen zu sein. In einer Studie von Teng et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass die Popularität kleiner Hunderassen in Australien über die Zeit deutlich zugenommen hat. Vergleichbare Studien sind für die deutsche Hundepopulation in der zugänglichen Literatur bis dato nicht zu finden. Rüden kleiner Rassen werden ebenfalls für andrologische Untersuchungen in der Tierklinik oder beim Haustierarzt vorgestellt. In der zugänglichen Literatur scheinen die Angaben für Spermaparameter und Hodendimensionen für kleine Hunderassen unterrepräsentiert. Eine weitere Unterteilung der Gewichtsgruppe von Rüden unter 10 kg Körpergewicht ist bisher nicht erfolgt. Entsprechend der Datenlage war das Ziel der vorliegenden Arbeit herauszufinden ob eine Unterteilung von Rüden < 10 kg Körpergewicht für die Beurteilung von Ejakulatqualität sowie Hodendimensionen ausreichend ist, oder ob eine weitere Unterteilung der Referenzwerte für Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht erforderlich ist. Hierzu wurden Ejakulatparameter sowie Hodendimensionen von Rüden $\leq 5,0$ kg und Rüden zwischen 5,1 und 10,0 kg Körpergewicht miteinander verglichen.

Die Voraussetzung für die Teilnahme an der vorliegenden Studie war ein maximales Körpergewicht von 10,0 kg. Die teilnehmenden Rüden hatten innerhalb der letzten 12 Monate vor Untersuchungsbeginn mindestens einmal erfolgreich gedeckt und mindestens einen Wurf hervorgebracht. Über dieses Einschlusskriterium wurde der Begriff „fertil“ definiert. Alle Rüden litten zum Zeitpunkt der Untersuchungen vorberichtlich nicht an einer systemischen Erkrankung, waren klinisch gesund und standen nicht unter dem Einfluss von Medikamenten. Die Studie von Günzel-Apel et al. (1994) gibt zwar an, dass die in die Statistik erfassten Rüden vorberichtlich fertil waren, dies wird jedoch nicht genauer definiert. Aufgrund der zum Teil stark schwankenden Parameter innerhalb einer Gewichtsgruppe gehen die Autorinnen davon aus, dass sich unter den Rüden auch sub- und infertile Rüden befanden. Ähnlich verhielt es sich in der Studie von Goericke-Pesch et al. (2013). Fertilität war in dieser Studie kein Einschlusskriterium, weshalb davon ausgegangen wird, dass sich unter den untersuchten Rüden ebenfalls sub- und infertile Rüden befanden. Im Gegensatz zu den genannten Studien sollte durch die genau definierten Einschlusskriterien in der vorliegenden Studie das Vorliegen physiologischer Ejakulatparameter sowie Hodendimensionen gewährleistet und eine Verfälschung der ermittelten Werte durch sub- und infertile Rüden verhindert werden.

Die Ergebnisse der Spermauntersuchung der vorliegenden Studie wurden zunächst mit Werten für Rüden unter 10 kg Körpergewicht aus der Literatur verglichen (Günzel-Apel et al. 1994, Goericke-Pesch und Failing 2013). Da es in der vorliegenden Arbeit aufgrund der zum Teil sehr geringen Ejakulatvolumina (geringstes Ejakulatvolumen bei 0,3 ml) nicht möglich war die drei Ejakulatfraktionen zu differenzieren, wie es normalerweise im Rahmen einer Spermauntersuchung durchgeführt wird konnte nur die Gesamtspermienzahl, nicht jedoch die Spermienkonzentration verglichen werden. Für die Gesamtspermienzahl von Rüden < 10 kg Körpergewicht ermittelten Günzel-Apel et al. (1994) einen Medianwert von 464×10^6 und Goericke-Pesch und Failing (2013) einen Wert von 344×10^6 . Die Gesamtspermienzahl für Rüden $\leq 10,0$ kg Körpergewicht der vorliegenden Studie war mit einem Medianwert von 155×10^6 deutlich niedriger als in den Studien von Günzel-Apel et al. (1994) und Goericke-Pesch und Failing (2013). Der Unterschied resultiert möglicherweise daraus, dass in den Vergleichsstudien Angaben zu Rassen und Gewichtsverteilung innerhalb der Gruppe < 10 kg Körpergewicht fehlen. Das durchschnittliche Körpergewicht der vorliegenden Studie war vermutlich niedriger als das der Vergleichsstudien, da 21 Hunde ein Körpergewicht $\leq 5,0$ kg aufwiesen. Die Ergebnisse für Morphologie und Motilität zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Studien. Diese Parameter verhalten sich unabhängig vom Körpergewicht (Günzel-Apel et al. 1994, Rijsselaere et al. 2007, Goericke-Pesch und Failing 2013, Tesi et al. 2018). Dies konnte auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die Korrelationsanalyse ergab keinen Zusammenhang zwischen Körpergewicht und Motilitätsparameter sowie dem Anteil morphologisch veränderter Spermien. Aufgrund verschiedener Untersuchungsmethoden ist der Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen Studien die Parameter für Rüden unter 10 kg Körpergewicht angeben nur eingeschränkt aussagekräftig.

Die Untersuchungsergebnisse der Ejakulat- sowie Hodenuntersuchung der vorliegenden Studien wurden in zwei Gewichtsgruppen von Rüden $\leq 5,0$ kg und von 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht unterteilt und miteinander verglichen. Es konnten signifikante Unterschiede für das Ejakulatvolumen und die Gesamtspermienzahl ermittelt werden. Das Ejakulatvolumen wird hauptsächlich von der dritten Fraktion, dem Prostatasekret, bestimmt. Die Menge dieser Fraktion wurde in der vorliegenden Studie nicht vollständig bestimmt, da die Sammlung dieser Fraktion nach dem Einschachten des Penis beendet wurde. Die Abgabedauer und -menge dieser Fraktion

unterliegt individuellen Schwankungen (Bartlett 1962, Johnston et al. 2001a). Die Größe der Prostata wird wiederum durch die Körpergröße bzw. das Körpergewicht eines Rüden bestimmt (O'Shea 1962, Ruel et al. 1998, Atalan et al. 1999). Die Prostatagröße wurde in der vorliegenden Studie nicht ermittelt, weshalb keine Aussagen über den Zusammenhang von Prostatagröße und Ejakulatvolumen getroffen werden können. Ein Unterschied des Ejakulatvolumens zwischen den beiden Gewichtsgruppen war entsprechend der Literatur dennoch zu erwarten. Auch die Gesamtspermienzahl in der vorliegenden Studie unterschied sich zwischen den beiden Gewichtsgruppen signifikant. Die Gesamtspermienzahl ist ebenfalls abhängig von der Körpergröße bzw. von der Hodengröße eines Rüden (Amann 1986). Die Korrelationsanalyse der ermittelten Spermaparameter der vorliegenden Studie mit dem Körpergewicht stimmt mit den Erkenntnissen von Amann (1986) überein. Es konnten positive Korrelationen für Körpergewicht, Ejakulatvolumen, Gesamtspermienzahl und Hodenvolumen ermittelt werden. Die Abhängigkeit von Ejakulatvolumen und Gesamtspermienzahl vom Körpergewicht des Rüden in der vorliegenden Studie, stimmen mit den Ergebnissen von Günzel-Apel et al. (1994), Tesi et al. (2018), Rijsselaere et al. (2007), Goericke-Pesch und Failing (2013) überein. Erstmals werden durch die vorliegende Studie Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht berücksichtigt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erweiterung der Ejakulatparameter um eine Gewichtsgruppe für Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht erforderlich ist.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es Werte für Hodendimensionen von Rüden $\leq 10,0$ kg Körpergewicht zu ermitteln und die Werte Rüden $\leq 5,0$ kg und von 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht miteinander zu vergleichen. Hierzu wurde eine sonografische Untersuchung der Hoden durchgeführt. Der Ultraschall dient gleichzeitig der strukturellen Beurteilung des Hodengewebes (Pugh et al. 1990). In einer Studie von Moxon et al. konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Echogenität der Hoden im Ultraschall der Anteil morphologisch veränderter Spermien im Ejakulat stieg (Moxon et al. 2015). Die Rüden, die in der vorliegenden Studie inkludiert wurden, wiesen eine normale palpatorische und sonografische Hodentextur auf. Dementsprechend kann eine Beeinflussung der Ejakulatparameter durch testikuläre Veränderungen weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Messergebnisse von Höhe, Länge und Breite der Hoden wurde zur Berechnung der Hodenvolumina (H_{VOL}) mithilfe der Formel $H_{VOL} = L * H * B * 0,71$ verwendet (Paltiel et al. 2002, Sakamoto et al. 2007). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die

sonografische Ermittlung von Hodendimensionen präzisere Ergebnisse liefert als die Verwendung von klassischen Messmethoden, wie der Verwendung einer Schieblehre oder der Orchidometrie (Behre et al. 1989, Fuse et al. 1990, Paltiel et al. 2002, Sakamoto et al. 2007). In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der Angaben in der Literatur nur mittels Ultraschallverfahren eine Vermessung durchgeführt und kein Vergleich verschiedener Messmethoden für Hodendimensionen durchgeführt. Die Ergebnisse der Hodenmaße in der vorliegenden Studie zeigten deutliche Unterschiede zwischen beiden Gewichtsgruppen. Dies erklärt den Unterschied in der Gesamtpermienzahl, da diese mit dem Hodenvolumen korreliert. Die Korrelation von Hodengröße und Gesamtpermienzahl wurde bereits durch Günzel-Apel et al. (1994) aufgezeigt, sie unterteilten die Hodenmaße Länge und Breite für fünf unterschiedliche Gewichtsgruppen. Erstmals werden mit der vorliegenden Studie Angaben für Hodenmaße von Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht gegeben, neben der Länge und Breite wurde zusätzlich die Höhe und das Hodenvolumen bestimmt. In der zugänglichen Literatur sind keine Studien zu finden, die Hodenvolumina für unterschiedliche Gewichtsgruppen von Rüden angeben.

Aus den Untersuchungsergebnissen wurde ein Referenzbereich für das Ejakulatvolumen sowie Gesamtpermienzahl und Hodendimensionen für Rüden $\leq 10,0$ kg Körpergewicht erstellt. Aufgrund der signifikanten Unterschiede der Gesamtpermienzahl, des Ejakulatvolumens sowie der Hodenmaße zwischen Rüden $\leq 5,0$ kg und 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht erschien eine weitere Unterteilung der Referenzwerte um eine Gewichtsgruppe von Rüden $\leq 5,0$ kg sinnvoll, ebenso wie es in der Studie von Günzel-Apel et al. (1994) (z.B. ≤ 10 kg 11 - 20 kg, 20 - 40 kg Körpergewicht etc.) bereits erfolgte. Ergebnisse für Ejakulatvolumen, Gesamtpermienzahl und Hodendimensionen der vorliegenden Studie werden entsprechend getrennt für Rüden $\leq 5,0$ kg und 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht dargestellt. Parameter, die sich nicht signifikant unterschieden wurden für beide Gruppen gemeinsam dargestellt. Ein zweiseitiger Referenzbereich erschien für die meisten Parameter nicht sinnvoll, da höhere Werte für Ejakulatvolumen, Gesamtpermienzahl, Spermienkonzentration, Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität sowie Anteil schnell motiler Spermien sich nicht nachträglich auf die Spermienqualität bzw. Befruchtungsfähigkeit auswirken (WHO 2010). Daher wurde für diese Parameter eine untere Referenzgrenze festgelegt. Für die Parameter Anteil morphologisch veränderter Sper-

mien, Anteil toter Spermien, langsam und lokal-motiler sowie unbeweglicher Spermien wurde eine obere Referenzgrenze festgelegt, da höhere Werte für diese Parameter nachteilige Effekte auf die Spermienqualität respektive Befruchtungsfähigkeit haben können. Die Obergrenze für morphologisch veränderte Spermien erschien mit 52,5 % sehr hoch, normalerweise sollte sie einen Wert von 40% nicht überschreiten (Oettle 1993). Mithilfe des Tests für Ausreißer nach Tukey konnten zwei Hunde als Ausreißer für morphologisch veränderte Spermien ermittelt werden. Der obere Grenzwert für morphologisch veränderte Spermien lag nach Ausschluss der beiden Rüden bei 39,3 % ($n = 39$), dieser Wert erschien realistischer, da der Medianwert für morphologisch veränderte Spermien in beiden Gewichtgruppen unter 20 % lag. Die beiden ausgeschlossenen Hunde waren die ältesten Studienteilnehmer (11,6 Jahre; 6,7 Jahre). Ein erhöhter Anteil morphologisch veränderter Spermien mit zunehmendem Alter wurde bereits durch Rijsselaere et al. (2007) und Tesi et al. (2018) beobachtet. Für die Hodenmaße sowie das Hodenvolumen wurde ein klassisches zweiseitiges Referenzintervall ermittelt, da sowohl eine Verkleinerung als auch eine Vergrößerung der Hoden Hinweise auf ein pathologisches Geschehen geben können (Johnston et al. 2001b).

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals Werte für Ejakulatparameter und Hodendimensionen von Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht. Diese können fortan von Tierärzten verwendet werden, um eine Spermaprobe sowie die Hodengröße von Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht adäquat beurteilen zu können.

Für eine künstliche Samenübertragung wird die zweimalige Applikation von 150 bis 200×10^6 vorwärtsbeweglichen Spermien empfohlen (Linde-Forsberg 1991, Hollinshead und Hanlon 2017). Die Gesamtspermienzahl der Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht in der vorliegenden Studie lag mit einem Medianwert von $110,7 \times 10^6$ deutlich unter diesem Empfehlungswert. Aufgrund der niedrigeren Gesamtspermienzahl kleiner Rüden sowie dem Verlust bzw. Absterben von Spermien während eines Konservierungsprozesses sind dementsprechend für kleine Rüden zum Teil mehrere Spermagewinnungen erforderlich, um die empfohlene Besamungsdosis zu erreichen. Dies ist für die Besitzer mit einem höheren zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden und bedeutet für die Rüden vermehrten Stress. Wilson besamte in ihrer Studie sieben Hündinnen mit einer Besamungsdosis von 30 bis 35×10^6 Spermien und konnte trotz der geringen Dosis eine Trächtigkeitsrate von 85 % erzielen (Wilson 1993). Entsprechend der Ergebnisse von Wilson (1993) ist davon

auszugehen, dass auch geringere Besamungsdosen für kleine Hunderassen ausreichen könnten, um eine Trächtigkeit herbeizuführen. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass Studien höhere Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen für Besamungsdosen $> 150 \times 10^6$ aufgetaute Spermien zeigen, dies sollte mit den Besitzern besprochen werden (Hollinshead und Hanlon 2017, Mason 2017). Folgestudien sind erforderlich, um zu überprüfen, ob geringere, respektive dem Körpergewicht angepasste Besamungsdosen im Rahmen einer künstlichen Spermaübertragung ausreichen, um eine Trächtigkeit mit zufriedenstellenden Wurfgrößen herbeizuführen.

Aus humanmedizinischen und tiermedizinischen Studien ist bekannt, dass das Alter Einfluss auf Spermaparameter und dementsprechend auf die Befruchtungsfähigkeit eines Individuums nehmen kann. Auch für Rüden gibt es Hinweise darauf, dass sich das Alter negativ auf die Spermaqualität auswirkt. Da in den Studien von Tesi et al. (2018), Rijsselaere et al. (2007) und Brito et al. (2018) Zusammenhänge zwischen dem Alter und Veränderungen der Spermaparameter festgestellt werden konnten, sollten auch in der vorliegenden Studie potentielle Zusammenhänge untersucht werden. Hierzu wurde eine Korrelationsanalyse für das Alter und die ermittelten Spermaparameter durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Studien, die einen erhöhten Anteil morphologisch veränderter Spermien mit zunehmendem Alter feststellen konnten, konnte in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang zwischen morphologisch veränderten Spermien und dem Alter ermittelt werden (Rijsselaere et al. 2007, Tesi et al. 2018). Da das durchschnittliche Alter der Rüden der vorliegenden Studie unter 4 Jahren lag, sind die Ergebnisse bezogen auf das Alter nicht repräsentativ. Einzig die beiden ältesten Rüden der Studie (11,6 und 6,7 Jahre) zeigten mit 57 % und 53,8 % einen erhöhten Anteil morphologisch veränderter Spermien, davon waren je 33 % und 43,3 % Spermien mit einem proximalem Zytoplasmotropfen. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von Tesi et al. (2018), Goerick-Pesch und Failing (2013) sowie Brito et al. (2018) überein, welche in ihren Studien einen erhöhten Anteil proximaler Zytoplasmotropfen bei älteren Rüden feststellen konnten. Proximale Zytoplasmotropfen stehen im Verdacht, die Befruchtungsfähigkeit der Spermien einzuschränken (Pena et al. 2007). Die Korrelationsanalyse für Spermaparameter und Alter ergab eine positive Korrelation für Alter und Ejakulatvolumen. Das Ejakulatvolumen wird hauptsächlich über den Anteil der dritten Fraktion bestimmt. Da die Fraktionen in der vorliegenden Studie aufgrund geringer Ejakulatvolumina nicht differenziert werden konnte, kann hierüber keine

Aussage getroffen werden. Die Größe der Prostata ist abhängig vom Körpergewicht sowie vom Alter eines Rüden. Die benigne Prostatahyperplasie ist ein bekanntes Problem alternder Rüden. Dementsprechend resultiert die Korrelation von Alter und Ejakulatvolumen in der vorliegenden Studie vermutlich aus der gutartigen Größenzunahme der Prostata mit zunehmendem Alter (Wheaton et al. 1979, Ruel et al. 1998, Atalan et al. 1999).

Grundsätzlich bestätigt die vorliegende Arbeit die Ergebnisse vorheriger Studien, die Spermaparameter und Hodendimensionen in Bezug auf das Körpergewicht betrachten. Erstmals werden mit dieser Studie Referenzwerte für Ejakulatparameter und Hodendimensionen für Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht präsentiert. Aufgrund der niedrigeren Gesamtspermienzahl kleiner bzw. leichtgewichtiger Rüden ist zu überlegen, ob Besamungsdosen in Zukunft ebenfalls dem Körpergewicht eines Hundes angepasst werden können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die spermatologische Untersuchung ist ein elementarer Bestandteil jeder andrologischen Untersuchung. Die Indikationen für eine Spermauntersuchung eines Rüden sind vielfältig. Neben der Überprüfung der Zuchttauglichkeit des Rüden dient sie der Diagnosestellung für sub- und infertile Rüden, sowie der Überprüfung der Tauglichkeit einer Ejakulatprobe für eine künstliche Übertragung oder einen Konservierungsprozess. Zur Untersuchung einer Ejakulatprobe werden Referenzwerte als Bezugsparameter benötigt.

Das Spektrum an Referenzwerten für Rüdenejakulate ist groß, hierbei wird nach verschiedenen Kriterien kategorisiert. Da in mehreren Studien ein direkter Zusammenhang von Ejakulatparametern und dem Körpergewicht von Rüden hergestellt werden konnte, erscheint die Einteilung der Parameter nach Körpergröße bzw. Körpergewicht sinnvoll. Gängige Referenztabelle enden hierbei bei einem Körpergewicht von 10 kg. Eine weitere Unterteilung dieser Gewichtsgruppe gibt es bisher nicht. Entsprechend dem Mangel an Daten für Rüden von weniger als 10 kg Körpergewicht war das Ziel dieser Studie diese Gewichtsgruppe genauer zu untersuchen. Ein Vergleich von Rüden $\leq 5,0$ kg mit Rüden von 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht sollte zeigen, ob die Erweiterung der bisherigen Referenzwerte um eine Gewichtsgruppe für Rüden $\leq 5,0$ kg sich als sinnvoll erweisen würde. Da die Datenlage für Hodendimensionen kleiner Rüden < 10 kg Körpergewicht ebenfalls wenige Informationen bereitstellt, wurden die Untersuchungen um eine sonografische Vermessung der Hoden erweitert.

Im Rahmen dieser Studie wurden 41 fertile Rüden mit einem Körpergewicht $\leq 10,0$ kg klinisch und andrologisch untersucht und je zwei Ejakulate, im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche, auf qualitative und quantitative Parameter untersucht. Die Rüden wurden anschließend in zwei Gewichtsgruppen von $\leq 5,0$ kg und 5,1 bis 10,0 kg Körpergewicht unterteilt und die Untersuchungsparameter miteinander verglichen.

Das mediane Ejakulatvolumen für Rüden von 5,1 kg – 10,0 kg Körpergewicht betrug 2,2 ml, mit einer medianen Gesamtspermienzahl von $215,1 \times 10^6$. Das mediane Ejakulatvolumen von Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht betrug 1,2 ml mit einer medianen Gesamtspermienzahl von $110,7 \times 10^6$. Damit zeigten Rüden von 5,1 kg –

10,0 kg Körpergewicht nahezu doppelt so hohe Werte für das Ejakulatvolumen und die Gesamtspermienzahl. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gewichtgruppen ergaben sich ebenso für Länge, Höhe, Breite der Hoden sowie das Hodenvolumen. Die Korrelationsanalyse ergab eine positive Korrelation von Körpergewicht und Hodengröße sowie dem Hodenvolumen und der Gesamtspermienzahl. Die Spermienkonzentration, die Motilitätsparameter, der Anteil toter Spermien sowie die Spermienmorphologie verhielten sich gewichtsunabhängig. Die statistische Analyse zeigte signifikante Unterschiede für das Ejakulatvolumen, die Gesamtspermienzahl und die Hodendimensionen zwischen den beiden Gewichtgruppen. Die Spermienkonzentration, die Motilitätsparameter, der Anteil toter Spermien sowie die Spermienmorphologie verhielten sich gewichtsunabhängig.

Auf Basis dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Erweiterung bisheriger Referenzwerte für Ejakulatparameter und Hodendimensionen von Rüden um eine weitere Gewichtgruppe für Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht notwendig ist. Die in der vorliegenden Studie ermittelten Werte können fortan als Bezugsparameter von Tierärzten im Rahmen einer andrologischen Untersuchung von Rüden $\leq 5,0$ kg Körpergewicht angewendet werden.

Ein signifikanter Zusammenhang von Alter und spermatologischen Parameter konnte im Rahmen dieser Studie nicht festgestellt werden.

VI. SUMMARY

Semen analysis is an important part of andrological and breeding soundness examinations in dogs and allows for the evaluation of sub- and infertility and sperm suitability for artificial insemination or cryopreservation purposes. Reference values are required to verify whether the ejaculate sample of a dog shows physiological parameters.

A variety of reference values for semen parameters exists for dogs. Parameters are categorized according to various criteria. Since several studies showed a direct correlation between ejaculate parameters and the bodyweight of dogs, the classification of the parameters according to body size or bodyweight appears logical. Common reference values often end with a bodyweight of < 10 kg. A further subdivision of this weight group has not been performed yet. The aim of this study was to analyze semen of dogs with a bodyweight $\leq 10,0$ kg to determine potential differences in standard quantitative and qualitative parameters within this group. The comparison between dogs $\leq 5,0$ kg bodyweight and dogs with a bodyweight between 5,1 to 10,0 kg should reveal whether the addition of a further weight group is justifiable. Since the data available for testicular dimensions of dogs under 10 kg also provide little information, we extended our investigations by sonographic measurements of the testes.

Forty-one fertile stud dogs below 10,0 kg bodyweight underwent a general and andrological examination. Two ejaculates each were collected and analyzed for qualitative and quantitative parameters. Dogs were then divided into two weight groups of $\leq 5,0$ kg and 5,1 to 10,0 kg bodyweight and parameters were compared.

The median ejaculate volume for dogs of 5.1 kg - 10.0 kg bodyweight was 2.2 ml, with a median total sperm count of 215.1×10^6 . The median ejaculate volume for dogs ≤ 5.0 kg bodyweight was 1.2 ml, with a median total sperm count of 110.7×10^6 . Thus, dogs of 5.1 kg - 10.0 kg bodyweight showed almost twice as much ejaculate volume and total sperm count. Significant differences between the two weight groups were also found for length, height, width of the testes as well as with testicular volume. The correlation analysis showed a positive correlation between bodyweight and testicular size and testicular volume with total sperm count. The sperm concentration, the motility parameters, the amount of dead sperm as well as the

sperm morphology were weight independent.

Based on these results it could be demonstrated that the extension of previous reference values for ejaculate parameters and testicular dimensions of dogs by another weightgroup for dogs ≤ 5.0 kg bodyweight is necessary. The values determined in the present study can from now on be used as reference parameters by veterinarians in the context of an andrological examination of dogs ≤ 5.0 kg bodyweight.

A significant relationship between age and semen parameters could not be found in this study.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbiramy VS, Shanthi V.

Spermatozoa Segmentation and Morphological Parameter Analysis Based Detection of Teratozoospermia. International Journal of Computer Applications. 2010; 3 (7): 19-23

Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR.

New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. J Androl. 2003; 24(3): 343-352

Amann, RP.

Reproductive Physiology and the Endocrinology of the Dog: Current Therapy in Theriogenology 2, Morrow DA, ed.: Current therapy in Theriogenology. 2. Aufl., W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, 1986, 532-538

Amann RP, Hammerstedt RH.

In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. J Androl. 1993; 14(6): 397-406

Amann RP, Katz DF.

Reflections on CASA after 25 years. J Androl. 2004; 25(3): 317-325

Amann RP, Waberski D.

Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology. 2014; 81(1): 5-17 e11-13

Anatol TI, Williams G, Adogwa A.

A comparative study of different methods of orchidometry in a canine model. Int Urol Nephrol. 2006; 38(3-4): 647-652

Appell RA, Evans PR, Blandy JP

The effect of temperature on the motility and viability of sperm. Br J Urol. 1977; 49(7): 751-756

Atalan G, Holt PE, Barr FJ.

Ultrasonographic estimation of prostate size in normal dogs and relationship to bodyweight and age. J Small Anim Pract. 1999; 40(3): 119-122

Aurich C, Aurich J, Günzel-Apel AR, Waberski D.

Andrologische Untersuchung. In: Klinische Propädeutik der Haus- und Heimtiere
Bd. 9, Stuttgart, Enke, 2017: 296-313

Baker HW, Clarke GN.

Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different
observers. Clin Reprod Fertil. 1987; 5(1-2): 37-43

Bartlett DJ.

Studies on dog semen. Journal of Reproduction and Fertility. 1962; 3(2): 190-205

Behre HM, Nashan D, Nieschlag E.

Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the
technique and comparison with orchidometer estimates. Int J Androl. 1989; 12(6):
395-403

Bhanmeechao C, Srisuwatanasagul S, Prapaiwan N, Ponglowhapan S.

Reproductive aging in male dogs: The epididymal sperm defects and expression
of androgen receptor in reproductive tissues. Theriogenology. 2018; 108: 74-80

Boucher JH, Foote RH, Kirk RW.

The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of
ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. Cornell
Vet. 1958; 48(1): 67-86

Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day BC, Wilson ME.

Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and
frozen stallion semen. Theriogenology. 2005; 63(5): 1519-1527

Brito LFC, Althouse GC, Aurich C, Chenoweth PJ, Eilts BE, Love CC,

Luvoni GC, Mitchell JR, Peter AT, Pugh DG, Waberski D.

Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration.
Theriogenology. 2016; 85(9): 1507-1527

Brito MM, Angrimani DSR, Lucio CF, Vannucchi CI.

A case trial study of the effect of ageing on fresh and post-thaw sperm in dogs.
Andrologia. 2018: e13123

Caminos-Torres R, Ma L, Snyder PJ.

Gynecomastia and semen abnormalities induced by spironolactone in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 45(2): 255-260

Chan SY, Wang C, Chan ST, Ho PC, So WW, Chan YF, Ma HK.

Predictive value of sperm morphology and movement characteristics in the outcome of in vitro fertilization of human oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1989; 6(3): 142-148

ChemoMetec.

The NucleoCounter® NC-100TM – For total counting of mammalian cells and viability 2014 A/S C. Allerod (Denmark): ChemoMetec www.chemometec.com; No. 990 0002

Chenoweth PJ, McPherson FJ.

Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Anim Reprod Sci.* 2016; 169: 32-36

Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL.

A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. *J Androl.* 2004; 25(2): 255-264

Christiansen IJ.

Andrology of the Normal Male. In *Reproduction in the dog and cat.* London United Kingdom, Bailliere Tindall, 1984: 80-109

Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ.

Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia.* 1999; 31(3): 163-168

Comercio EA, Monachesi NE, Loza ME, Gambarotta M, Wanke MM.

Hypo-osmotic test in cat spermatozoa. *Andrologia.* 2013; 45(5): 310-314

Correa JR, Zavos PM

The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology.* 1994; 42(2): 351-360

Coulter GH, Bailey DR.

Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*. 1988; 30(4): 743-749

Dahlbom M, Andersson M, Vierula M, Alanko M.

Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology*. 1997; 48(4): 687-698

Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otdorff C.

Sperm membrane integrity in fresh and frozen-thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with the NucleoCounter SP-100. *Theriogenology*. 2016; 86(2): 651-656

Davis RO, Katz DF.

Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*. 1992; 13(1): 81-86

Davis RO, Rothmann SA, Overstreet JW.

Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies. *Fertil Steril*. 1992; 57(3): 648-653

Dott HM, Foster GC

A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *Reprod Fertil*. 1972; 29(3): 443-445

Dowsett KF, Knott LM.

The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*. 1996; 46(3): 397-412

Dunphy BC, Kay R, Barratt CL, Cooke ID.

Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. *J Androl*. 1989; 10(5): 378-385

Ellington J, Scarlett J, Meyers-Wallen V, Mohammed HO, Surman V.

Computer-assisted sperm analysis of canine spermatozoa motility measurements. *Theriogenology*. 1993; 40(4): 725-733

Engin-Ustun Y, Yilmaz N, Akgun N, Aktulay A, Tuzluoğlu AD, Bakırarar B.

Body Mass Index Effects Kruger's Criteria in Infertile Men. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2018; 11(4): 258-262

England G, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, Silva L, Moxon R.

Canine reproductive ultrasound examination for predicting future sperm quality. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52 Suppl 2: 202-207

England GC.

Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology.* 1999; 52(6): 981-986

England GC, Allen WE.

Seminal characteristics and fertility in dogs. *Vet Rec.* 1989; 125(15): 399

England GCW.

Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practice.* 1991; 32(6): 306-311

Eustache F, Auger J.

Inter-individual variability in the morphological assessment of human sperm: effect of the level of experience and the use of standard methods. *Hum Reprod.* 2003; 18(5): 1018-1022

Farris EJ.

The Number of Motile Spermatozoa as an Index of Fertility in Man: A Study of 406 semen Specimens. *The Journal of Urology.* 1949; 61(6): 1099-1104

Feldman ECN, Nelson RW.

Disorders of the Canine Male Reproductive Tract. In Feldman EC, Nelson R.W.: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction Bd. 2*, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1996: 481-515

Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH.

Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996; 65(5): 1009-1014

Foote RH, Seidel GE, Jr., Hahn J, Berndtson WE, Coulter GH.

Seminal quality, spermatozoal outpost, and testicular changes in growing Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 1977; 60(1): 85-88

Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, Lacaze K, Blanchard TL.

Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology*. 2011; 76(2): 334-341

Freshman JL.

Drugs affecting fertility in the male dog. In Kirk RW: *Current Veterinary Therapy* Bd. X, Philadelphia, W.B. Saunders, 1989

Freshman JL.

Semen collection and evaluation. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2002; 17(3): 104-107

Fuse H, Takahara M, Ishii H, Sumiya H, Shimazaki J.

Measurement of testicular volume by ultrasonography. *Int J Androl*. 1990; 13(4): 267-272

Garner DL, Johnson LA.

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*. 1995; 53(2): 276-284

Geisler A.

Prüfung von Vitalfärbungen für Spermien von Haussäugetieren, Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München, 1990

Gharagozloo P, Aitken RJ.

The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod*. 2011; 26(7): 1628-1640

Gillan L, Evans G, Maxwell WM.

Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005; 63(2): 445-457

Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL.

Computer-assisted human semen analysis. Sampling errors and reproducibility. *J Androl*. 1988; 9(2): 82-90

Goericke-Pesch S, Failing K.

Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac. *Reprod Domest Anim.* 2013; 48(2): 213-217

Graham JK, Moce E.

Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology.* 2005; 64(3): 492-504

Günzel-Apel AR.

Differential diagnosis of oligozoo- and azoospermia in the male dog. *Kleintierpraxis.* 1990; 35: 655-660

Günzel-Apel AR.

Zur Spermagewinnung, -beurteilung und -konservierung sowie Samenübertragung beim Hund. *Tierärztliche Praxis.* 1986; 14: 275-282

Günzel-Apel AR, Terhaer P, Waberski D.

Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte. *Kleintierpraxis* 1994; 7(3): 483-486

Günzel-Apel AR.

Andrologie des Hundes. In Günzel-Apel A.R. Bostedt, H: *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze*, Stuttgart, Germany, Schattauer, 2016: 629-708

Günzel-Apel AR, Gunther C, Terhaer P, Bader H.

Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993; 47: 271-278

Hahn J, Foote RH, Seidel GE, Jr.

Testicular growth and related sperm output in dairy bulls. *J Anim Sci.* 1969; 29(1): 41-47

Hansen C, Vermeiden T, Vermeiden JP, Simmet C, Day BC, Feitsma H.

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.* 2006; 66(9): 2188-2194

Harasymowycz J, Ball L, Seidel GE, Jr.

Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining or fixation. *Am J Vet Res.* 1976; 37(9): 1053-1057

Hendrikse J, Antonisse HW.

Evaluation of dog sperm. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1984; 109(5): 171-174

Hess M.

The effects of prostaglandin F2a, oxytocin and gona- dotropin releasing hormone on ejaculate characteristics in the dog. Masterthesis, Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute, 2002

Hess M.

Documented and anecdotal effects of certain pharmaceutical agents used to enhance semen quality in the dog. *Theriogenology.* 2006; 66(3): 613-617

Hesser A, Darr C, Gonzales K, Power H, Scanlan T, Thompson J, Love C, Christensen B, Meyers S.

Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology.* 2017; 87: 115-123

Heywood R, Sortwell RJ.

Semen evaluation in the Beagle dog. *J Small Anim Pract.* 1971; 12(6): 343-346

Hinting A, Comhaire F, Vermeulen L, Dhont M, Vermeulen A, Vandekerckhove D.

Value of sperm characteristics and the result of in-vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. *Int J Androl.* 1990; 13(1): 59-66

Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I.

Relationships Between Sperm Motility Characteristics Assessed by the Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) and Fertilization Rates In Vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2001; 18(4): 215-220

Hollinshead FK, Hanlon DW.

Factors affecting the reproductive performance of bitches: A prospective cohort study involving 1203 inseminations with fresh and frozen semen. *Theriogenology.* 2017; 101: 62-72

Holt W, Watson P, Curry M, Holt C.

Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril.* 1994; 62(6): 1277-1282

Iguer-ouada M, Verstegen JP.

Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology.* 2001; 55(3): 733-749

James RW, Heywood R, Street AE.

Biochemical observations on beagle dog semen. *Vet Rec.* 1979; 104(21): 480-482

Jequier AM, Ukombe EB.

Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol.* 1983; 55(4): 434-436

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ.

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984; 70(1): 219-228

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJ.

The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch Androl.* 1992; 29(2): 105-116

Johnson CA.

Disorders of the Canine Testicles and Epididymides. In Morrow DA. *Current Therapy in Theriogenology 2*, Morrow DA, ed.: Current therapy in Theriogenology. 2. Aufl., W.B. Saunders Co., Philadelphia, London 1986: 551-552

Johnston GR, Root Kustritz MV, Olson PS. a

Semen Collection, Evaluation and Preservation. In *Canine and feline Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders; 2001:287-305

Johnston GR, Root Kustritz MV, Olson PS. b

Disorders of the Canine Testes and Epididymes. In *Canine and feline Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders; 2001:312-328

Johnston SD.

Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991; 21(3): 545-551

Karger S, Arlt S, Haimerl P, Heuwieser W.

A systematic review of studies performing the hypo-osmotic swelling test to evaluate the quality of canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(1): 1-6

Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH.

Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res.* 2001; 65(2): 111-115

Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ.

Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril.* 2001; 75(2): 237-248

Kolster KA.

Evaluation of Canine Sperm and Management of Semen Disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018; 48(4): 533-545

Kumi-Diaka J.

Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology.* 1993; 39(6): 1279-1289

Kustritz MV, Hess M.

Effect of administration of prostaglandin F₂α or presence of an estrous teaser bitch on characteristics of the canine ejaculate. *Theriogenology.* 2007; 67(2): 255-258

Kutzler MA.

Semen collection in the dog. *Theriogenology.* 2005; 64(3): 747-754

Lechniak D, Kedzierski A, Stanislawski D.

The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2002; 37(6): 379-380

Linde-Forsberg C.

Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991; 21(3): 467-485

Linde-Forsberg C, Strom Holst B, Govette G.

Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology.* 1999; 52(1): 11-23

Love CC, Garcia MC, Riera FR, Kenney RM.

Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J Reprod Fertil Suppl.* 1991; 44: 99-105

Macleod J, Gold RZ.

The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril.* 1951; 2(3): 187-204

Mann T.

The biochemistry of semen. London, Methuen; New York, Wiley, 1954

Marco-Jimenez F, Vicente JS.

Overweight in young males reduce fertility in rabbit model. *PLoS One.* 2017; 12(7): e0180679

Marin-Guzman J, Mahan DC, Pate JL.

Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J Anim Sci.* 2000; 78(6): 1537-1543

Martinez AI.

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83: 209-224

Mason SJ.

A retrospective clinical study of endoscopic-assisted transcervical insemination in the bitch with frozen-thawed dog semen. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52 Suppl 2: 275-280

Memon MA.

Common causes of male dog infertility. *Theriogenology.* 2007; 68(3): 322-328

Millsop JW, Heller MM, Eliason MJ, Murase JE.

Dermatological medication effects on male fertility. *Dermatol Ther.* 2013; 26(4): 337-346

Moce E, Graham JK.

In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 2008; 105(1-2): 104-118

Morton DB, Bruce SG.

Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989; 39: 311-316

Moxon R, Bright L, Pritchard B, Bowen IM, de Souza MB, da Silva LD, England GC.

Digital image analysis of testicular and prostatic ultrasonographic echogenicity and heterogeneity in dogs and the relation to semen quality. *Anim Reprod Sci.* 2015; 160: 112-119

O'Shea JD.

Studies on the canine prostate gland: I. Factors influencing its size and weight. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics.* 1962; 72: 321-331

Oettle EE.

Sperm morphology and fertility in the dog. *J Reprod Fertil Suppl.* 1993; 47: 257-260

Oettle EE, Soley JT.

Infertility in a Maltese poodle as a result of a sperm midpiece defect. *J S Afr Vet Assoc.* 1985; 56(2): 103-106

Olar TT, Amann RP, Pickett BW.

Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biol Reprod.* 1983; 29(5): 1114-1120

Palmer CW.

Management and Breeding Soundness of Mature Bulls. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2016; 32(2): 479-495

Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M

Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis.* 2012; 2(4): 253-263

Paltiel HJ, Diamond DA, Di Canzio J, Zurakowski D, Borer JG, Atala A.

Testicular volume: comparison of orchidometer and US measurements in dogs. *Radiology.* 2002; 222(1): 114-119

Parkening TA, Collins TJ, Au WW.

Paternal age and its effects on reproduction in C57BL/6NNia mice. *J Gerontol.* 1988; 43(3): B79-84

Pena AI, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradon PG.

Infertility in a dog due to proximal cytoplasmic droplets in the ejaculate: investigation of the significance for sperm functionality in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(5): 471-478

Pena AI, Quintela LA, Herradon PG.

Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology.* 1998; 50(8): 1211-1220

Prathalingam NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF.

The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl.* 2006; 27(2): 257-262

Pugh CR, Konde LJ, Park RD.

Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology.* 1990; 31(4): 195-199

Purswell BJ, Althouse GC, Kustritz MVR.

Guidelines for using the canine breeding soundness evaluation form. *Clinical Theriogenology.* 2010; 2, No. 1: 51-59

Rauhaus H.

Untersuchung zur Morphologie und Lebend-Tot Färbung von Spermien einiger Haustierarten, Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität, München 1990

Renton JP, Harvey MJ, Harker S.

A spermatozoal abnormality in dogs related to infertility. *Vet Rec.* 1986; 118(15): 429-430

Rijsselaere T, Maes D, Hoflack G, de Kruif A, Van Soom A.

Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(2): 143-148

Rijsselaere T, Van Soom A, Hoflack G, Maes D, de Kruif A.

Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology*. 2004; 62(7): 1292-1306

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W.

Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47 Suppl 6: 204-207

Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A.

New techniques for the assessment of canine semen quality: a review. *Theriogenology*. 2005; 64(3): 706-719

Rolf C, Behre HM, Nieschlag E.

Reproductive parameters of older compared to younger men of infertile couples. *Int J Androl*. 1996; 19(3): 135-142

Root Kustritz MV.

The value of canine semen evaluation for practitioners. *Theriogenology*. 2007; 68(3): 329-337

Root Kustritz MV, Olson PN, Johnston SD, Root TK.

The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1998; 34(4): 348-352

Ruel Y, Barthez PY, Mailles A, Begon D.

Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 1998; 39(3): 212-216

Sakamoto H, Saito K, Oohta M, Inoue K, Ogawa Y, Yoshida H.

Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. *Urology*. 2007; 69(1): 152-157

Salisbury GW, Willett EL, Seligman J.

The Effect of the Method of Making Semen Smears upon the Number of Morphologically Abnormal Spermatozoa. *Journal of Animal Science*. 1942; 1(3): 199-205

Saratsis P, Ypsilantis P, Tselkas K.

Semen quality during vincristine treatment in dogs with transmissible venereal tumor. *Theriogenology*. 2000; 53(5): 1185-1192

Schierbeek A.

The collected letters of Antoni van Leeuwenhoek; an appeal to the scientific world. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1953; 19(3): 181-188

Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M.

NucleoCounter-An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology*. 2006; 51(1): 39-44

Smith R, Madariaga M, Bustos-Obregon E.

Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Int J Androl*. 1992; 15(1): 5-13

Smith SC, England GC.

Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001; 57: 151-159

Soderberg SF.

Infertility in the Male Dog. In Morrow DA. *Current therapy in theriogenology*, Saunders, 1986: 544-546

Solberg HE.

International Federation of Clinical Chemistry. Scientific committee, Clinical Section. Expert Panel on Theory of Reference Values and International Committee for Standardization in Haematology Standing Committee on Reference Values. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *Clin Chim Acta*. 1987; 165(1): 111-118

Soler C, Alambiaga A, Marti MA, Garcia-Molina A, Valverde A, Contell J, Campos M.

Dog sperm head morphometry: its diversity and evolution. *Asian J Androl*. 2017; 19(2): 149-153

Steigerwald P, Krause W.

Estimation of sperm morphology using a new CASA system. *Andrologia*. 1998; 30(1): 23-27

Stornelli A, Arauz M, Baschard H, de la Sota RL.

Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: alkaline phosphatase as an indicator of tubular patency. *Reprod Domest Anim.* 2003; 38(1): 1-4

Taha B, Noakes E, Edward AW.

The effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and libido in the Beagle dog. *Journal of Small Animal Practice.* 2008; 24: 309-315

Taha MB, Noakes DE, Allen WE.

The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *Journal of Small Animal Practice.* 1981; 22(4): 177-184

Taskinen S, Taavitsainen M, Wikstrom S

Measurement of testicular volume: comparison of 3 different methods.

J Urol. 1996; 155(3): 930-933

Teng K, McGreevy P, Toribio J-A, Dhand N

Trends in popularity of some morphological traits of purebred dogs in Australia. *Canine Genetics and Epidemiology.* 2016; 3

Tesi M, Sabatini C, Vannozzi I, Di Petta G, Panzani D, Camillo F, Rota A

Variables affecting semen quality and its relation to fertility in the dog: A retrospective study. *Theriogenology.* 2018; 118: 34-39

Thompson JA, Love CC, Stich KL, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD.

A Bayesian approach to prediction of stallion daily sperm output. *Theriogenology.* 2004; 62(9): 1607-1617

Traas AM, Kustritz MV.

Effect of administering oxytocin or prostaglandin F₂alpha on characteristics of the canine ejaculate. *Can Vet J.* 2004; 45(12): 999-1002

Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J.

Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology.* 1997; 47(4): 913-922

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.

Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57(1): 149-179

Wales R.

The differential staining of human and dog spermatozoa. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 1959; 37: 433-439

Wang C, Leung A, Sinha-Hikim AP.

Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology*. 1993; 133(6): 2773-2781

Wang Y, Jia Y, Yuchi M, Ding M.

The Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) Technique for Sperm Morphology Evaluation. 2011 International Conference on Intelligent Computation and Bio-Medical Instrumentation 2011

Wheaton LG, de Klerk DP, Strandberg JD, Coffey DS.

Relationship of seminal volume to size and disease of the prostate in the beagle. *Am J Vet Res*. 1979; 40(9): 1325-1328

WHO.

World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen* (5th edn.). Geneva: WHO Press 2010

Wildt DE, Baas EJ, Chakraborty PK, Wolfle TL, Stewart AP.

Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog. *Theriogenology*. 1982; 17(4): 445-452

Wilson MS.

Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl*. 1993; 47: 307-311

Wolfram C, Toni L, Ulbrich B.

Specific Toxicologic Aspects of the Quinolones. *Reviews of Infectious Diseases*. 1988; 10: S141-S146

Woodall PF, Johnstone IP.

Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil*. 1988; 82(2): 603-609

Woodall PF, Johnstone IP.

Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. *Journal of Small Animal Practice*. 1988; 29(8): 543-547

Yeung CH, Cooper TG, Nieschlag E

A technique for standardization and quality control of subjective sperm motility assessments in semen analysis. *Fertil Steril.* 1997; 67(6): 1156-1158

VIII. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. Andrea Meyer-Lindenberg für die Überlassung des Themas, die Korrekturen und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Dr. Christiane Otdorff für die Idee zum Thema meiner Doktorarbeit. Christiane, danke für Deine Unterstützung in den letzten beiden Jahren. Ich bin sehr froh, dass ich mit dir zusammenarbeiten durfte.

Vielen Dank auch an das gesamte Team der Reproduktion: Dr. Beate Walter, Dr. Ulrike Flock und Christian Leykam.

Der Weg zum Dokortitel war nicht immer einfach, ohne die richtigen Menschen an meiner Seite wäre ich verloren gewesen. Deshalb möchte ich mich bei meinen einzigartigen Freunden bedanken. Karo, Alexander, Rebecca, Anna-Lena, Kirsten, Ali, Lorenz und Miri - Danke für Euren seelischen Beistand in jeder Lebenslage. Ohne Euch hätte das alles niemals geklappt und es hätte auch nur halb so viel Spaß gemacht. Ihr seid perfekt.

Erwähnen möchte ich an dieser Stelle auch Bob, Lola, Chipsy, Rosi, Pancakes, Lenny und Lara, die mich treu durch das Studium begleitet haben und mir in den schwachen Momenten gezeigt haben, warum es sich lohnt, diesen Weg zu gehen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Geschwistern Jenny und Theo. Danke J, danke T, ihr habt mir wann immer es nötig war den Rücken freigehalten und mich unterstützt. Ich liebe Euch. Einmal Welp, immer Welp.

Der größte Dank gilt meiner Mutter Heike und meinem Vater Theodor. Mami und Papily, danke für Eure bedingungslose Liebe und Unterstützung. Obwohl Ihr es nie leicht hattet, habt Ihr mir immer ein tiefes Gefühl von Sicherheit gegeben. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Ihr seid die besten Eltern, die ich mir wünschen könnte. Ich liebe Euch - Tausend Kussele.