

**Aus dem Institut für Tierzucht in Mariensee
der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
Braunschweig**

**Vergleichende Untersuchung
zu Organisations- und Arbeitsstrukturen
von Rinderbesamungsstationen
in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland**

INAUGURAL – DISSERTATION

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Alexander Maute
aus Laupheim**

Hannover 2003

Wissenschaftliche Betreuung: Apl.-Prof. Dr. H. Niemann

1. Gutachter: Apl.-Prof. Dr. H. Niemann
2. Gutachter: Prof. Dr. O. Distl

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Mai 2003

Für Carolin

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	3
2.1.	Historischer Überblick	3
2.2.	Rechtliche Grundlagen	4
2.2.1.	Internationale Standards	4
2.2.2.	Europäisches Recht	5
2.2.3.	Deutsches Recht	7
2.3.	Bullenhaltung	8
2.3.1.	Aufstallung	8
2.3.2.	Fütterung	13
2.3.3.	Pflege	14
2.4.	Besamungsstationen	16
2.4.1.	Sprunghalle	17
2.4.2.	Transport	19
2.5.	Spermagewinnung	19
2.5.1.	Ausrüstung	19
2.5.1.1.	Künstliche Scheiden	19
2.5.1.2.	Elektroejakulatoren	21
2.5.2.	Aufsprungtiere	23
2.5.3.	Phantome	25
2.5.4.	Absamungsmodus	26
2.5.4.1.	Sexuelle Stimulation	27
2.5.4.2.	Absamungshäufigkeit	29
2.6.	Spermauntersuchung und –beurteilung	31
2.6.1.	Makroskopische Untersuchungen: Aussehen, Geruch und Volumen	32
2.6.2.	Mikroskopische Untersuchungen	33
2.6.2.1.	Spermienkonzentration	33
2.6.2.2.	Spermienbewegungen	35
2.6.2.2.1.	Massenbewegung	36

2.6.2.2.2.	Vorwärtsbewegung (Motilität)	36
2.6.3.	Morphologische Untersuchungen	39
2.6.3.1.	Allgemeine morphologische Untersuchungen	39
2.6.3.2.	Kopfkappe (Akrosom)	41
2.6.3.3.	Chromatinstruktur	43
2.6.4.	Vitalitätsuntersuchungen	45
2.6.4.1.	Lebend-Tot-Tests	45
2.6.4.2.	Lebensfähigkeit (Viabilität)	46
2.6.4.3.	Programmierter Zelltod (Apoptose)	49
2.6.5.	Resistenztests	50
2.6.5.1.	Thermoresistenztests (TRTs)	50
2.6.5.2.	Osmotische Resistenztests (ORTs)	52
2.6.6.	Fremdzellengehalt und andere Beimengungen	53
2.7.	Spermaverarbeitung	54
2.7.1.	Tiefgefriersperma	54
2.7.1.1.	Konfektionierung	54
2.7.1.2.	Anzahl der Spermien pro Besamungsportion	56
2.7.1.3.	Spermaverdünnung und –konservierung	58
2.7.1.4.	Qualitätskontrolle	66
2.7.2.	Flüssigkonservierung	67
3.	MATERIAL UND METHODEN	69
3.1.	Auswahl der Besamungsstationen	69
3.2.	Datenerhebung	70
3.3.	Auswertung	70
4.	ERGEBNISSE	72
4.1.	Allgemeine Struktur- und Organisationsmerkmale	72
4.1.1.	Alter der Besamungsstationen	72
4.1.2.	Durchschnittliche Anzahl an Bullen je Besamungsstation	73
4.1.3.	Rinderrassen	73
4.1.4.	Betriebseigene und –fremde Bullen	75

4.1.5.	Tierpfleger	76
4.1.6.	Isolationsställe	78
4.1.7.	Allgemeine Hygienemaßnahmen	80
4.2.	Bullentransport und –haltung	82
4.2.1.	Transport	82
4.2.2.	Aufstallung	83
4.2.3.	Fütterung	86
4.2.4.	Pflege	88
4.3.	Samengewinnung	89
4.3.1.	Sprungplatz	89
4.3.2.	Absamungsausrüstung	91
4.3.3.	Organisation	95
4.3.4.	Bullenidentifikation und –sicherung	96
4.3.5.	Samengewinnungen außerhalb der Besamungsstation	101
4.4.	Samenbeurteilung und –verarbeitung	102
4.4.1.	Beurteilung von Frischsperma	102
4.4.2.	Spermaverarbeitung	110
4.4.2.1.	Herstellung flüssigkonservierter Besamungsportionen	110
4.4.2.2.	Herstellung tiefgefrorener Besamungsportionen	111
4.4.2.3.	Beurteilung aufgetauter Besamungsportionen	121
4.4.2.4.	Quarantäne von Tiefgefriersperma	125
5.	DISKUSSION	127
5.1.	Historischer Zusammenhang	128
5.2.	Hygienestatus internationaler Rinderzuchtstationen	129
5.3.	Bullenhaltung in internationalen Rinderzuchtstationen	135
5.4.	Samengewinnung und –beurteilung	137
5.5.	Spermaverarbeitung in internationalen Besamungsstationen	155
5.6.	Zusammenfassende Betrachtung	157
6.	ZUSAMMENFASSUNG	162

7.	SUMMARY	166
8.	LITERATURVERZEICHNIS	170
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	218
10.	FRAGEBOGEN	222

1. EINLEITUNG

Der Erfolg züchterischer Maßnahmen beim Rind ist abhängig von der Erkennung und Verwendung genetisch überlegener Einzeltiere, der Vererbbarkeit (Heritabilität) erwünschter Eigenschaften und der Möglichkeit, das genetische Material eines Tieres in kurzer Zeit auf breiter Basis in eine Gesamtpopulation einzubringen.

Durch die Entwicklung praxistauglicher Methoden der künstlichen Besamung gelang es, die Selektionsintensität für Vatertiere um ein Vielfaches zu steigern. Insbesondere der Einsatz weniger, besonders leistungsfähiger Vatertiere führte zu einem deutlich beschleunigten Zuchtfortschritt. Im Gegensatz zur natürlichen Paarung, durch die pro Bulle nur eine beschränkte Anzahl an Nachkommen generiert werden kann, erlaubt die Verwendung von konservierten Besamungsportionen eine räumlich, zeitlich und zahlenmäßig beinahe uneingeschränkte Verwendung des Erbgutes. Mit dem Sperma eines Bullen können jährlich Tausende bis Zehntausende von Besamungen durchgeführt werden. Bedenkt man außerdem die seuchenhygienischen Vorteile, so überrascht es nicht, dass die künstliche Besamung seit Beginn des letzten Jahrhunderts einen weltweiten Siegeszug angetreten hat und zahlreiche Rinderzuchtstationen, d.h. Einrichtungen für die Haltung männlicher Zuchttiere zum Zwecke der Samengewinnung, -behandlung und -abgabe, gegründet wurden.

Die Anzahl an weltweit durchgeführten künstlichen Besamungen von Rindern ist schwer zu schätzen (GIL 1999). Insgesamt sollen jährlich etwa 60,4 Millionen Rinder künstlich besamt werden (CHUPIN u. SCHUH 1993; CHUPIN u. THIBIER 1995). 2001 wurden allein in Deutschland fast 5 Millionen (4.928.987) Erstbesamungen durchgeführt (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER e.V. 2002).

Trotz der bisher erreichten Fortschritte in der Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung von Sperma, kann eine starke Nachfrage bei Spitzenvererbern zu Engpässen im Angebot an Besamungsportionen führen. Um die Produktion an ausreichend befruchtungsfähigen Besamungsportionen zu optimieren, werden in allen rinderzüchtenden Betrieben fortlaufende Verbesserungen der

Rahmenbedingungen der Bullenhaltung sowie einzelner Arbeitsschritte von Spermagewinnung und -verarbeitung erprobt. Dies hat zu einer großen Vielfalt der Organisations- und Arbeitsstrukturen von Besamungsstationen geführt, zu der es bisher, außer einer von FÜHRER (2001) durchgeführten kleineren Studie, keine vergleichenden Untersuchungen gibt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten deshalb in Form einer Fragebogenaktion Informationen über gegenwärtige Standards in internationalen Rinderzuchtstationen gesammelt und analysiert werden. Gleichzeitig sollten die erhobenen Fakten in Bezug zu den entsprechenden Veröffentlichungen gesetzt werden, wobei aber angesichts der überaus großen Zahl an Publikationen, nicht die Absicht bestand, eine vollständige Literaturübersicht zu geben.

2. LITERATUR

2.1. Historischer Überblick

Wesentliche wissenschaftliche und experimentelle Grundlagen für die künstliche Besamung von Tieren entwickelte der russische Biologe ILIA I. IWANOW, der von 1889 bis 1930 in St. Petersburg Versuche an Pferden, Rindern, Schafen, Geflügel, verschiedenen Wildtieren und Insekten durchführte. Neben tierzüchterischen Aspekten befasste er sich unter anderem mit Verdünnung, Konservierung und Transport von Sperma. 1912 veröffentlichte er die Monographie "Die künstliche Befruchtung der Haustiere" (In deutscher Sprache bei M. u. H. Schaper, Hannover, 1912).

In den 30er und 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurden durch zahlreiche Arbeiten große Fortschritte auf den Gebieten der Spermagewinnung (ROEMMELE 1927; MILOWANOW 1934), -dosierung, -verdünnung (MILOWANOW 1932) und -konservierung (IWANOW 1930; PHILLIPS u. LARDY 1940) erzielt (nach: BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993).

Unter Leitung von SÖRENSEN entstand 1936 die erste Besamungsgenossenschaft mit gemeinschaftlicher Bullenhaltung auf der dänischen Insel Samsö (nach: KUPFERSCHMIED 1993). 1942 errichteten GÖTZE und ROSENBERGER im Kreis Pinneberg bei Hamburg die erste deutsche Besamungsstation (GÖTZE 1949).

Zunächst waren seuchenhygienische Gründe für die Errichtung von Besamungsstationen ausschlaggebend; im Laufe der Zeit rückten aber zunehmend züchterische Ziele in den Vordergrund (LÜBKE 1974; BUSCH et al. 1991).

Die künstliche Befruchtung war anfangs auf die Verwendung von gekühltem Frischsperma beschränkt; erst später gewann Tiefgefriersperma zunehmend an Bedeutung, nachdem POLGE et al. (1949) sowie SMITH und POLGE (1950) Glycerol als Gefrierschutzmittel entdeckt und erste erfolgreiche Einfrier- und Wiederauftauversuche an Rindersperma durchgeführt hatten.

Auch in der Portionierung und Konfektionierung von Tiefgefriersperma wurden immer bessere Methoden entwickelt und in die Praxis umgesetzt. Dabei sind v.a. die Arbeiten von POLGE und ROWSON (1950) zur Gefrierkonservierung in Glasampullen, NAGASE (1958) zur Spermakonfektionierung in Pellets auf CO₂-Trockeneis und Lagerung in flüssigem Stickstoff und CASSOU (1964) zur Spermaportionierung in Plastkpailletten hervorzuheben (nach: BUSCH et al. 1991). Durch den Einsatz von Tiefgefriersperma wurde es möglich, Besamungsportionen unbefristet zu lagern (BERNDTSON u. FOOTE 1972; MAZUR 1980; LEE et al. 1977) und in geeigneten Behältern über weite Strecken zu transportieren. Dies führte zu einem zunehmenden Rückgang in der Zahl kleinerer Besamungsstationen. 1965 gab es in der Bundesrepublik Deutschland noch 96 Besamungsstationen. Zehn Jahre später war ihre Zahl bereits auf 58 gesunken. 2001 bestanden in Deutschland noch 26 Besamungsstationen (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER e.V. 2002; www.adr-web.de/statistiken.htm).

2.2. Rechtliche Grundlagen

2.2.1. Internationale Standards

Das „Office international des épizooties“ (OIE) ist eine internationale Organisation mit Hauptsitz in Paris, die 1924 von 28 Ländern gegründet wurde und heute 162 Mitgliedsstaaten zählt. Aufgabe der OIE ist die weltweite Prävention, Erkennung und Bekämpfung von Tierseuchen. Von der OIE festgelegte Standards werden von der Welthandelsorganisation („World Trade Organisation“: WTO) als international gültige Regeln des Tiergesundheitswesens anerkannt. Eines der wichtigsten international gültigen Regelwerke ist der „International Animal Health Code“ (IAHC), der sich in Teil 3, Sektion 3.2., Anhang 3.2.1. mit bovinem Sperma befasst. In insgesamt 10 Artikeln werden die Anforderungen festgelegt, die von Besamungszentren und spermaverarbeitenden Laboratorien erfüllt werden müssen. Dabei wird u.a. auf

Hygienestatus und Testregime für Zuchtbullen und Aufsprungtiere, Spermagewinnung und -verarbeitung sowie verschiedene Aspekte der Tierhaltung Bezug genommen. Der „International Animal Health Code, 10th edition - 2002“ ist im Internet unter „www.oie.int“ unter dem Link: „International Health Standards“ zugänglich.

2.2.2. Europäisches Recht

In den Mitgliedsstaaten der Europäischen Gemeinschaft gelten die vom Europarat beschlossenen europäischen Übereinkommen und Protokolle. Die Übereinkommen können im Internet unter „www.coe.int“ unter dem Link „Treaty Office“ durch Eingabe der Nummer der „European Treaty Series“ (ETS) abgerufen werden. Für den Betrieb einer Besamungsstation sind folgende Übereinkommen von Bedeutung:

- Europäisches Übereinkommen vom 13.12.1968 über den Schutz von Tieren beim internationalen Transport (Gesetz vom 12.07.1973; BGBl. 1973 II S.721, ETS 065)
- Europäisches Übereinkommen vom 10.03.1976 zum Schutz von Tieren in landwirtschaftlichen Tierhaltungen (Gesetz vom 25.01.1978; BGBl. 1978 II S.113, ETS 087)
- Zusatzprotokoll vom 10.05.1979 zum Europäischen Übereinkommen über den Schutz von Tieren beim internationalen Transport (Gesetz vom 28.08.1980; BGBl. 1980 II S.1153, ETS 103)
- Gesetz zum Änderungsprotokoll vom 6.02.1992 zum Europäischen Übereinkommen zum Schutz von Tieren in landwirtschaftlichen Einrichtungen (Gesetz vom 23.08.1994; BGBl. 1994 II S.1350, ETS 145)

Der Europarat hat auf Grundlage der europäischen Übereinkommen völkerrechtlich verbindliche Empfehlungen über Haltung und Transport von Rindern erarbeitet und weitere Verordnungen und Richtlinien erlassen:

- Richtlinie 64/432/EWG des Rates vom 26.06.1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Verkehr mit Rindern und Schweinen (Abl.EG Nr.C.189 S.0001)
- Richtlinie 72/462/EWG des Rates vom 12.12.1972 zur Regelung viehseuchenrechtlicher und gesundheitlicher Fragen bei der Einfuhr von Rindern und Schweinen und von frischem Fleisch aus Drittländern (Abl.EG Nr.L.302 S.0028)
- Richtlinie 77/504/EWG des Rates vom 25.07.1977 über reinrassige Zuchtrinder (Abl.EG Nr.L.206 S.8)
- Richtlinie 87/328/EWG des Rates vom 18.6.1987 über die Zulassung reinrassiger Zuchtrinder zur Zucht (Abl.EG Nr.L.167 S.0054)
- Entscheidung der Kommission 88/124/EWG vom 21.01.1988 über die Muster und Angaben in Zuchtbescheinigungen für Samen und befruchtete Eizellen reinrassiger Zuchtrinder (Abl.EG Nr.L.062 S.0032)
- Richtlinie 88/407/EWG des Rates vom 14.6.1988 zur Festlegung der tierseuchenrechtlichen Anforderungen an den innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit gefrorenem Samen von Rindern und dessen Einfuhr aus Drittländern (Abl.EG Nr.L.194 S.0010)

Für Besamungsstationen werden u.a. Mindestanforderungen bezüglich der folgenden Punkte festgelegt:

- tierseuchenhygienisch unbedenkliche Lage
- bauliches Konzept mit Quarantäne-, Reinigungs- und Desinfektionsmöglichkeiten
- Kontrolle durch Amts- und Stationstierärzte
- Identifizierung von Einzeldosen
- Desinfektion der Lagergefäße usw.

Außerdem regelt die EG-RICHTLINIE 88/407/EWG die zuchthygienischen Untersuchungen von Bullen vor und während ihres Aufenthaltes in der Besamungsstation, sowie die Voraussetzungen, unter welchen Besamungsportionen, die innerhalb oder außerhalb der Europäischen

Gemeinschaft hergestellt wurden, in den innergemeinschaftlichen Verkehr gebracht werden können.

- Richtlinie 91/628/EWG des Rates vom 19.11.1991 über den Schutz von Tieren beim Transport sowie zur Änderung der Richtlinien 90/425/EWG und 91/496/EWG (Abl.EG Nr.L. 340 S.17)
- Entscheidung der Kommission 93/693/EG vom 14.12.1993 zur Erstellung der Liste der zur Ausfuhr von Rindersperma in die Gemeinschaft zugelassenen Besamungsstationen in Drittländern sowie zur Aufhebung der Entscheidungen 91/642/EWG, 91/643/EWG und 92/255/EWG
- Richtlinie 94/381/EG des Rates vom 27.06.1994 über Schutzmaßnahmen in Bezug auf die spongiforme Rinderenzephalopathie und die Verfütterung von aus Säugetieren gewonnenen Futtermitteln (Abl.EG Nr.L.172 S.23)
- Richtlinie 98/58/EG des Rates vom 20.07.1998 über den Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere (Abl.EG Nr.L.221 S.23) sowie Entscheidung der Kommission über Mindestanforderungen an die Kontrolle von Betrieben, in denen landwirtschaftliche Nutztiere gehalten werden, vom 17.12.1999

Alle genannten EG-Richtlinien und Entscheidungen wurden bereits mehrfach durch ergänzende Richtlinien erweitert bzw. aktualisiert. Aus Gründen der Vereinfachung werden hier nur die ursprünglichen Rechtsakte, nicht aber die Details der einzelnen Änderungen, genannt. Unter „www.europa.eu.int/eur-lex/de“ können die Richtlinien und Entscheidungen sowie ihre Änderungen abgerufen werden.

2.2.3. Deutsches Recht

Wie alle EU-Mitgliedsstaaten hat auch die Bundesrepublik Deutschland ihre nationalen Rechts- und Verwaltungsvorschriften an europäisches Recht angepasst. Auf der Grundlage des TIERZUCHTGESETZES vom 22.01.1998 (BGBl. I S.145; zuletzt geändert durch Artikel 187 V vom 29.10.2001, BGBl. I S.2785) und des TIERSCHUTZGESETZES vom 01.06.1998 (BGBl. I S.1105, 1818; zuletzt geändert durch Artikel 2 des Gesetzes vom 12.04.2001, BGBl. I S.530) sind das

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (BMVEL) und die Landesregierungen ermächtigt, Verordnungen zu erlassen. Die folgenden Regelungen sind im Zusammenhang mit dieser Thematik hervorzuheben:

- Verordnung über die Untersuchung männlicher Tiere zur Erteilung der Besamungserlaubnis vom 16.7.1998 (BGBl. I S.1891)
- Verordnung zum Schutz von Tieren beim Transport vom 11.06.1999 (BGBl. I S.1337)
- Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei deren Haltung vom 25.10.2001 (BGBl. I S.2758) geändert durch die Verordnung vom 28.02.2002 (BGBl. I S.1026)

Unter der Adresse „<http://jurcom5.juris.de/bundesrecht/index.html>“ finden sich die Gesetze im Internet.

2.3. Bullenhaltung

2.3.1. Aufstallung

Besamungsbullen sind entweder in Boxen- oder in Anbindehaltung aufgestellt.

Die Haltung in Einzelboxen mit angeschlossenem Auslauf ist zwar kostspieliger, erspart aber zusätzliche Bewegungsmaßnahmen (BREUER 1964). In Boxen gehaltene Bullen sind zudem ruhiger und einfacher sauber zu halten. Bei Anbindehaltung sollen das Platzgefälle gleichmäßig 3% betragen und eine Jaucherinne etwa 1,2m vom Futtertrog entfernt quer unter dem Standplatz verlaufen (BREUER 1964). Auch BUSCH et al. (1991) maßen einem unterhalb des Präputiums anzubringenden Urinabfluss entscheidende Bedeutung für die Sauberkeit der Tiere bei und empfehlen Standbreiten von 1,2m bis 1,5m und Standlängen von 2,0m bis 2,2m.

Boxen sollen eine Grundfläche von 4m x 4m und einen dazugehörigen Auslauf aufweisen. Außerdem müssen sie über Fluchtspalten verfügen, die zwar das

Passieren eines Menschen, nicht aber das des möglicherweise angreifenden Bullen gestatten (BUSCH et al. 1991).

Ein vom „West of Scotland Agricultural College“ entworfenes Haltungssystem weist 3,35m x 4,42m große Boxen mit je einem 6,10m x 4,15m großen Auslauf auf. In jedem Auslauf befindet sich ein 0,9m x 1,65m großer Zwangsstand („service pen“), in dem die Tiere gegebenenfalls immobilisiert werden können. Eine Laufkette ist in 1,70m Höhe von der Box in den Auslauf gespannt und über eine zweite Kette mit Nasenring und Hörnern des Bullen verbunden. Das Kettensystem gewährt genug Bewegungsspielraum, damit sich das Tier niederlegen kann, ist aber so kurz, dass der Bulle die Ecken der Box und des Auslaufes nicht erreichen kann, die so als eventuelle Fluchtzonen dienen können (SAINSBURY 1986).

In Übersicht 1 nach BUSCH et al. (1991) sind die Vor- und Nachteile von Boxen- und Anbindehaltung dargestellt.

Übersicht 1: Vergleich von Boxen- und Anbindehaltung von Besamungsbullen (BUSCH et al. 1991)

Beurteilungskriterium	Boxenhaltung	Anbindehaltung
Bedarf an Stallfläche	hoch (16m ²)	gering (3-4m ²)
Auslastung der Stallfläche	niedrig	hoch
Bewegung	individuell möglich	Zwangsbewegung
Entmistung	manuell	mechanisierbar
Fütterung	teilweise mechanisierbar	mechanisierbar
Verschmutzung der Bullen	gering	größer
Einfluss auf Spermaproduktion	ohne	ohne
Arbeitsproduktivität	gering	höher

Nach WEIGT (1975) beträgt der für Haltung, Pflege und Spermagewinnung je Bulle durchschnittlich benötigte tägliche Arbeitszeitaufwand bei Boxenhaltung ca. 60 min und bei Anbindehaltung ca. 50 min. In Übersicht 2 sind die Arbeitsverfahren und Arbeitsgänge aufgezählt, die in die Berechnung des Arbeitszeitaufwandes (Akmin) einbezogen wurden (nach: BUSCH et al. 1991).

Übersicht 2: Vergleich des Arbeitszeitaufwandes (Akmin/Bulle und Tag) für die Boxen- und Anbindehaltung von Besamungsbullen (WEIGT 1975):

Arbeitsverfahren	Boxenhaltung	Anbindehaltung
Haltung und Fütterung		
Füttern und Entmisten	18,0	12,0
Bewegen der Bullen	8,0	2,0 (1x je Woche)
Säubern der Ausläufe	4,0	/
Reparaturarbeiten	1,5	2,0
Sonstige Arbeiten	3,0	3,0
Pflege der Bullen		
Putzen	3,2	1,2
Teilwäsche	2,2	10,0 (2x je Woche)
Ganzwäsche, manuell	5,0 (1x je Woche)	6,4 (2x je Woche)
Ganzwäsche, maschinell	3,2 (1x je Woche)	0,7
Klauenpflege und -behandlung	0,4	
Spermagewinnung		
Vorbereitung und Reinigung des Phantoms	1,9	1,9 (40 Absamungen je Tag)
Vorbereitung und Absamung des Bullen	10,4	10,4 (2 Absamungen je Woche)
Reinigung des Wasch- und Absamraumes	0,7	0,7
x Akmin/ Aufwand je Bulle und Tag	61,5	50,3
Bullen je Stalltechniker	10,0	12,8

Schon frühzeitig sahen FINCHER et al. (1956) in der Aufstallung auf Betonböden einen Hauptfaktor für die Entwicklung von entzündlichen Erkrankungen des Carpal- und Tarsalgelenkes.

KORDTS (1963) betonte, dass es wichtig ist, die Fußböden trocken zu halten und berichtete von guten Erfahrungen mit Zementlochplatten. KORDTS (1963) und BREUER (1964) lehnten Tiefstallmist als klauenhornschädigend ab. AVERDUNK (1969) und CRANZ (1969) beschrieben Beinschäden bei Bullen, die während der Eigenleistungsprüfung in Anbindeställen aufgestellt worden waren. MATZKE und KOLLER (1971) beobachteten bei einstreuloser Aufstallung auf Spaltenböden oder Gitterrost das Auftreten von Gelenksdeformationen, die in Laufställen mit Einstreu so gut wie nie vorkamen.

FISCHERLEITNER et al. (1987) werteten an einem umfangreichen Tiermaterial orthopädische Erkrankungen von Besamungsbullen und deren Nachkommen aus. Dabei fanden sie bei 58% der Tiere Klauenerkrankungen. Zwar war Limax häufiger genetisch bedingt; andere Klauenerkrankungen wurden jedoch vorrangig durch Umwelteinflüsse verursacht.

FAULL et al. (1996) fanden bei Untersuchungen von 37 Milchviehbetrieben, dass sowohl zu glatte, als auch zu raue Oberflächen zu einem erhöhten Auftreten von Lahmheiten führten.

BARGAI und COHEN (1992) analysierten die Daten von zwei israelischen Besamungszentren mit jeweils etwa 100 Milchviehbullen. In einem der Betriebe wurden die Tiere auf tiefem Sand, im anderen auf Betonböden gehalten. Im Zeitraum von 1975 bis 1987 traten im ersten Betrieb (Sandböden) zwei Fälle von Sprunggelenkslahmheiten auf. Dagegen wurden im gleichen Zeitraum im zweiten Betrieb (Betonböden) 22 Fälle beobachtet.

Einstreu-Materialien werden v.a. verwendet, um die Tiere sauber zu halten und ihnen eine komfortable Liegefläche zu bieten. Außerdem kann geeignete Einstreu eine zusätzliche Nährstoffquelle liefern sowie Ausscheidungsprodukte binden und dadurch deren Beseitigung erleichtern (ENSMINGER 1993).

Die Art des gewählten Einstreumaterials hängt v.a. von Verfügbarkeit und Preis sowie Absorptionsvermögen und Nährstoffgehalt ab. Außerdem sollte das verwendete Material nicht zu staubig oder gar scharfkantig sein. Holzprodukte, wie Sägemehl, -späne, Baumrinden oder Holzchips kompostieren langsamer als die verschiedenen Stroh- und Heusorten und weisen einen geringeren Nährstoffgehalt auf. Weich-Hölzer absorbieren etwa doppelt so viel Flüssigkeit, wie Hart-Hölzer und Grünholz etwa nur halb so viel wie trockenes Holz. Geschnittenes Stroh nimmt etwa 25% mehr Flüssigkeit auf als ungeschnittenes, ist aber u.U. staubiger (ENSMINGER 1993).

Übersicht 3 zeigt die Wasser-Absorptionsfähigkeit einiger Einstreumaterialien.

Übersicht 3: Wasserabsorptionsvermögen verschiedener Einstreumaterialien

(l Wasser/ kg Einstreu; ENSMINGER 1993)

Material	Wasserabsorption (l/kg)
Gerstenstroh	2,10
Flachsstroh	2,60
Heu, kurz geschnitten	3,00
Haferstroh	2,80
Torfmuld	10,00
Roggenstroh	2,10
Sand	0,25
Weizenstroh, lang	2,20
Weizenstroh, kurz geschnitten	2,95
Pinien-Holzchips	3,00
Pinien-Sägemehl	2,50
Pinien-Sägespäne	2,00
Pinien-Nadeln	1,00
Hartholzchips	1,50
Hartholz-Sägespäne	1,50
Hartholz-Sägemehl	1,50

FAULL et al. (1996) beobachteten bei Zunahme der Einstreumenge einen Rückgang der Lahmheitshäufigkeit. Bei harten Oberflächen mit wenig Einstreu, traten vermehrt Verletzungen im Tarsalgelenksbereich auf. Als zufrieden stellend erwiesen sich Betonoberflächen, die mit Gummimatten oder etwas Einstreu versehen waren. Allerdings wurden einige Gummimatten mit der Zeit glatt und rutschanfällig. Liegeboxen mit weichem Boden und ausreichender Einstreu erbrachten die besten Ergebnisse.

Auch FISCHERLEITNER (1993) empfahl große, weiche und gut eingestreute Liegeplätze, Einzelaufboxen mit gegenseitigem Sichtkontakt und ausreichender Bewegungsfreiheit, sowie wöchentlich mehrmalige Bewegung in einer Bewegungsanlage.

Zuchtbullen sollte Auslauf in einem Freigehege ermöglicht werden (BREUER 1964; LARSON 1970; BUSCH et al. 1991; TROXLER 2001). Als Untergrund des Auslaufes empfahl LARSON (1970) Wiesen, Weiden und Sand-, nicht aber Kiesböden. Nach Ansicht von BREUER (1964) treten dagegen bei Sandböden vermehrt Zwischenklauenentzündungen und bei Lehmböden starke Verschmutzungen auf.

2.3.2. Fütterung

In der Zuchtbullenfütterung ist auf eine einwandfreie Qualität des Futters zu achten (BUSCH et al. 1991; JEROCH et al. 1999). Einseitige Futterrationen, mangelhafte Nährstoffversorgung, grobe Verschmutzung und Beimengungen von toxischen Inhaltsstoffen wie Phytoöstrogenen, Mykotoxinen, Pflanzenschutzmitteln und Schwermetallen sind zu vermeiden (BUSCH et al. 1991).

Um Fütterungsfehlern vorzubeugen, empfahlen KORDTS (1963) und KIRCHGESSNER (1992) eine langfristige Futterplanung sowie regelmäßige Probewägungen der vorgesehenen Tagesrationen. Nach Ansicht mehrerer Autoren können plötzliche Futterwechsel Störungen in der Deck- und Befruchtungsfähigkeit zur Folge haben (KORDTS 1963; MEYER et al. 1989; BUSCH et al. 1991; KIRCHGESSNER 1992; JEROCH et al. 1999). Allerdings fanden LASZCZKA und ORAMUS-KASPRZYK (1980, 1983) bei Fütterungsversuchen mit Zwillingspaaren nach abruptem Futterwechsel (bei gleich bleibend guter Futterqualität) keine signifikanten Veränderungen von Sexualverhalten, Spermaqualität oder Gefriertauglichkeit (nach: BUSCH et al. 1991).

Besamungsbullen sind in Zuchtkondition zu halten und dürfen nicht verfetten (KORDTS 1963; FISCHERLEITNER 1993; JEROCH et al. 1999). Eine übermäßige Fütterung kann sich nach KUPFERSCHMIED (1993) und JEROCH et al. (1999) negativ auf Libido und Spermaproduktion auswirken. SKINNER et al. (1981) berichteten von Jungbullen, die über einen längeren Zeitraum Krafffutter ad libitum erhalten hatten und exzessive Fettablagerungen im Hodensack und im Leistenring aufwiesen. Verglichen mit Bullen, denen weniger Krafffutter gefüttert worden war, bestand ein signifikant geringerer Unterschied zwischen der Körperinnentemperatur und der Temperatur der Hoden. Der Anteil abnormaler Samenzellen im Ejakulat war zudem signifikant größer.

Fütterungsgrundlage bilden verschiedene Saft- und Trockenfuttermittel, die durch Krafffutter unterschiedlicher Zusammensetzung ergänzt werden. Das Verfüttern von Säugerprotein an Wiederkäuer ist in der Europäischen Union seit 1994 verboten

(Richtlinie 94/381/EG). Beispiele für die Zusammensetzung der Futtermischung bzw. den täglichen Nährstoffbedarf finden sich bei KORDTS (1963), MEYER et al. (1989), BUSCH et al. (1991), KIRCHGESSNER (1992) und JEROCH et al. (1999).

Die Bedeutung einer ausreichenden Vitaminversorgung der Zuchtbullen wurde schon früh erkannt (GÖTZE 1949; SCHMIDT 1953; LIEBENBERG 1953; KORDTS 1954; EIBL 1959). Viele Untersucher empfehlen die Substitution von Mineralstoffen, Spurenelementen (Co, Cu, I, Mn, Zn) und Vitaminen (A, D₂, D₃, E) in Abhängigkeit von Qualität und Zusammensetzung der jeweiligen Gesamtmischung (MEYER et al. 1989; BUSCH et al. 1991; KIRCHGESSNER 1992; FISCHERLEITNER 1993). Die Futteranlieferung soll nach BUSCH et al. (1991) ausschließlich an bestimmten Übergabestellen erfolgen und die Futtermittel selbst müssen aus seuchenfreien Gebieten und Betrieben stammen.

2.3.3. Pflege

Die für Zuchtbullen in der Literatur beschriebenen Pflegemaßnahmen umfassen Trocken- und Nassreinigungen, Haarklappen, Kürzen der Präputialbehaarung und Klauenkorrekturen. Sie dürfen aus Sicherheitsgründen nicht von Einzelpersonen durchgeführt werden (BUSCH et al. 1991).

Bei Milchkühen konnte das Vorkommen von Lahmheiten durch Klauenpflege signifikant reduziert werden (MANSON u. LEAVER 1988, 1989).

GÖTZE (1949), EIBL (1959), KORDTS (1963) und BUSCH et al. (1991) befürworteten Klauenkorrekturen im Abstand von 6 Monaten. JAHNEL (1960), KNEZEVIC (1962), ALMQUIST (1978) und FISCHERLEITNER (1993) empfahlen Korrekturen der Klauen sogar im Abstand von 3 Monaten vorzunehmen. Die Durchführung der Klauenkorrekturen sollte durch ausgebildete Spezialisten erfolgen (KNEZEVIC 1962; BUSCH et al. 1991). Die Klauen aller Zuchtbullen sollen täglich bei Belastung und Entlastung des Fußes besichtigt und mit Wasser, Seife und Bürste

gründlich gereinigt werden (KNEZEVIC 1962). Im Anschluss ist v.a. der Zwischenklauenspaltbereich zu trocknen und das Klauenhorn mit säurefreiem Fett einzureiben.

Um das Klauenhorn zu härten und Infektionen vorzubeugen, forderte SAINSBURY (1986) regelmäßige Klauenbäder mit 3%iger Kupfersulfat- oder 10%iger Formalinlösung. Richtlinien bezüglich der Durchführung der Klauenkorrektur, sowie Vorschläge zur Immobilisierung der Bullen finden sich bei LARSON (1970).

Eine regelmäßige Nassreinigung der Bullen wird ebenfalls als notwendig angesehen (ALMQUIST 1978; BUSCH et al. 1991). Zur Vermeidung einer zu hohen Luftfeuchtigkeit sollen Waschungen in getrennten Waschräumen und nicht innerhalb des Stalles durchgeführt werden (KORDTS 1963).

Zuchtbullen sind bei Boxenhaltung wöchentlich einmal und bei Standhaltung wöchentlich zweimal zu waschen; wobei sich Wasserdruckspritzgeräte und teilautomatisierte Waschanlagen bewährt haben (BUSCH et al. 1991). Nach dem Waschen und Abspülen mit kaltem Wasser müssen die Tiere bei Umgebungstemperaturen von über 15°C bis zur Abtrocknung geführt werden; bei niedrigeren Temperaturen ist eine Unterbringung in Warmlufträumen bis zur Trocknung angezeigt (BUSCH et al. 1991).

Präputialhaare sollen auf eine Länge von 2 bis 3 cm gekürzt werden (ALMQUIST 1978; KUPFERSCHMIED 1993; IAHC 2002). JAHNEL (1960) beschrieb Ekzeme an der Vorhautöffnung, nachdem der Haarpinsel und auch die kürzeren Haare radikal entfernt worden waren. Aus den selben Gründen warnten auch SALISBURY und VAN DENMARK (1961) sowie KORDTS (1963) davor, die Präputialbehaarung zu kurz abzuschneiden.

LASZCZKA (1964) und BUSCH et al. (1991) betonten die Bedeutung regelmäßiger Bewegung für Kondition und Gesundheit. Nach MEMPEL und RITTER (1954) sollen Zuchtbullen täglich über eine Strecke von etwa 5km bewegt werden. BUSCH et al. (1991) befürworteten die Verwendung von Bewegungskarussellen, in denen

erwachsene Bullen mindestens einmal wöchentlich für 20 Minuten ein Bewegungstraining absolvieren sollen. SASIMOWSKI (1987) berichtete von Stationen, in denen auf Bullen geritten wurde, um ihnen die nötige Bewegung zu verschaffen.

Pflegemaßnahmen im weiteren Sinne beinhalten auch Behandlungen gegen Pilzinfektionen, Ekto- und Endoparasiten sowie eine Fremdkörperprophylaxe durch das Einbringen von Käfigmagneten in die Vormägen (LARSON 1970). FISCHERLEITNER (1993) riet zur Durchführung von Wurmkuren im Abstand von 6 bis 12 Monaten.

2.4. Besamungsstationen

Der Aufbau von Besamungsstationen folgt weltweit ähnlichen Grundprinzipien und umfasst folgende Bereiche und Einrichtungen (BUSCH et al. 1991):

- Stallbereich:
 - Bullenställe mit Standhaltung und Boxen mit Auslauf
 - Bewegungskarussell
 - Lagerräume für Futter
 - Lagerräume für Materialien
 - Behandlungsraum
- Absamungsbereich:
 - Absam- oder Sprungraum
 - Warteraum für Bullen
 - Wasch- und Trockenraum für Bullen
- Laborbereich:
 - Feinlabor
 - Wasch- und Sterilisationslabor
 - Vaginenlabor
 - Containerraum

- Umkleide- und Lagerräume
- Spermadepot
- Spermalageraum
- Labor
- Stickstofftank
- Verwaltungsbereich

BUSCH et al. (1991) betonten, dass Besamungsstationen keinen Kontakt zu anderen Tierbeständen haben dürfen und nach einem **Schwarz-Weiß-Prinzip** geführt werden sollen. Der Weißbereich umfasst die Stalleinheiten, das Futterlager, den Absamungsbereich, den Wasch- und Vaginenraum und das Labor. Der Schwarzbereich beinhaltet die Versorgungs- und Verwaltungseinrichtungen. Für den Zugang zum Weißbereich ist eine Personenschleuse mit Umkleideräumen und Duscheinrichtungen vorzusehen. Die Produktionsräume dürfen nur mit Schutzkleidung betreten werden. Am Zugang zur Station müssen Möglichkeiten der Desinfektion für den Personen- und Fahrzeugverkehr vorhanden sein. Zum Schutz vor Schadtieren müssen entsprechende bauliche Maßnahmen sowie regelmäßige Bekämpfungsaktionen durchgeführt werden (BUSCH et al. 1991).

Anderen Autoren zufolge sind grundsätzlich keine Besucher in Stationen zugelassen und Futtermittel und Geräte, die in die Station verbracht werden sollen zuvor mindestens 48h gelagert oder mit UV-Licht bestrahlt werden (WENTINK et al. 2000).

2.4.1. Sprunghalle

Der Absamungsbereich hat folgende Bedingungen zu erfüllen (SCHAETZ 1963):

- neutrale Umgebung und ruhige Lage
- keine langen An- und Abmarschwege
- allernächste Nähe zum Samenlabor
- genügend Raum für die Bewegungsfreiheit von Mensch und Tier
- angenehmes Klima

- keine direkte Sonneneinstrahlung, Zugluft oder Staubentwicklung
- einfache und schnelle Reinigung

Die Absprungsfläche soll mindestens 2,5m x 3,5m messen und so angelegt sein, dass der Sprungpartner ebenfalls mit seinen Hinterbeinen auf der Sprungmatte steht (SCHAETZ 1963).

Nach KUPFERSCHMIED (1993) hat der Sprungplatz in einem geschlossenen Raum zu liegen und sollte mindestens 100 m², besser aber 150 m², groß sein. Der Autor empfahl eine Seite als Warteabteil und für die sexuelle Vorbereitung, die andere Seite zur Spermagewinnung zu nutzen.

Der Absamungsbereich muss Schutzeinrichtungen wie z.B. eine Reihe von Metallpfosten und starke Metallgitter, sowie Fluchtspalten aufweisen, die lediglich von Personen, nicht aber von Bullen passiert werden können (SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; SCHAETZ 1963; BUSCH et al. 1991, KUPFERSCHMIED 1993).

KUPFERSCHMIED (1993) empfahl die Wände des Sprungraumes zu kacheln oder mit abwaschbarer Farbe zu streichen und hob die Bedeutung eines rutschsicheren Bodenbelags hervor.

Bereits 1956 berichtete FINCHER, dass ein mögliches Ausrutschen während der Samengewinnung zu Schädigungen von Bändern und Gelenken und über die Entzündung des Femorotibial-Gelenks zur Deckunfähigkeit (Impotentia coeundi) des betroffenen Zuchttieres führen kann. Auch ALMQUIST (1978) riet von nicht rutschfestem Bodenbelag, wie Beton, ab. SCHAETZ (1963) nannte als mögliche Bodenbeläge groben Zementanstrich, Asphalt, Kokosflechten, sowie verschiedene Gummimatten und -teppiche.

Die Sprunghalle ist nach KUPFERSCHMIED (1993) täglich im Anschluss an die Samementnahme gründlich zu reinigen und zu desinfizieren.

2.4.2. Transport

WILLETT und LARSON (1953) konnten bei 36 Bullen, die per Zug oder Viehtransporter über 480 bis 1600 km transportiert worden waren, keine negativen Folgen für die Fruchtbarkeit feststellen. Transporte über 480 bis 3200 km führten bei 60 weiteren Bullen nicht zur Reduzierung der Non-Return-Raten im Zeitraum von zwei Monaten vor bis zwei Monaten nach dem Transport (WILLETT 1957). KUPFERSCHMIED (1993) empfahl die Verwendung stationseigener Fahrzeuge, die vom Personal der Besamungsstation zu reinigen und zu desinfizieren sind. Ein holländischer Betrieb setzte für Tiertransporte nur betriebseigene Fahrzeuge ein, die zudem mit virusdichten Filtern ausgestattet waren (WENTINK et al. 2000).

2.5. Spermagewinnung

Ein Ejakulat muss vollständig, unverändert, nicht verschmutzt und ohne Schädigung des Vatterieres gewonnen werden (GÖTZE 1949). Die Durchführung der Samengewinnung vom Bullen wurde u.a. von GÖTZE (1939), SALISBURY und VAN DENMARK (1961), SCHAETZ (1963), WENKOFF (1988), KRAUSE (1990); BUSCH et al. (1991) und KUPFERSCHMIED (1993) beschrieben.

2.5.1. Ausrüstung

2.5.1.1. Künstliche Scheiden

Der italienische Physiologe GUISEPPE AMANTEA stellte bereits 1914 die erste künstliche Scheide zur Absamung von Hunden vor. ROEMMELE (1926) und MILOWANOW (1934) entwickelten erste Modelle zur Anwendung beim männlichen Rind (nach: BUSCH et al. 1991). Seit dieser Zeit wurden zahlreiche Modifikationen beschrieben. Eine Auflistung der bekanntesten Typen findet sich bei SCHAETZ

(1963) und BUSCH et al. (1991). Künstliche Scheiden sollen bei der Absamung durch taktile und thermische Reize den Ejakulationsreflex auslösen (BÜCHLMANN 1950; TRAUTWEIN 1954; EIBL 1959). Nach BUSCH et al. (1991) soll der Innendruck der künstlichen Scheide etwa 5300,0 Pascal betragen bzw. einer 50-cm-Wassersäule entsprechen.

Empfehlungen bezüglich der Temperatur der künstlichen Scheiden unmittelbar vor der Samengewinnung gehen in der Literatur z.T. weit auseinander. Einige Werte sind in Übersicht 4 wieder gegeben.

Übersicht 4: Literaturangaben bezüglich der Temperatur (C°) der künstlichen Scheiden unmittelbar vor der Absamung

Quelle	Temperatur der künstlichen Scheide
GÖTZE (1939)	40°C
INEICHEN (1948)	42 – 45°C
WOLF (1949)	42°C
BÜCHLMANN (1950)	„körperwarm“ = 38°C
SALISBURY und VAN DENMARK (1961)	42 – 44 °C
SCHAETZ (1963)	41 – 42°C
KRAUSE (1966)	41 – 43°C
HAFS (1966)	40 – 56°C
ALMQUIST (1973)	60°C
WENKOFF (1988)	42 – 45°C
BUSCH et al. (1991)	40 – 42°C
KUPFERSCHMIED (1993)	38 – 42°C
ANZAR et al. (2002)	37°C

HAFS (1966) berichtete, dass bei Verwendung von 56°C warmen künstlichen Scheiden die Spermienkonzentration der gewonnenen Ejakulate signifikant höher war, als bei der Verwendung niedriger temperierter Vaginen.

SCHAETZ (1963) wies daraufhin, dass Temperaturen über 42°C spermaschädigend sind und sich Bullen sehr schnell an die höheren Temperaturen gewöhnen können und u.U. weitere Steigerungen verlangen. In solchen Fällen empfahl der Autor die Tiere für einige Wochen aus dem Absamungsbetrieb herauszunehmen und nach ausreichender Abstinenz wieder an Normaltemperaturen zu gewöhnen.

Um dem Penis beim Eindringen möglichst wenig Widerstand entgegenzusetzen, sollte unmittelbar vor der Verwendung auf die Mündung bis etwa 1/3 des vorderen Teiles der Vagina mit Hilfe eines Glasstäbchens ein steriles Gleitmittel aufgetragen werden (GÖTZE 1949; WOLF 1949; KUPFERSCHMIED 1993; BUSCH et al. 1991). Das Gleitmittel darf die Eigenschaften des Spermias nicht verändern und die Schleimhaut des Bullen nicht reizen (BUSCH et al. 1991). Früher wurden häufig Traganthschleim, Paraffinöl oder Spermaverdünner verwendet (GÖTZE 1949). Heute dagegen kommen überwiegend Vaseline oder wasserlösliche Verbindungen auf Propylenglykollbasis zum Einsatz (BUSCH et al. 1991).

Das Spermaauffangglas soll nach Ansicht einiger Autoren mit einer gepolsterten, angewärmten Hülle vor Kälte und mechanischen Schäden geschützt werden (GÖTZE 1939; SCHAETZ 1963; ALMQUIST 1973; KUPFERSCHMIED 1993).

BUSCH et al. (1991) forderten für jeden Bullen eigene künstliche Scheiden zu verwenden. Dies hielt KUPFERSCHMIED (1993) bei hygienisch optimalem Vorgehen für unnötig.

Reinigungsprotokolle für benutzte Vaginen finden sich u.a. bei BUSCH et al. (1991) und KUPFERSCHMIED (1993).

2.5.1.2. Elektroejakulation

Bei der Elektroejakulation erfolgt die Samenabgabe ohne sexuelle Erregung (SCHAETZ 1963). Das Ejakulationszentrum im Rückenmark wird direkt durch elektrischen Strom gereizt, oder es kommt infolge der elektrischen Reizung zur Kontraktion von samenableitenden Wegen und Bläschendrüsen (BUSCH et al. 1991). Frühe Arbeiten über diese Methode der Spermagewinnung von Bullen stammen u.a. von THIBAUT et al. (1948), DZIUK et al. (1954), MARDEN (1954), ROWSON und MURDOCH (1954), HILL et al. (1956) und ADLER (1961a). Ejakulate, die mit Hilfe von Elektroejakulatoren gewonnen wurden (E-Ejakulate), weisen größere Volumen und niedrigere Konzentrationen auf, als solche, die mit Hilfe von

künstlichen Scheiden gesammelt wurden (kS-Ejakulate). In der Gesamtmenge an Spermien pro Ejakulat gab es keine signifikanten Unterschiede (AUSTIN et al. 1961; FOSTER et al. 1970).

AUSTIN et al. (1961) stellten in E-Ejakulaten einen höheren Anteil vorwärts beweglicher Samenzellen fest. Diese Beobachtung konnten FOSTER et al. (1970) jedoch nicht bestätigen. Zwischen den Non-Return-Raten von E-Ejakulaten und kS-Ejakulaten wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (DZIUK et al. 1954; HILL et al. 1956).

Nach DZIUK et al. (1954), MARDEN (1954), und AUSTIN et al. (1961) löst der Einsatz von Elektroejakulatoren bei den Bullen keine negativen Assoziationen aus. Dem widersprachen LOGUE und GREIG (1987). Sie empfahlen Elektroejakulatoren „sparsam und human“ zu verwenden. SCHAETZ (1963) wies daraufhin, dass durch die Stromstöße reflektorische Streckstellungen bzw. Zuckungen ausgelöst werden können und riet dazu, die Hinterbeine der Tiere vor Durchführung der Elektromanipulation zu fixieren. CARROLL et al. (1963) beobachteten nach Anwendung von Elektroejakulatoren korkenzieherartige Verdrehungen des Penis einzelner Bullen. Die Autoren machten keine Angaben über die Häufigkeit oder Dauer der Veränderungen. AUSTIN et al. (1961) berichteten, dass kS-Ejakulate von Bullen, die zuvor mit Hilfe von Elektroejakulatoren abgesamt worden waren, eine deutlich reduzierte Anzahl Spermien enthielten. Erst drei bis vier Tage nach erfolgter Elektroejakulation konnten von allen Bullen wieder normale kS-Ejakulate gewonnen werden. Laut BUSCH et al. (1991) und KUPFERSCHMIED (1993) sollten Elektroejakulatoren nur bei erworbenen Deckproblemen (z.B. Deckunvermögen infolge eines Unfalls) eingesetzt werden.

CHENOWETH (1983) warnte vor dem Einsatz bei Bullen mit ungenügender Libido, da die Verbreitung der genetischen Eigenschaften solcher Bullen nicht einzuschätzende negative Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit der Rinder-Population haben könnte.

Schon GÖTZE wies 1949 darauf hin, dass die Voraussetzungen für eine einheitliche Beurteilung der Ejakulate bei der Verwendung von Elektroejakulatoren nicht gegeben sind.

2.5.2. Aufsprungtiere

Eine Vielzahl von Autoren hat sich mit der Frage beschäftigt, welche Sprungobjekte zur Samengewinnung von Bullen geeignet sind. Neben unbelebten Gegenständen (sog. Phantomen, siehe 2.5.3.) wurden auch lebende Tiere beiderlei Geschlechts auf ihre Eignung hin untersucht. Entscheidend für die Empfehlung männlicher oder weiblicher Aufsprungtiere, ist vor allem die Gewichtung der für die sexuelle Erregung von Bullen notwendigen Reize.

Dabei spielen nach übereinstimmender Auffassung zahlreiche Untersucher olfaktorische Reize eine große Rolle (HART et al. 1946; MEHRENS 1951; SAMBRAUS u. WARING 1975; GARCIA et al. 1986; BLAZQUEZ et al. 1988; RIVARD u. KLEMM 1990).

HAFS (1966) berichtete, dass Bullen eine kürzere Reaktionszeit aufwiesen, wenn als Sprungpartner östrische Kühe angeboten wurden und fand sowohl ein erhöhtes Ejakulatvolumen als auch eine gesteigerte Spermienzahl.

Andere Autoren waren dagegen der Ansicht, dass bei „Bos taurus“- Bullen vor allem optische Reize für die Auslösung der Paarungsbereitschaft verantwortlich sind (BONADONNA 1949; HALE 1966; WILLIAMSON et al. 1972; BLOCKEY 1978; CHENOWETH 1981; MADER u. PRICE 1984; WALLACH u. PRICE 1988; GEARY et al. 1991; GEARY u. REEVES 1992; PRESICCE et al. 1993).

Akustische und taktile Reize werden ebenfalls als wirksam angesehen, scheinen jedoch eine geringere Bedeutung zu haben (BÜCHLMANN 1950; GÖTZE 1954; SAMBRAUS u. WARING 1975; HOUPPT et al. 1989). Als visueller Schlüsselreiz dient die Hinteransicht eines Rindes, die einem Torbogen ähnelt. Aus diesem Grund wurde im deutschen Sprachgebrauch der Ausdruck „Torbogenreflex“ geprägt

(BÜCHLMANN 1950; HAFEZ 1960). Eine detaillierte Beschreibung der Paarungsreflexe gibt KRAUSE (1990).

Als Aufsprungpartner üben männliche und weibliche Tiere denselben stimulierenden Reiz aus (TRAUTWEIN 1954; ALMQUIST u. HALE 1956; LEIDL et al. 1968; AMANN u. ALMQUIST 1976). Nach Einschätzung vieler Untersucher löst nicht der Zyklusstand, sondern die Immobilisation des Sprungpartners das Aufsprungverhalten beim Bullen aus (SIGNORET 1975; AMANN u. ALMQUIST 1976; CHENOWETH et al. 1981, 1983; WALLACH u. PRICE 1988; GEARY et al. 1991; GEARY u. REEVES 1992).

GÖTZE (1954) bezeichnete das Stehenbleiben oder das nur kurzschrittige Bewegen ohne Abwehr als primären Schlüsselreiz.

PÜSCHEL (1974) befürwortete die Verwendung von Bullen als Sprungpartner, da sie besser als weibliche Tiere in der Lage sind, das Gewicht, insbesondere älterer Bullen, zu tragen. SCHAETZ (1963) berichtete, dass Kühe der Sprungbelastung nicht lange gewachsen waren und nach einiger Zeit akut oder chronisch im Bereich der Extremitäten, des Beckens oder der Wirbelsäule erkrankten. Eine starke Druckbelastung der Wachstumsfugen kann zu Gelenkschädigungen und degenerativen Erkrankungen führen (FOWLER u. KINGREY 1956; WHITE et al. 1984). Aus diesem Grund sprachen sich BARGAI und COHEN (1992) gegen die Verwendung 1 bis 2 Jahre alter Jungbullen als Aufsprungpartner aus.

Nach KUPFERSCHMIED (1993) soll bei Aufsprungbullen auf geeignete Größe und ruhiges Verhalten geachtet werden. Aus Gründen des Tierschutzes ist die Zahl der Aufsprungbullen so zu wählen, dass sie nach einigen Sprüngen gegen andere Bullen ausgetauscht werden können (KUPFERSCHMIED 1993).

Da die sexuelle Aktivität eines Bullen über einen längeren Zeitraum vom Grad neuer stimulierender Reize abhängt (HALE 1966), kann durch einen Wechsel des Sprungpartners bei manchen Bullen eine erhöhte Deckbereitschaft ausgelöst werden (ALMQUIST u. HALE 1956; HALE 1966; LEIDL et al. 1968).

2.5.3. Phantome

Als Phantome werden unbelebte Objekte bezeichnet, die dem „Torbogenschema“ entsprechen und als Sprunghilfe zur Samengewinnung beim Bullen verwendet werden können.

LEIDL et al. (1968) berichteten, dass lebende Aufsprungpartner gegenüber Phantomen bevorzugt wurden.

Nach Angaben anderer Autoren akzeptieren jedoch die meisten Bullen Phantome als Sprungpartner (GÖTZE 1939 u. 1954; BONADONNA 1949; EIBL 1959; CROMBACH 1961; HALE 1966; WIERZBOWSKI 1966; PÜSCHEL 1974; PFEILSTICKER 1975).

FÜHRER (2001) berichtete von Akzeptanzraten zwischen 2% und 90% und machte v.a. die Einstellung des an der Absamung beteiligten Personals für Erfolg oder Misserfolg verantwortlich.

Die Farbgebung und anatomische Übereinstimmung mit lebenden Rindern spielen bei der Verwendung von Phantomen nur eine untergeordnete Rolle, sofern der „Torbogen“ als visueller Schlüsselreiz vorhanden ist (BONADONNA 1949; BÜCHLMANN 1950; SAMBRAUS 1971).

Die Möglichkeit, Phantome aktiv zu bewegen und in ihre Höhe zu variieren, erwies sich als vorteilhaft (BÜCHLMANN 1950; PFEILSTICKER 1972, 1975; PÜSCHEL 1974).

Bezüglich der Akzeptanz durch verschiedene Altersgruppen liegen unterschiedliche Erfahrungen vor: Jüngere und wenig lebhaftere ältere Tiere verweigerten das Phantom häufiger oder ejakulierten nicht (GÖTZE 1939). Zwölf bis Vierzehn Monate alte Jungbullen besprangen lebende Partner mit eindeutiger Begattungsabsicht, zeigten aber nur ein geringes Interesse am Phantom (SAMBRAUS 1971). Dagegen konnten PÜSCHEL (1974) und PFEILSTICKER (1975) sexuell unerfahrene Jungbullen nach kurzer Eingewöhnungsphase zur regelmäßigen Samenentnahme am Phantom veranlassen. Ältere Bullen wiesen nach PFEILSTICKER (1975) mehrheitlich

vorübergehend sogar eine verstärkte Libido auf, wenn ihnen anstelle der lebenden Sprungpartner ein Phantom angeboten wurde.

Die Vorteile des Phantoms bestehen in einer besseren Absamungshygiene, dem geringeren Verletzungsrisiko für Absamungsbullen (Distorsionen, Paralyse des Nervus radialis, Knochenbrüche) und Samennehmer (Abwehrbewegungen des Standbullen), bei gleicher Qualität der gewonnenen Ejakulate (PÜSCHEL 1974).

Allerdings kann es bei der Samengewinnung von Jungbullen zu einer Unterbrechung der Reflexkette kommen, wenn sich die Tiere an zu breiten Phantomen beim Nachstoß nicht festklammern können (PFEILSTICKER 1975).

2.5.4. Absamungsmodus

Samengewinnungen sind entweder kurz vor der Fütterung oder 5 bis 6 Stunden danach durchzuführen (SCHAETZ 1963).

Die Absamungsbullen sollen sauber zur Samengewinnung geführt werden (KUPFERSCHMIED 1993). Bei starker Verschmutzung von Unterbauch und Präputialbereich, sind diese zu waschen, müssen aber zum Zeitpunkt der Samenentnahme wieder trocken sein (SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; SCHAETZ 1963; KUPFERSCHMIED 1993).

Ein gleichmäßiger und regelmäßiger Ablauf des ganzen Deckvorganges ist von größter Wichtigkeit für den Erfolg der Samengewinnung, da geringste Änderungen sich nachteilig auf das Verhalten der Bullen auswirken können (WOLF 1949). Deshalb müssen organisatorischer Ablauf sowie räumliche und zeitliche Gegebenheiten der Samengewinnung möglichst konstant bleiben (BONADONNA 1949; TRAUTWEIN et al. 1958; TRAUTWEIN 1959).

Andere Untersucher haben die Bedeutung neuer Reize oder Reizsituationen (z.B. Wechsel der Aufsprungtiere, gleichzeitiges Anbieten mehrerer Aufsprungpartner, Verlagerung des Absamungsortes) zur Aufrechterhaltung der Deckbereitschaft eines

Bullen über einen längeren Zeitraum hervorgehoben (ALMQUIST u. HALE 1956; HALE 1966; LEIDL et al. 1968).

Während des gesamten Vorganges der Samengewinnung müssen Bullen mit einer am Nasenring befestigten Führstange und einem am Halfter angebrachten Leitstrick gesichert werden (KORDTS 1963; SCHAETZ 1963; BUSCH et al. 1991).

2.5.4.1. Sexuelle Stimulation

Die ersten Ejakulate von Bullen weisen häufig wenig oder keine Samenzellen auf (LAGERLÖF 1934). MERCIER und SALISBURY (1946) fanden in den zweiten Ejakulaten, die wenige Minuten nach den ersten gewonnen wurden, einen höheren Anteil vorwärts beweglicher Spermien. In beiden Studien wurden die Bullen sofort nach Erblicken des Sprungpartners abgesamt, ohne dass eine weitere sexuelle Stimulation erfolgt war. Die Reaktionszeit, d.h. die Zeitspanne zwischen dem ersten Blickkontakt und dem ersten Aufsprung mit nachfolgender Ejakulation, stellte dabei den limitierenden Zeitfaktor dar.

Für die Gewinnung qualitativ und quantitativ hochwertiger Ejakulate ist nach übereinstimmender Ansicht vieler Untersucher die sexuelle Stimulation des Bullen vor der Samenentnahme von entscheidender Bedeutung (SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; ALMQUIST 1973, 1978; PFEILSTICKER 1975; AMANN u. ALMQUIST 1976; JANSEN 1984).

HALE und ALMQUIST (1960) definierten die sexuelle Vorbereitungszeit als Verlängerung der Reaktionszeit. Die Vorbereitungszeit beschreibt demnach die Zeitspanne, in der der Bulle bereits aufspringen und ejakulieren würde, aber vom Tierpfleger aktiv daran gehindert wird. Unter Stationsbedingungen umfassen die am häufigsten angewendeten Maßnahmen die Durchführung eines oder mehrerer „Blindsprünge“, bei denen der Bulle zwar auf den Sprungpartner aufspringt, der Penis aber seitlich abgeleitet wird und keine Ejakulation erfolgt, sowie das

Zurückhalten des Bullen vor bzw. zwischen den einzelnen Sprüngen und die Anbindung in Sichtkontakt zum jeweiligen Sprungpartner.

HELLSTRÖM (1947) gelang es, größere Ejakulatvolumen zu gewinnen, nachdem die Bullen vor der Samenentnahme einige Minuten am Aufspringen gehindert, bzw. zurückgehalten worden waren. Durch 2–10minütiges Zurückhalten konnten auch andere Untersucher eine signifikante Erhöhung der Samenzellen pro Ejakulat erzielen (COLLINS et al. 1951; HALE u. ALMQUIST 1960; HAFS et al. 1962).

HAFS et al. (1962) und HAFS (1966) berichteten von positiven signifikanten Beziehungen zwischen der Anzahl an Spermien pro Ejakulat und der Dauer der sexuellen Stimulation bzw. der Anzahl durchgeführter Blindsprünge. Dabei hatte die Dauer der sexuellen Vorbereitung größeren Einfluss als die Zahl der Blindsprünge.

Eine Reihe von Autoren empfahl bestmögliche Kombinationen von Blindsprüngen und „Rückhalte- bzw. Wartezeiten“ (COLLINS et al. 1951; BRANTON et al. 1952; SCHÄFER 1961; PÜSCHEL 1974; PFEILSTICKER 1975; AMANN u. ALMQUIST 1976; ALMQUIST 1978, 1982; LORTON et al. 1984). Die angegebenen Zeitspannen liegen zwischen 2 und 8 Minuten und die Anzahl empfohlener Blindsprünge zwischen 1 und 3.

In einer Untersuchung von ALMQUIST und HALE (1956) führte das Anbieten verschiedener Aufsprungpartner in unterschiedlichen Umgebungen zu einer schnelleren geschlechtlichen Erregung. Ebenso gelang es, das sexuelle Interesse durch gleichzeitiges Anbieten mehrerer Aufsprungpartner zu erhöhen (ALMQUIST 1978).

PÜSCHEL (1974) und PFEILSTICKER (1975) betonten den positiven Effekt einer Selbststimulierung der Bullen durch wechselseitige Reizung vor der Samenentnahme. Hierbei kam es zwischen den Bullen zur sog. Genitalkontrolle mit Beriechen der Genitalorgane, gegenseitigem Belecken und eventuellem Harnkosten. Außerdem zeigten Bullen ein gesteigertes sexuelles Interesse, wenn sie andere Bullen beim Aufsprung beobachteten (MADER u. PRICE 1984, PRICE 1987) oder – in geringerem Maße – wenn sie selbst während des Aufsprunges von anderen Bullen beobachtet wurden (MADER u. PRICE 1984).

VANDEPLASSCHE und SPINCEMAILLE (1967) konnten bei unerfahrenen Bullen ein sich schnell entwickelndes sexuelles Interesse feststellen, nachdem diese durch weibliche Tiere besprungen worden waren.

Ein Jungbulle, bei dem zuvor alle anderen Verfahren fehlgeschlagen waren, wurde erfolgreich abgesamt, nachdem die Kuppenpartie des Aufsprungpartners mit Melasse bestrichen worden war (FOOTE et al. 1993).

2.5.4.2. Absamungshäufigkeit

Im Natursprung sind Bullen zu einer hohen Zahl von Kopulationen pro Zeiteinheit fähig. Als maximale Anzahl wurden innerhalb von 6 Stunden 77 (ALMQUIST u. HALE 1956), innerhalb von 24 Stunden 83 (WIERZBOWSKI 1966) und innerhalb von 30 Stunden 101 (FARIN et al. 1978) Begattungen genannt. Allerdings sinken mit zunehmender Ejakulationsfrequenz Qualität und Volumen der Ejakulate. In Erschöpfungstests fanden ALMQUIST und HALE (1956) sowie BOYD und VAN DENMARK (1957) einen allmählichen Abfall im Ejakulatvolumen nach der dritten Absamung und einen deutlichen Abfall in der Ejakulatkonzentration bereits nach der zweiten Absamung. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch LEIDL et al. (1968).

Für rinderzüchtende Betriebe ist die Gewinnung möglichst vieler Besamungsportionen von einem genetisch überlegenen Vatertier in kürzester Zeit von großer Bedeutung. Die Frage, wie häufig ein Bulle abgesamt werden kann, ist seit den Anfängen der künstlichen Besamung Gegenstand intensiver Diskussion und zahlreicher Untersuchungen. Es finden sich daher sehr viele Veröffentlichungen über die optimale Absamungsfrequenz. Allgemein ist festzustellen, dass im Laufe der Zeit zunehmend kürzere Abstände zwischen einzelnen Samengewinnungen empfohlen wurden.

Frühe Studien postulierten bei gesteigerter Absamungsfrequenz eine abnehmende Fruchtbarkeit der gewonnenen Ejakulate (DAWSON 1938; LASLEY u. BOGART

1943). Dies wurde jedoch von anderen Autoren nicht bestätigt (PATRICK et al. 1949).

Bei Bullen, die über einen längeren Zeitraum 6 bis 7 Mal pro Woche abgesamt worden waren, wurden keine negativen Auswirkungen auf den Anteil normaler Samenzellen (HAFS et al. 1959; MARTIG u. ALMQUIST 1969), Gefrierfähigkeit (HAFS et al. 1959; MARTIG et al. 1966; CUNNINGHAM et al. 1967; ALMQUIST u. AMANN 1976) und Fruchtbarkeit (HAFS et al. 1959; MARTIG u. ALMQUIST 1969) festgestellt.

Bei steigender Absamungsfrequenz nimmt das Volumen der Ejakulate ab und der Anteil beweglicher Spermien leicht zu (BRATTON u. FOOTE 1954; BRATTON et al. 1954; HAFS et al. 1959; ALMQUIST u. CUNNINGHAM 1967; CUNNINGHAM et al. 1967; ALMQUIST u. AMANN 1976; EVERETT et al. 1978; ALMQUIST 1982). In jeder einzelnen Studie gelang es mit der jeweils höchsten untersuchten Absamungsfrequenz die größtmögliche Ausbeute an Samenzellen pro Zeiteinheit zu gewinnen.

Ein Absamungsregime mit einer Absamung an jedem Tag oder zwei bis drei Absamungen innerhalb eines Tages im Abstand von drei bis vier Tagen erbringt die beste Spermienausbeute (AMANN u. ALMQUIST 1976).

In einer Langzeitstudie, in der 18 Bullen vom 1. bis 7. Lebensjahr entweder einmal oder sechs Mal pro Woche abgesamt worden waren, wurde festgestellt, dass die Gesamtzahl an gewonnenen Spermien durch die höhere Absamungsfrequenz um das 3,2fache gesteigert werden konnte (ALMQUIST 1982). Die hohe Frequenz hatte keine negativen Einflüsse auf Spermaqualität, Bullenwachstum und Fruchtbarkeit. Schlachtkörper der Bullen, die zuvor sechsmal wöchentlich abgesamt worden waren, zeigten nicht mehr Wirbelsäulendefekte, als die Schlachtkörper der Bullen, von denen nur einmal wöchentlich Samen gewonnen worden war.

Bei zwei unterschiedlichen Absamungsregimen für erwachsene Holsteinbullen, bei denen die Tiere entweder an drei Tagen pro Woche je zwei Mal oder an zwei Tagen pro Woche je drei Mal abgesamt wurden, bestand kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl gewonnener Spermien und der Anzahl vorwärtsbeweglicher

Samenzellen (LORTON et al. 1984). Die pro Samenentnahme benötigte Zeit war annähernd gleich.

2.6. Spermauntersuchung und –beurteilung

Seit Einführung der künstlichen Besamung beim Rind wird durch zahlreiche verschiedene Tests versucht, eine Aussage über die Befruchtungsfähigkeit der einzelnen Tiere bzw. Ejakulate zu treffen. Zur fertilitätsdiagnostischen Bedeutung spermatologischer Befunde liegt daher eine umfangreiche Literatur vor, die als „enormous in volume, often confusing and certainly frustrating“ beschrieben werden kann (SAACKE 1982). Das Spektrum der Aussagen über eventuelle Zusammenhänge zwischen einzelnen oder mehreren Spermamerkmalen und der Befruchtungsfähigkeit des Ursprungsejakulates oder des Spendertieres erstreckt sich von „keinerlei Beziehung“ bis zu „hochsignifikanter Korrelation“.

Viele Untersucher stimmen darin überein, dass es kein Samencharakteristikum gibt, das alleine zur Vorhersage der männlichen Fruchtbarkeit geeignet ist (GÖTZE 1949; BUCKNER et al. 1954; EIBL 1959; SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; KRAUSE 1966; LINFORD et al. 1976; UWLAND 1984; LOGUE u. GREIG 1987; AMANN u. HAMMERSTEDT 1993; ANZAR et al. 2002).

Beweiskräftige Beziehungen zwischen Sameneigenschaften und Befruchtungsergebnissen sollen häufig im negativen Sinn vorhanden sein, d.h. hochgradige Veränderungen oder das Fehlen bestimmter Spermamerkmale führen zur Unfruchtbarkeit (BUSCH et al. 1991). Als Beurteilungsgrundlage sollen Mindestanforderungen dienen, die auf systematisch ermittelten Ergebnissen basieren.

Mit Hilfe konventioneller Spermienanalysen können unfruchtbare oder „subfertile“ Tiere, d.h. solche mit reduzierter Fruchtbarkeit, identifiziert werden (AMANN u. HAMMERSTEDT 1993).

Um den hohen Anforderungen an die Qualität der Besamungsportionen gerecht werden zu können, sind verlässliche Untersuchungsmethoden nötig (CHRISTENSEN et al. 2001).

Richtlinien zur Beurteilung von Sperma wurden in Deutschland erstmals 1949 von GÖTZE veröffentlicht und seitdem von verschiedenen Autoren modifiziert und erweitert. Im Folgenden wird auf traditionelle und neuere Methoden eingegangen. Ausgenommen sind chemische, biochemische und mikrobiologische Untersuchungsmethoden sowie In-vitro-Befruchtungstests, da sie in der täglichen Arbeitsroutine von Besamungsstationen keine Rolle spielen und bestenfalls in spezialisierten Laboratorien durchgeführt werden können. Angesichts der überaus großen Zahl an Veröffentlichungen ist es nicht möglich, eine vollständige Literaturübersicht zu geben.

2.6.1. Makroskopische Untersuchungen: Aussehen, Geruch und Volumen

Der makroskopische Befund eines Ejakulates hängt von der Anzahl an Spermien pro Milliliter (Dichte), Anteil und Beschaffenheit der akzessorischen Sekrete und etwaiger Beimengungen, wie Blut, Eiter oder Schmutzpartikeln ab (BUSCH et al. 1991). Bullensperma soll grauweiß bis elfenbeinfarben und nahezu geruchslos sein (BUSCH et al. 1991, KUPFERSCHMIED 1993).

Um weiter verarbeitet zu werden, hat das Volumen mindestens 2ml (UWLAND 1984; BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993) bis 3ml (LOGUE u. GREIG 1987) zu betragen. KRAUSE (1990) forderte Volumen von 2ml für Jungbullen und 4ml für über 2 Jahre alte Tiere. Da das spezifische Gewicht von Sperma größer als das von Wasser ist, soll das Ejakulatvolumen durch Division des Gewichtes durch den Faktor „1,07 g/ml“ errechnet werden (CHRISTENSEN et al. 2001). KUPFERSCHMIED (1993) dagegen bestimmte das Volumen durch direktes Ablesen des graduierten Auffangglases.

2.6.2. Mikroskopische Untersuchungen

2.6.2.1. Spermienkonzentration

Die Spermienkonzentration eines Ejakulates wird von äußeren Faktoren wie Fütterung, Vorbereitung und Durchführung der Samenentnahme, jahreszeitlichen Schwankungen (BUSCH et al. 1991) sowie genetischen Faktoren (MÜLLER et al. 1971) beeinflusst. LASLEY und BOGARD (1943), BRANTON et al. (1951) und SCHMIDT (1963) fanden statistisch gesicherte, positive Korrelationen zwischen der Ejakulatdichte bzw. -konzentration und den jeweiligen Befruchtungsergebnissen. Auch BRATTON et al. (1956) sahen in der Ejakulatdichte in Verbindung mit dem Gehalt an abnormalen Samenzellen, ein geeignetes Hilfsmittel für die Voraussage der Befruchtungskapazität eines Ejakulates.

Die Dichte eines Ejakulates soll nach LOGUE und GREIG (1987) mindestens 300 und nach UWLAND (1984) und KUPFERSCHMIED (1993) mindestens 600 Millionen Spermien pro Milliliter betragen.

BUSCH et al. (1991) wiesen darauf hin, dass für die andrologische Beurteilung und die Verdünnung der Ejakulate im Rahmen der Spermakonservierung verlässliche Werte nötig sind. Daher muss die Spermienkonzentration eines Ejakulates möglichst exakt bestimmt werden. Folgende Methoden werden als hinreichend genau betrachtet:

Zählkammer:

Die Verwendung von Zählkammern zur Konzentrationsbestimmung von Sperma wurde von WALTON et al. (1947) beschrieben. Benutzt werden dieselben Zählkammern wie zum Auszählen von Blutkörperchen (nach Thoma, Schilling, Bürker u.a.). Eine ausführliche Beschreibung des Untersuchungsganges findet sich bei BUSCH et al. (1991).

Die Formel zur Berechnung der Spermiedichte aus der Gesamtzahl ausgezählter Samenzellen lautet (HALLMANN 1955):

$$D (10^6/\text{mm}^3) = A / (\text{ausgezählte Fläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnungsgrad})$$

(A = Gesamtzahl ausgezählter Spermien; $D \times 1000 =$ Dichte $10^6/\text{ml}$)

Photometer:

Photometer ermitteln die Konzentration, indem sie die Trübung einer in einem bestimmten Verhältnis verdünnten Spermaprobe messen und den ermittelten Wert mit einer Eichkurve vergleichen, die zuvor mit Hilfe einer Zählkammer oder eines Partikelzählgerätes bestimmt wurde (AX et al. 1988). Nach SALISBURY et al. (1943) und FOOTE (1972) liefern Photometer bei Konzentrationsbestimmungen von Rindersperma ausreichend akkurate Werte. Die Trübung des Seminalplasmas hat keinen Einfluss auf die Messgenauigkeit (Al MAKHZOUMI et al. 1975; MÜLLER u. BRANDL 1978).

Partikelzählgeräte:

In Partikelzählgeräten werden Spermien beim Durchfluss durch eine Kapillare elektronisch gezählt; Verdünnungsgrad des Spermas und verwendetes Verdünnermedium sind standardisiert (KUPFERSCHMIED 1993). Partikelzählgeräte zeichnen sich durch einfache Handhabung, hohe Messgenauigkeit und geringen Zeitaufwand aus (BUSCH et al. 1991). PACE et al. (1981) fanden zwischen den Ergebnissen von Zählkammern, Photometern und Partikelzählgeräten hohe positive Korrelationen.

Durchflusszytometer („Flow Cytometer“):

Durchflusszytometer können pro Sekunde Tausende von Zellen objektiv analysieren und werden zur Untersuchung verschiedener Eigenschaften von Spermien eingesetzt. Dabei werden die Samenzellen zunächst mit fluoreszierenden Farbstoffen (sog. Fluoreszenzmarker) behandelt, die sich in verschiedenen Zellorganellen oder -kompartimenten einlagern bzw. anreichern können. Wenn die Fluoreszenzmarker durch Licht einer bestimmter Wellenlänge angeregt werden, kommt es zur Emission von Strahlung, die umso größer ist, je mehr Farbstoffmoleküle in der Zelle vorhanden sind. Das optische Signal wird vom Gerät

durch Photorezeptoren aufgefangen, in ein elektrisches Signal umgewandelt, verstärkt und ausgewertet.

EVENSON und BALLACHEY (1988) verwendeten Durchflusszytometer zur Bestimmung der Spermienkonzentration. EVENSON et al. (1993) benutzten die Fluoreszenzmarker Acridin Orange (AO) bzw. Propidium Jodid (PI). Beide Farbstoffe gehen Verbindungen mit der DNS ein und werden durch Licht einer Wellenlänge von 488nm angeregt. PI färbt die Zellkerne **toter** bzw. **membrangeschädigter** Zellen fluoreszierend rot, indem es sich zwischen die Basenpaare der DNS einlagert (KRISHAN 1975). Die Wellenlänge der von AO emittierten Strahlung hängt davon ab, ob der Farbstoff an doppel- oder einzelkettige Nukleinsäuremoleküle gebunden wird (siehe 2.6.3.3.). Als Referenzwert diente EVENSON et al. (1993), die von einer bekannten Menge fluoreszierender Kontrollpartikel („beads“) nach entsprechender Erregung abgegebene Strahlung. Die Spermienkonzentration der untersuchten Probe wurde aus dem Verhältnis der von den Samenzellen und von den „beads“ emittierten Strahlungsmengen errechnet. GARNER et al. (1994) und CHRISTENSEN et al. (2001) kombinierten PI mit SYBR-14 (*FertiLight™* Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon), das im Unterschied zu PI die Zellmembranen **lebender** Spermien durchdringen kann, mit der DNA reagiert und bei Anregung mit Licht der Wellenlänge von 488nm eine hellgrün fluoreszierende Strahlung (518nm) abgibt. Durch diese Kombination kann neben der Konzentration auch die Lebensfähigkeit der einzelnen Samenzellen einer Spermaprobe untersucht werden (siehe auch 2.6.4.2.). CHRISTENSEN et al. (2001) berichteten von einer guten positiven Korrelation zwischen den Konzentrationsergebnissen von Durchflusszytometern und Makler-Zählkammern.

2.6.2.2. Spermienbewegungen

Bei der Untersuchung und Beurteilung von Spermienbewegungen wird zwischen Massenbewegung und Einzelbewegung unterschieden. Einzelbewegungen

umfassen orts-, kreis- und vorwärts bewegliche Samenzellen. Entscheidend ist der Anteil vorwärts beweglicher Spermien.

2.6.2.2.1. Massenbewegung

Als Massenbewegung wird die, durch Konzentration und Vitalität der Samenzellen bedingte und unter dem Mikroskop sichtbare, wellenförmige Bewegung der Gesamtheit der Spermien bezeichnet (KUPFERSCHMIED 1993). Beschreibungen zur Durchführung der Untersuchung und Einteilung der Befunde finden sich u.a. bei LOGUE und GREIG (1987), WENKOFF (1988), BUSCH et al. (1991), KRAUSE (1990) und KUPFERSCHMIED (1993). Nach Forderung der Autoren soll Sperma guter Qualität eine lebhafte Massenbewegung aufweisen. Bei einer Spermienkonzentration unter 750 Millionen pro cm^3 besteht die Gefahr, dass die Massenbewegung zu niedrig eingeschätzt wird (WENKOFF 1988).

2.6.2.2.2. Vorwärtsbewegung (Motilität)

Die Vorwärtsbewegung oder Motilität ist das am häufigsten verwendete Kriterium zur Spermabeurteilung (STALHAMMAR et al. 1994; DEN DAAS 1997).

Die Motilität gibt den Prozentsatz der Samenzellen an, der sich aktiv vorwärts bewegt; ortsbewegliche Spermien und solche mit kreisenden Bewegungen, werden nicht einbezogen (KUPFERSCHMIED 1993). Die Durchführung der subjektiven Schätzung der Motilität wird von vielen Autoren beschrieben (u.a. WENKOFF 1988; LOGUE u. GREIG 1987; BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993).

Die Spermienbeweglichkeit hängt vom verwendeten Verdünner, Verdünnungsgrad, Temperatur zum Untersuchungszeitpunkt und der Zeitspanne zwischen Gewinnung und Beurteilung ab (DEN DAAS 1997). Als Mindestanforderungen wurden Werte von 50% (LOGUE u. GREIG 1987), 60% (BUSCH et al. 1991), 65 % (Anzar et al. 2002) und 70% (KUPFERSCHMIED 1993) genannt.

Wie bei allen spermatologischen Merkmalen, gehen die Einschätzungen bezüglich der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der erhobenen Befunde weit auseinander:

LASLEY und BOGART (1943) fanden keine Korrelation zwischen der Bewegungsaktivität der Spermien und der Fertilität. Dagegen bezeichneten INEICHEN (1948) und CEMBROWICZ (1952) die Motilität als den wichtigsten Parameter bei der Spermauntersuchung und berichteten von einem direkten Zusammenhang mit der Fruchtbarkeit. Nach SULLIVAN und ELLIOTT (1968) benötigten Bullen mit niedriger Fertilität einen höheren Anteil vorwärts beweglicher Spermien, um ihr maximales Fruchtbarkeitsniveau zu erreichen, als Bullen mit hoher Fertilität.

Andere Untersucher maßen der Motilität hingegen nur eine sehr geringe bis keine Aussagekraft über das Befruchtungspotential bei (BUDWORTH et al. 1988; STALHAMMAR et al. 1994; DEN DAAS 1997; CHRISTENSEN et al. 1999).

STALHAMMAR et al. (1994) konnten bei Untersuchungen von Samenproben von 117 Jungbullen, von denen jeweils mindestens 100 Besamungen durchgeführt worden waren, nur eine niedrige Korrelation zwischen den visuell geschätzten Motilitäts-Werten von Frischsperma bzw. von aufgetauten Besamungsportionen und den nach DEN DAAS (1992) korrigierten Non-Return-Raten (NR-Raten) feststellen. Die Motilität war lediglich für 1% der Variation der NR-Rate verantwortlich. Die Autoren empfahlen auch Ejakulate mit weniger als 50% vorwärts beweglichen Spermien zu Besamungsportionen zu verarbeiten, da Bullen selbst bei fraglichen Motilitätsergebnissen eine gute Befruchtungsfähigkeit besitzen könnten.

CHRISTENSEN et al. (1999) fanden signifikante Beziehungen zwischen den NR-Ergebnissen und der Motilität frisch gewonnener Ejakulate, sowie der Auftaumotilität. Die Autoren wiesen aber daraufhin, dass die mikroskopische Untersuchung der Spermienmotilität subjektiv und ungenau war und daher keine zufrieden stellende Vorhersage der Fruchtbarkeit zuließ.

SAACKE et al. (1994) und DEN DAAS (1997) klassifizierten Motilität als „compensative semen trait“, da ein zu geringer Prozentsatz beweglicher Spermien durch die Verwendung von mehr Samenzellen in den Besamungsdosen

ausgeglichen werden kann. Dem widersprachen CHRISTENSEN et al. (1999), nach deren Erfahrungen eine niedrigere Motilität nicht kompensierbar ist. Die Autoren vermuteten in einem niedrigen Prozentsatz motiler Spermien einen Indikator für andere Funktionsstörungen des betreffenden Ejakulates.

In Übersicht 5 sind die Mindestanforderungen an die Motilität von Samenzellen in frisch gewonnenen Ejakulaten zusammenfassend dargestellt.

Übersicht 5: Mindestanforderungen an vorwärts bewegliche Samenzellen von Bullen in frischen Ejakulaten (%):

Quelle	Anteil motiler Spermien (%)
LOGUE und GREIG (1987)	50
BUSCH et al. (1991)	60
KUPFERSCHMIED (1993)	70
ANZAR et al. (2002)	65

Neben der subjektiven Schätzung des Anteils vorwärts beweglicher Spermien besteht von jeher das Bemühen, objektive Methoden zur Bestimmung von Motilität und verschiedenen anderen Bewegungsparameter zu entwickeln. RIKMENSPOEL und VAN HERPEN (1957) berichteten von der Verwendung photographischer Mehrfachbelichtungen („Multiple exposure photography“). ROTHSCILD (1953) untersuchte die Spermienmotilität mit Hilfe von Photoserien im Dunkelfeld (nach: REVELL u. WOOD 1978). Anhand sog. „photomikrographischer“ Aufnahmen gelang es an aufeinander folgenden Bildern bewegliche von unbeweglichen Spermien zu unterscheiden. Die von ELLIOTT et al. (1973) beschriebene Methode setzte ein klares Verdünnungsmedium voraus (nach: REVELL u. WOOD 1978). REVELL und WOOD (1978) dagegen gelang es, die Beweglichkeit von Samenzellen auch in aufgetauten Besamungsportionen zu bestimmen, bei denen ein optisch dichtes Verdünnungsmedium verwendet worden war.

Später wurden computergestützte Videoanalysen von Spermienbewegungen (Videomikrographie-Systeme) von einer Reihe von Arbeitsgruppen beschrieben (RIEMKE u. LEIDL 1985; RATH et al. 1987; BUDWORTH et al. 1987, 1988). Neben der Vorwärtsbeweglichkeit wurden dabei auch die Spermienkonzentration der

untersuchten Probe, die Geschwindigkeit der Samenzellen und verschiedene Bewegungsmuster (z.B. seitliche Kopfbewegungen) erfasst. Bei Verwendung des Cellsoft Analyse Systems stabilisierten sich die Aussageunterschiede unter 3%, wenn die Motilitätsbestimmung bei 140 Zellen, die Geschwindigkeitsanalyse bei 120 Zellen und die Konzentrationsbestimmung bei 160 Zellen durchgeführt wurden (RATH et al. 1987).

WIEDERMANN et al. (1991) berichteten von Erfahrungen mit dem Cell-Motion-Analyser-System (SM-GMA 4.3). In aufgetauten Besamungsportionen mit eidotterhaltigem Verdünner lagen dabei die effektiven Anteile motiler Spermien auch bei optimaler Parameterwahl regelmäßig über den vom Computer gemessenen Werten.

2.6.3. Morphologische Untersuchungen

2.6.3.1. Allgemeine morphologische Untersuchungen

LAGERLÖF (1934) führte eine differenzierte Spermienauszählung zur Erfassung abnormer Samenzellen ein. Später wurden morphologische Defekte von einer Vielzahl anderer Autoren beschrieben und in Gruppen unterteilt (u.a. KRAUSE 1966; LEIDL et al 1971; WENKOFF 1988; KUPFERSCHMIED 1993).

Im Allgemeinen werden primäre, sekundäre und tertiäre Defekte unterschieden. Primäre Veränderungen haben ihre Ursache in Störungen der Spermatogenese, sekundäre treten im Verlauf der Nebenhodenpassage auf und tertiäre können durch unsachgemäße Spermagewinnung und –verarbeitung entstehen (BUSCH et al. 1991).

Ungefärbte Spermien können durch eine Formaldehyd- (HANCOCK 1956; HARASYMOWYCZ et al. 1976) oder eine Glutaraldehydlösung (SAACKE u. MARSHALL 1968; JOHNSEN et al. 1976; WHEELER u. SEIDEL 1989) fixiert und mit Phasenkontrast- oder Interferenzkontrast-Mikroskopen im Ölimmersionssystem bei

800facher Vergrößerung morphologisch beurteilt werden (BUSCH et al. 1991). Die Flüssigfixation ist speziell für die Beurteilung des Akrosoms geeignet (KUPFERSCHMIED 1993).

Zur Färbung von Spermien bzw. bestimmter Zellstrukturen wurden eine Reihe von Methoden bzw. Farbstoffen entwickelt:

- Karbol-Eosin-Methode (WILLIAMS 1920; LAGERLÖF 1934)
- Opalblau-Methode (LAGERLÖF, 1934)
- Karbol-Fuchsin-Eosin-Methode (COFFIN, 1945)
- Eosin-Nigrosin (HANCOCK 1956)
- Metachromgelb und Victoriablau (KARRAS 1950, 1954; KÖRDEL 1959)
- Methylenazur, Methylenblau, Methylenviolett und Eosin (Färbung nach GIEMSA: SAACKE u. MARSHALL 1968; DIDION et al. 1989)
- Naphtol-Gelb S und Erythrosin B (BRYAN u. AKRUK 1977)
- Bengal-Rot und Bismark-Braun (TALBOT u. CHACON 1981)
- Anilinblau und Kristallviolett (FARELLY nach: PAUFLER et al. 1974)

Auf die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe wird in den Kapiteln 2.6.3.2., 2.6.3.3., 2.6.4.2. und 2.6.4.3. eingegangen.

Die Empfehlungen bezüglich der pro Präparat auszuzählenden Spermien reichen von 200– 400 (KUPFERSCHMIED 1993), über 400 (KRAUSE 1966; BUSCH et al. 1991) bis zu 500 (SÖDERQUIST et al. 1991).

Obwohl ein hoher Anteil abnormaler Samenzellen (50% oder mehr) mit schlechten Befruchtungsergebnissen verbunden ist (CEMBROWICZ 1952) und zwischen den Spermien fertiler und infertiler Bullen morphologische Differenzen bestehen (HANCOCK 1959), können unterschiedliche Befruchtungsergebnisse fertiler Besamungsbullen nicht mit den – innerhalb des Normalbereiches stets vorhandenen – Variationen in der Spermienmorphologie in Beziehung gesetzt werden (HANCOCK 1959).

Morphologische Befunde erlauben keine Aussage über die Fertilität des untersuchten Ejakulates (PACE et al. 1981), sondern liefern lediglich eine Art „Fingerabdruck“ der ejakulierten Spermien und der Funktionsfähigkeit der Hoden (SÖDERQUIST et al. 1991).

Trotz dieser beschränkten fertilitätsdiagnostischen Aussagekraft werden in der Literatur Grenzwerte bezüglich des maximal zulässigen Anteils (%) abnormaler Samenzellen in Ejakulaten genannt. Einige davon sind in Übersicht 6 dargestellt.

Übersicht 6: Maximal zulässige Anteile an abnormalen Spermien im Ejakulat (%)

Quelle	Max. (%)	Anmerkung
ROLLINSON (1951)	20	Kopfanomalien < 7%
KORIATH et al. (1955)	30	
MUNRO (1961)	23	
AEHNELT et al. (1964)	20	
UWLAND (1984)	20	
LOGUE und GREIG (1987)	30	Kopf- und Mittelstückanomalien < 20%
WENKOFF (1988)	18-20	
BUSCH et al. (1991)	20	Kopfanomalien < 5% Akrosomdefekte < 10%
KUPFERSCHMIED (1993)	18-20	
		Proximale Zytoplasmotropfen < 2 bis 3% Akrosomdefekte < 10%

2.6.3.2. Kopfkappe (Akrosom)

Einige Arbeitsgruppen beschrieben hohe positive Korrelationen zwischen dem Zustand bzw. Status des Akrosoms (intakt oder geschädigt) und der relativen Befruchtungsfähigkeit des jeweiligen Ejakulates (SAACKE u. WHITE 1972; SAACKE et al. 1980; BRACKETT 1983).

UWLAND (1984) zufolge erbrachte die unmittelbar nach dem Auftauen von Besamungsportionen durchgeführte Untersuchung der Akrosomenintegrität eine bessere Aussage über die Befruchtungsfähigkeit des Ejakulates, als die ebenfalls sofort durchgeführte Bestimmung der Motilität.

Dagegen stellten CUMMING (1995) und BERGER (1996) keine Korrelation zwischen dem Prozentsatz unbeschädigter Akrosomen eines Ejakulates und dessen In-vivo-Befruchtungsfähigkeit fest.

DEN DAAS (1997) wiederum fand, dass Bullen deren Ejakulate sich nach dem Auftauen der Besamungsportionen durch einen hohen Anteil an lebensfähigen Spermien mit intaktem Akrosom und nach einem Kapazitationstest durch einen niedrigen Anteil an Spermien mit einer Akrosomenreaktion auszeichnen, vergleichsweise niedrige Spermiodosen benötigen, um maximale Besamungsergebnisse zu erzielen.

Die Kopfkappen boviner Samenzellen können mit Hilfe von Phasenkontrast- oder Interferenzkontrastmikroskopen an fixierten, ungefärbten Präparaten untersucht werden (siehe 2.6.3.1.). Die Beurteilung der Akrosomenintegrität anhand von Nass-Präparaten („wet preparations“) mit Phasen-Kontrast-Mikroskopen (PURSELL et al. 1972) oder besser mit Interference-Kontrast-Mikroskopen (SAACKE u. MARSHALL 1968) ist nach HARASYMOWYCZ et al. (1976) genauer als die Beurteilung von gefärbten Präparaten.

Auch WOELDERS (1991) favorisierte die Untersuchung der Kopfkappen an ungefärbten, fixierten Präparaten, da Färbemethoden häufig mit einer Reihe von Wasch- oder Zentrifugationsschritten verbunden sind, bei denen es zum Verlust von Spermien u. damit zu einer Veränderung der untersuchten Probe gegenüber der Ausgangspopulation kommen kann.

Färbungen unter Verwendung einzelner Farbstoffe, die sich auf das Akrosom beschränken oder Kombinationsfärbungen zur Kontrastverstärkung wurden von einer Reihe von Autoren erarbeitet bzw. modifiziert (KARRAS 1950, 1954; KÖRDEL 1959; SAACKE u. MARSHALL 1968; BRYAN u. AKRUK 1977; TALBOT u. CHACON 1981; DIDION et al. 1989).

Daneben wurde auch die Anwendung fluoreszierender Farbstoffen beschrieben:

TALBOT und CHACON (1980), TÖPFER-PETERSEN und SCHILL (1983) und CROSS et al. (1986) berichteten über die Verwendung von Lectinen als geeigneten Fluoreszenzmarkern.

CROSS et al. (1986) kombinierten Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-konjugiertes „Pisum sativum“-Agglutinin (PSA), das intakte Akrosomen anfärbt, mit dem fluoreszierenden Kernfarbstoff Hoechst 33258 (H33258), mit dessen Hilfe die Lebensfähigkeit von Spermien beurteilt werden kann (siehe auch 2.6.4.2.).

GRAHAM et al. (1990) und GRAHAM (1994) benutzten FITC-PSA in Kombination mit Propidium Jodid (PI) und Rhodamin 123 (R123). Durch diese Dreifachkombination konnten neben dem Zustand des Akrosoms (FITC-PSA) auch Spermien-Viabilität (PI) und Funktionsstatus spermaler Mitochondrien (R123) beurteilt werden (siehe auch 2.6.4.2.).

Indirekte Immunfluoreszenz-Techniken zur Kopfkappen-Untersuchung bei verschiedenen Tierarten haben SUAREZ et al. (1986), MOORE et al. (1987) sowie CROSS und MEINZEL (1989) beschrieben.

2.6.3.3. Chromatinstruktur

Bereits BISHOP (1964) vermutete, dass eine verminderte Fruchtbarkeit auf Schäden im Genom der Samenzellen beruhen kann.

EVENSON et al. (1980, 1985) entwickelten einen Test zur Untersuchung der Chromatinstruktur von Spermien („sperm chromatin structure assay“, SCSA). Dabei wird davon ausgegangen, dass es als Folge von Störungen der Spermatogenese oder anderer negativer Einflüsse, in Samenzellen zu einer Störung der Kernkondensation, d.h. einer erhöhten Heterogenität der Chromatinstruktur und damit verbunden zu einer verminderten Fruchtbarkeit kommt (EVENSON et al. 1980; BALLACHEY et al. 1986). Je höher der Grad der Heterogenität, umso empfänglicher

soll die jeweilige Samenzelle bzw. ihre DNS gegenüber Säure- oder Hitzedenaturierungen sein. Der Test misst diese Empfänglichkeit, indem nach gezielter Denaturierung, der Anteil von doppel- und einzelsträngiger DNS bestimmt wird.

Möglich wird dies durch die Verwendung von Durchflusszytometern („Flow Cytometer“) und Akridin Orange (AO), einem metachromatischen Farbstoff, der bei Anregung durch Licht einer Wellenlänge von 488nm fluoreszierende Emissionen zeigt. Nachdem die Zellmembranen, durch im Versuchsmedium enthaltene Verbindungen (Triton X-100), permeabel gemacht wurden, dringt AO in die Samenzelle ein und lagert sich an die Nukleinsäuremoleküle an.

Handelt es sich hierbei um doppelsträngige Nukleinsäureketten, so zeigt sich bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488nm eine grüne Fluoreszenz (515-530nm). Wenn der Farbstoff an einzelsträngige Nukleinsäureketten angelagert wurde, ist die Fluoreszenz rot (>600nm). Da normale, ausgereifte Samenzellen so gut wie keine RNS enthalten (MONESI 1965, 1971), gibt der Chromatin-Struktur-Test durch die Intensität der Rot- bzw. Grün-Fluoreszenz den Anteil von einzel- bzw. doppelsträngiger DNS an.

Spermien, die keine bzw. nur eine sehr geringe Heterogenität der Chromatinstruktur aufweisen, zeichnen sich durch eine entsprechend geringe Empfänglichkeit gegenüber Denaturierungen aus und zeigen deshalb nach Färbung mit AO lediglich eine grüne Fluoreszenz (EVENSON u. MELAMED 1983).

Bei abnormaler Chromatinstruktur treten dagegen vermehrt einzelsträngige Nucleinsäureketten auf und das Fluoreszenzspektrum verschiebt sich von grün (native DNS) nach rot (denaturierte DNS).

Die zahlenmäßige Bestimmung des Verhältnisses von roter und grüner Fluoreszenz kann nach der Formel „ $\alpha_t = \text{rote Fluoreszenz} / \text{rote plus grüne Fluoreszenz}$ “ erfolgen (DARZYNKIEWICZ et al. 1975).

Der SCSA hilft bei der Erkennung unfruchtbarer oder subfertiler Bullen und von Ejakulaten mit schlechter Qualität (EVENSON et al. 1980; BALLACHEY et al.

(1987,1988). Die eindeutige Identifikation von Ejakulatproben hoher Qualität gelingt dagegen nicht (KARABINUS et al. 1991).

ANZAR et al. (2002) benutzten Fluoreszenzmarker und Durchflusszytometer zur Untersuchung apoptotischer Samenzellen. Sie verwendeten hierzu den in Kapitel 2.6.4.3. erläuterten FITC-AnnexinV/PI-Test und untersuchten außerdem die Chromatinstruktur von Spermien in frischen Ejakulaten und aufgetauten Besamungsportionen.

Im Verlauf der Apoptose, d.h. des programmierten Zelltodes, kommt es im Zellkern durch spezifische Endonukleasen zur Abspaltung von etwa 180-Basenpaaren langen DNS-Fragmenten. Der Test beruht auf der Fähigkeit einen Fluoreszenzmarker an das 3'-OH-Ende der DNS-Fragmente zu binden und diese dadurch in Durchflusszytometern messen zu können (sog. TUNEL-Test: APO-BRDU Kit; Chemicon International Inc., Temecula, Canada).

ANZAR et al. (2002) fanden zwischen der Fruchtbarkeit der Bullen und dem im TUNEL-Test ermittelten Anteil apoptotischer Zellen im frischen Ejakulat eine negativ signifikante Korrelation. In aufgetauten Besamungsportionen war ein deutlicher Abfall der apoptotischen Zellen zu beobachten. Die Autoren vermuteten, dass die von GRAVANCE et al. (1998) beschriebene „Überkondensation“ („overcondensation“) der DNS durch die Gefrierkonservierung, dazu geführt hatte, dass die 3'-OH-Enden der DNS-Fragmente den Fluoreszenzmarker-Molekülen nicht länger zugänglich waren.

2.6.4. Vitalitätsuntersuchungen

2.6.4.1. Lebend-Tot-Tests

Zur Differenzierung lebender und toter Samenzellen werden i.d.R. Eosin-Zitrat-Lösungen empfohlen, die nur tote und absterbende, nicht aber lebende Spermien intensiv rot färben. Der Test beruht auf der Tatsache, dass Zellmembranen toter

Spermien strukturelle Schäden aufweisen und die Fähigkeit Farbstoffmoleküle des Eosins an der Penetration zu hindern, verloren haben (CORREA u. ZAVOS 1994). Zur besseren Kontrastierung verwendeten LASLEY et al. (1942) Opalblau und HANCOCK (1956) Nigrosin.

Pro Ausstrich sollen 200 (BUSCH et al. 1991) bis 500 (KRAUSE 1966) Samenzellen ausgezählt werden.

Der Anteil lebender Spermien soll in frischen Ejakulaten mindestens 75% betragen (BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993).

2.6.4.2. Lebensfähigkeit (Viabilität)

Nach ELLIOTT (1978) besteht zwischen der Anzahl lebensfähiger Spermien in einer Besamungsportion und deren Befruchtungspotential eine lineare Beziehung.

JUONALA et al. (1998, 1999) fanden bei Besamungsversuchen mit Ebern signifikante positive Korrelationen zwischen der Lebensfähigkeit der Samenzellen und den Befruchtungserfolgen (bestimmt über Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen).

CHRISTENSEN et al. (2000a) berichteten von einer engen positiven Korrelation zwischen der mit Durchflusszytometern bestimmten Lebensfähigkeit von Spermien und den NR-Raten der jeweiligen Ejakulate. Nach Angaben von CHRISTENSEN et al. (2000b) und KNUDSEN et al. (2001) war die Korrelation zwischen Lebensfähigkeit und Befruchtungsfähigkeit signifikant besser als die Korrelation zwischen Motilität und Befruchtungsfähigkeit.

ANZAR et al. (2002) berichteten von einer signifikanten positiven Korrelation zwischen der Fruchtbarkeit der Bullen und dem durch den FITC-AnnexinV/PI-Test ermittelten Anteil lebensfähiger Samenzellen in Frischejakulaten.

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit („Viability“, Viabilität) werden häufig fluoreszierende Farbstoffe verwendet, die durch Licht bestimmter Wellenlängen angeregt werden können. Färbungen mit Fluoreszenzmarkern können mit Hilfe von Fluoreszenz-Mikroskopen oder Durchflusszytometern („Flow Cytometer“) ausgewertet werden.

EVENSON et al. (1982) beschrieben die kombinierte Verwendung von Ethidium Bromid, das in lebensfähige Spermien nicht eindringen kann, und Rhodamin 123 (R123), das Membranen lebender Zellen penetriert und intakte Mitochondrien anfärbt. Beide Färbungen werden mit Licht der Wellenlänge von 488nm aktiviert. Die Autoren fanden, dass Ethidium Bromid ein verlässlicher Indikator für die Integrität von Zellmembranen war, aber die Funktionsfähigkeit von Mitochondrien durch Färbungen mit R123 nicht zuverlässig bestimmt werden konnte.

GARNER et al. (1986, 1988) und WATSON et al. (1992) schlugen eine Kombinationsfärbung aus Propidium Jodid (PI) und Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA) vor. PI färbt die Zellkerne toter oder membrangeschädigter Zellen fluoreszierend rot, indem es sich zwischen die Basenpaare der DNS einlagert (KRISHAN 1975). CFDA kann in lebende Zellen eindringen und wird dort enzymatisch in eine grün fluoreszierende Verbindung umgewandelt, die intakte Membranen nicht mehr passieren kann und daher im Inneren der Zellen eingeschlossen bleibt. Zur Erregung wird Licht einer Wellenlänge von 514nm verwendet. Grün fluoreszierende Samenzellen ohne Rotfärbung des Zellkernes wurden von den Autoren als lebensfähig eingestuft.

KEELER et al. (1983) führten Untersuchungen mit Durchflusszytometern durch und verwendeten dabei die Bis-Benzimidazol Färbung Hoechst 33342 (H33342), die bei 351,1 und 363,8nm aktiviert wird. Diese Methode ermöglichte es, zwischen lebenden (schwach fluoreszierende) und toten (stark fluoreszierende) Spermien zu unterscheiden.

ERICSSON et al. (1989) färbten Samenzellen mit Hydroethidin und Carboxyl-Dimethyl-Fluorescein-Diacetat (CMFDA). In lebensfähigen Zellen wird Hydroethidin enzymatisch zu Ethidium umgewandelt, das sich in den Zellkern einlagert und bei Erregung mit Licht der Wellenlänge von 485 nm rot fluoresziert. CMFDA wird ähnlich

wie CFDA in lebensfähigen Spermien in eine nicht-membrangänge Verbindung umgewandelt.

GRAHAM et al. (1990) und GRAHAM (1994) benutzten PI um tote Zellen anzufärben, sowie Fluorescein-Isothiocyanat(FITC)- konjugiertes „Pisum sativum“-Agglutinin (PSA) zur Färbung von intakten Akrosomen und kombinierten die beiden Farbstoffe mit R123, um gleichzeitig den Zustand der Mitochondrien untersuchen zu können. Im Gegensatz zu EVENSON et al. (1982) bezeichneten sie die Verwendung von R123 als verlässliche Möglichkeit der Mitochondrien-Beurteilung.

DE LEEUW et al. (1991) fixierten Samenzellen zunächst mit Glutaraldehyd und färbten sie anschließend mit Hoechst 33258 (H33258; Calbiochem, LaJolla, CA). H33258 penetriert geschädigte Zellmembranen und bindet sich an die DNS. Wird der Farbstoff mit UV-Licht bestrahlt, so fluoresziert er blau. Da die Fluoreszenz nur bei gleichzeitiger Bindung an DNS-Moleküle zu beobachten war, trat nur eine sehr geringe Hintergrundfärbung auf. Durch Untersuchung der Präparate im Phasenkontrast- und Fluoreszenz-Mikroskop konnten neben der Lebensfähigkeit der Spermien auch deren Akrosomen beurteilt werden.

WOELDERS (1991) setzten H33258 ohne Fixierung der Spermien ein und waren so in der Lage, neben der Membranintegrität auch die Motilität der Zellen zuverlässig zu untersuchen.

ERICSSON et al. (1993) sowie THOMAS und GARNER (1994) verwendeten eine Dreifachkombination aus PI, R123 und CMFDA.

GARNER et al. (1994) sowie GARNER und JOHNSON (1995) demonstrierten, dass die Kombination von PI mit SYBR-14 (*FertiLight*[™] Kit, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) eine schnelle und gute Unterscheidung von lebenden und toten Samenzellen in frischen und aufgetauten Proben ermöglichte. SYBR-14 färbt die DNS lebender Spermien und emittiert bei Anregung durch Licht der Wellenlänge von 488nm eine hellgrün fluoreszierende Strahlung (518nm). Neben den Populationen mit roter oder grüner Fluoreszenz, trat eine dritte Gruppe auf, die beide Farben zeigte. Hierbei handelte es sich um sterbende oder geschädigte Zellen, deren Membranen die Fähigkeit verloren hatten, PI am Eindringen in die Samenzelle zu hindern. Die Vorteile dieser Kombinationsfärbung liegen nach Angaben der Autoren

in der schnellen Durchführung (15min), der Anregbarkeit des SYBR-14-Fluoreszenzmarkers durch sichtbares Licht (im Gegensatz zu UV-Licht bei anderen Farbstoffen wie z.B. H33342 und H33258), dem Fehlen von Hintergrundverfärbungen und Artefakten (wie bei R123 und CMFDA, aufgrund von extrazellulären Esterasen) und der Möglichkeit die Verschiebung einer Spermienpopulation vom Grün – (SYBR-14, lebend) in den Rot- (PI, tot)- Bereich am mikroskopischen Präparat beobachten und gleichzeitig die Motilität beurteilen zu können.

In einer späteren Studie zeigten GARNER et al. (1997), dass mit Hilfe der Doppelfärbung mit SYBR-14/PI durch die Bestimmung des Anteils lebensfähiger Samenzellen vor und nach dem Gefriervorgang, eine Aussage über die Gefrierfähigkeit des Spermas eines Bullen getroffen werden konnte. Eine genaue Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit war aber auf Basis der gefundenen Ergebnisse nicht möglich.

Im Gegensatz dazu fanden CHRISTENSEN et al. (2000a) hohe positive Korrelationen zwischen den Ergebnissen der SYBR-14/PI-Kombinationsfärbung und den NR-Raten der untersuchten Ejakulate.

2.6.4.3. Programmierter Zelltod (Apoptose)

ANZAR et al. (2002) untersuchten unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern und Durchflusszytometern den Anteil apoptotischer Spermien in frischem und aufgetautem Sperma. Als strukturelle Indikatoren der Apoptose, d.h. des programmierten Zelltodes, dienten die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Zellmembran und das gehäufte Vorliegen von etwa 180-Basenpaaren langen DNS-Fragmenten (siehe auch Kapitel 2.6.3.3.).

Die Translokation von PS-Molekülen wurde mit Hilfe von FITC konjugiertem AnnexinV bestimmt (FITC-AnnexinV). AnnexinV ist ein Protein, das eine hohe Affinität zu PS besitzt und durch die Konjugation mit FITC als Fluoreszenzmarker eingesetzt werden kann. Der Test-Kit (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit;

Pharming Canada, Mississauga, ON) enthält außerdem PI zur Differenzierung lebender und toter Samenzellen.

Nach Angaben der Autoren erbringt der FITC-AnnexinV/PI-Test präzisere und verlässlichere Ergebnisse, als der SYBR-14/PI-Test (GARNER u. JOHNSON 1995), da letzterer nicht zwischen apoptotischen und lebenden Zellen differenziert, weil beide – im Gegensatz zu toten, d.h. nekrotischen Zellen - über eine intakte Zellmembran verfügen. Die durch den FITC-AnnexinV/PI-Test ermittelten Werte für die Lebensfähigkeit lagen deshalb unter denen des SYBR-14/PI-Testes. Es bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen dem, mit Hilfe des den FITC-AnnexinV/PI-Testes ermittelten, Anteil lebensfähiger Samenzellen in Frischejakulaten und den Befruchtungsergebnissen (NR-Raten) der Bullen.

In aufgetauten Besamungsportionen zeigte der FITC-AnnexinV/PI-Test bis zu 40% mehr apoptotische Zellen als in Frischsperma. Die Gesamtzahl toter Spermien sank um etwa 18% ab. Die Autoren vermuteten, dass tote Spermien bereits im Frischsperma schwache und durchlässige Plasmamembranen aufwiesen und während des Gefrier- und Auftauvorganges auseinander gebrochen waren. Gleichzeitig fiel der Anteil lebensfähiger Samenzellen um 10 – 20%, wobei sich die Samenzellen einzelner Tiere als unterschiedlich empfindlich erwiesen.

2.6.5. Resistenztests

2.6.5.1. Thermoresistenztests (TRTs)

Thermoresistenztests (TRTs) dienen der Erhärtung gewisser Befunde, wie z.B. der Vorwärtsbewegung und der Kopfkappenintegrität. Hierbei werden frische oder aufgetaute Spermaproben entweder bei 5°C oder 30°C bis 38°C inkubiert und in 1 bis 1,5-stündigem („30-38°C-Proben“) oder 24-stündigem Abstand („5°C“-Proben) Motilität bzw. Morphologie beurteilt.

Eine Reihe von Autoren fanden hochsignifikante positive Korrelationen zwischen den Ergebnissen der TRTs und den NR-Raten (PICKETT et al. 1961; ROUSSEL et al. 1963; DIMITROPOULOS 1967; SAACKE u. WHITE 1972).

KRAUSE (1966) empfahl TRTs bei unverdünnten und verdünnten Spermaproben bis zum Erlöschen aller Bewegungsäußerungen auszudehnen. Nach UWLAND (1984) hatte die Bestimmung der Motilität im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation bei 5°C die höchste Aussagekraft über die Fruchtbarkeit des untersuchten Ejakulates. BUSCH et al. (1991) forderten, dass Bullensperma nach 72-stündiger Inkubation bei 5°C eine Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 70% aufweisen soll.

Übersicht 7 gibt einige Literatur-Angaben bezüglich der Inkubationsdauer und -temperatur von TRTs wieder.

Übersicht 7: Thermoresistenztests: Dauer (h) und Temperatur (°C)

Quelle	Dauer (h)	Temperatur (°C)
PICKETT et al. (1961)	5	37-38
ROUSSEL et al. (1963)	5	37-38
DIMITROPOULOS (1967)	5	38
KRAUSE (1966)	s.o.	37
KRAUSE (1966)	s.o.	5
PACE et al. (1981)	1,5	37
PACE et al. (1981)	3	37
UWLAND (1984)	4	38
UWLAND (1984)	24	5
BUSCH et al. (1991)	5-8	38
BUSCH et al. (1991)	168	5
KUPFERSCHMIED (1993)	3	37
DEN DAAS (1997)	5	30
DEN DAAS (1997)	24	5

2.6.5.2. Osmotische Resistenztests (ORTs)

Osmotische Resistenztests (ORTs) werden teilweise auch als hypoosmotische Stress- oder Schwellungstests bezeichnet und dienen der Untersuchung der Membranintegrität von Samenzellen. ORTs beruhen auf dem von DREVIUS und ERIKSSON (1966) demonstrierten Befund, dass Spermien mit einer intakten Zellmembran in einem hypoosmotischen Medium anschwellen, Spermien mit einer geschädigten Zellmembran dagegen nicht.

Die Befunde können subjektiv durch Spermienauszählung am mikroskopischen Präparat erhoben werden. Daneben wurden von SMITH und GRAHAM (1976) sowie DEIBEL et al. (1978) elektronische Methoden zur objektiven und genauen Bestimmung des Anteils geschwollener Samenzellen innerhalb einer Spermienpopulation vorgestellt.

BREDDERMAN und FOOTE (1969) berichteten, dass bei Frischsperma der Anteil der Samenzellen, die in hypotoner Salzlösung Schwellungen zeigten, in positiver Korrelation zu den NR-Raten derselben Ejakulate stand.

REVELL und MRODE (1994) führten ORTs an Frischsperma und aufgetauten Besamungsportionen bei 35°C unter Verwendung verschieden molarer Lösungen unter Einhaltung unterschiedlich langer Inkubationszeiten durch. Als am besten für Frischsperma erwiesen sich Inkubationslösungen mit 150 mOsm/kg und für aufgetaute Besamungsportionen in Milchverdünner Inkubationslösungen mit 100 mOsm/kg, sowie Inkubationszeiten von 20 bis 40 Minuten. Bei höherer Osmolarität blieb ein Teil der Spermien vorwärtsbeweglich was die Auszählung der Samenzellen erschwerte. Bei niedriger Osmolarität kam es durch Rupturen von Zellmembranen zu Verfälschungen der Ergebnisse. Erfasst wurden Samenzellen, die eine Schwellung des Spermischwanzes und eine Restaktivität im Mittelstück aufwiesen. Die Frischsperma-Befunde waren nicht mit den NR-Raten korreliert. Dagegen konnten die Autoren zwischen den Ergebnissen der aufgetauten Besamungsportionen und den bereinigten NR-Raten derselben Ejakulate eine hoch positive Korrelation feststellen. Weil die ORT-Ergebnisse zwischen den einzelnen Ejakulaten eines

Bullen stark schwankten, empfahlen die Autoren von jedem Ejakulat jeweils mehrere Besamungsportionen zu untersuchen.

CORREA und ZAVOS (1994) fanden, dass sich ORTs besser als Eosinfärbungen zur Untersuchung der Spermienmembranen eigneten. Dabei gelang es ihnen, in hypoosmolaren Lösungen mit 100 mOsm/kg die höchste Anzahl an geschwollenen Samenzellen zu identifizieren. Inkubationszeit und –temperatur betragen 60 min und 37°C. Die Autoren berichteten von hohen positiven Korrelationen zwischen dem Anteil motiler Spermien und dem Anteil in ORTs anschwellender Samenzellen. Ebenso bestanden hohe positive Korrelationen zwischen dem Anteil Spermien mit intakter Zellmembran (bestimmt durch Eosinfärbungen) und dem Anteil in ORTs anschwellender Samenzellen.

ANZAR et al. (1997) verwendeten bei der Bestimmung der osmotischen Widerstandskraft von aufgetauten Besamungsportionen ebenfalls eine Inkubationslösung von 100 mOsm/kg. Die Inkubationszeit betrug allerdings nur 10 Minuten.

2.6.6. Fremdzellengehalt und andere Beimengungen

Unter diesem Oberbegriff werden alle Elemente zusammengefasst, die bei der Phasenkontrast-mikroskopischen Untersuchung von Nativpräparaten aus frischem, unverdünntem Sperma neben den Samenzellen und ihren Teilen nachzuweisen sind (KRAUSE 1966). Dazu gehören: Vorstufen der Samenzellen, Spermiphagen, Epithelzellen, Erythrozyten, Leukozyten, Schmutzpartikel und Ektoparasiten.

Zur Einstufung der erhobenen Befunde verwendete KRAUSE (1966) den von WAGENER (1956) vorgeschlagenen Schlüssel.

Zur Untersuchung können Ausstriche nach Hitzefixation mit Methylenblau gefärbt werden (LOGUE u. GREIG 1987).

Fremdzellen entstammen zu 80% der Spermiogenese und sind auch in normalen Ejakulaten enthalten (KUPFERSCHMIED 1993). Wenn der Anteil der Spermiogenesezellen den Grenzwert von einer Zelle je 500 Spermien überschreitet, ist von einem krankhaften Zustand auszugehen (KUPFERSCHMIED 1993).

2.7. Spermaverarbeitung

2.7.1. Tiefgefriersperma

2.7.1.1. Konfektionierung

POLGE und ROWSON (1950) berichteten über die Verwendung von Glasampullen zur Spermaportionierung mit anschließender Gefrierkonservierung auf CO₂-Trockeneis bei -79°C (nach: BUSCH et al. 1991).

NAGASE et al. (1958) portionierten Sperma in Form von Pellets auf CO₂-Trockeneisplatten. Die hergestellten Pellets wurden bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert und vor Durchführung von Besamungen in einem Flüssigmedium aufgetaut und nachverdünnt (nach: BUSCH et al. 1991).

ADLER (1961b) konfektionierte verdünntes Sperma in Plastikröhrchen und setzte flüssigen Stickstoff zum Tiefgefrieren der Portionen ein. Praxisreife erlangten diese Methoden nach Modifikationen französischer Wissenschaftler (CASSOU 1964, 1965, 1967, 1968; CASSOU u. PERRET 1971; JONDET 1964, 1965).

Die von CASSOU entwickelten sog. „französischen Pailletten“ bestehen aus Polyvinylchlorid und weisen in einem Ende einen Baumwollstopfen auf, in dessen Mitte sich eine Schicht aus Polyvinyl-Alkohol-Puder befindet. Bei Kontakt mit Flüssigkeit verfestigt sich der Stoff und verschließt so das Ende der Paillette (sog. Dochtverschluss). Bei der Samenübertragung dient dieser Stopfen als Kolben zum

Ausstoßen des Spermas. Das zweite Ende wird zusammengepresst und mit Hilfe von Ultraschall verschlossen.

In Deutschland wurde von SIMMET (1972) ein alternatives System entwickelt. Hier werden beide Enden des Plastikröhrchens durch Glas- oder Metallkugeln versiegelt.

Die verschiedenen Konfektionierungsmethoden: Pellet – Glasampulle – Plastikröhrchen (bzw. –paillette) wurden von einer Vielzahl von Autoren miteinander verglichen. PICKETT und BERNDTSON führten 1974 eine umfangreiche Literaturrecherche durch und kamen dabei zu folgenden Schlussfolgerungen:

- In Plastikröhrchen eingefrorene Spermaportionen erbrachten vergleichbare oder bessere Konzeptionsraten als solche in Glasampullen. In 11 von 16 Studien lag die durchschnittliche NR-Rate für „Plastikröhrchen-Sperma“ höher als für „Glasampullen-Sperma“.
- Für optimale Befruchtungserfolge waren bei der Pellet- und der Paillettenmethode etwa gleich viele Spermien je Besamungsdosis nötig.
- Sperma, das in Plastikröhrchen eingefroren wurde, überlebte genau so lange oder länger als in Glasampullen eingefrorenes Sperma.
- Die Konfektionierung in Plastikröhrchen bot im Vergleich zur Verwendung von Ampullen bessere Lagermöglichkeiten.
- Mit 0,25ml-Pailletten gelang es, genau so gute oder bessere Befruchtungsergebnisse zu erzielen als mit größer volumigen Pailletten.
- Plastikröhrchen mit einem nicht absorbierendem Verschlussmechanismus ermöglichten bei der Besamung das Einbringen eines höheren Anteils Spermien in den weiblichen Geschlechtstrakt.
- Pailletten waren leichter als Pellets zu kennzeichnen bzw. zu identifizieren und zeichneten sich durch ein vergleichsweise niedriges Kontaminationsrisiko aus.

BUSCH et al. (1991) nannten weitere Vorteile der Konfektionierung in Plastikröhrchen bzw. Pailletten:

- Im Gegensatz zur Verwendung von Pellets war keine Nachverdünnung erforderlich.

- Die Vergrößerung der Oberfläche des einzufrierenden Spermias bot eine optimale Gefriereschwindigkeit.
- Beim Gefrieren und Lagern der Spermaportionen konnte das selbe Kühlmedium (flüssiger Stickstoff) verwendet werden. Es erfolgte kein Wechsel des Mediums, wie bei der Herstellung von Pellets und Ampullen, die zunächst auf CO₂-Trockeneis tiefgefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Nach KUPFERSCHMIED (1993) haben die vielfältigen Vorteile der Plastikpailletten bzw. -röhrchen zu einer nahezu vollständigen Verdrängung der Glasampullen und Pellets geführt. Letztere beiden Verfahren werden deshalb in den folgenden Kapiteln nicht gesondert besprochen.

2.7.1.2. Anzahl der Spermien pro Besamungsportion

Nach Durchführung von Besamungsversuchen mit Tiefgefriersperma empfahlen STEWART und BENNETT (1968) 5 Millionen, FOOTE und KAPROTH (1997) und GARNER et al. (1997) 10 Millionen, UWLAND (1984) 15 Millionen, KUPFERSCHMIED (1985, 1993) 15 bis 25 Millionen und HUNTER (1968) 20 Millionen Spermien pro Besamungsdosis. SCHENK et al. (1987) beobachteten eine verminderte Fruchtbarkeit bei Besamungen mit weniger als 11 Millionen Spermien.

Einige Autoren befürworteten eine Minimaldosis von 10 Millionen motilen Spermien pro aufgetauter Besamungsportion für maximale Befruchtungsergebnisse (SULLIVAN u. ELLIOT 1968; PACE et al. 1981; SCHENK et al. 1987; AMANN 1989; GERARD u. HUMBLOT 1991).

Der Anteil beweglicher Samenzellen pro Besamungsdosis wurde von DEN DAAS (1997) nur dann als wichtig erachtet, wenn die einzelnen Dosen weniger als 10 Millionen bewegliche Spermien enthalten.

Eine Übersicht der Ergebnisse aus 30 Veröffentlichungen findet sich bei FEARON und WEGENER (2000). Anhand der analysierten Gesamt-Daten verglichen die Autoren 5 verschiedene mathematische Modelle, mit deren Hilfe die Fertilität auf

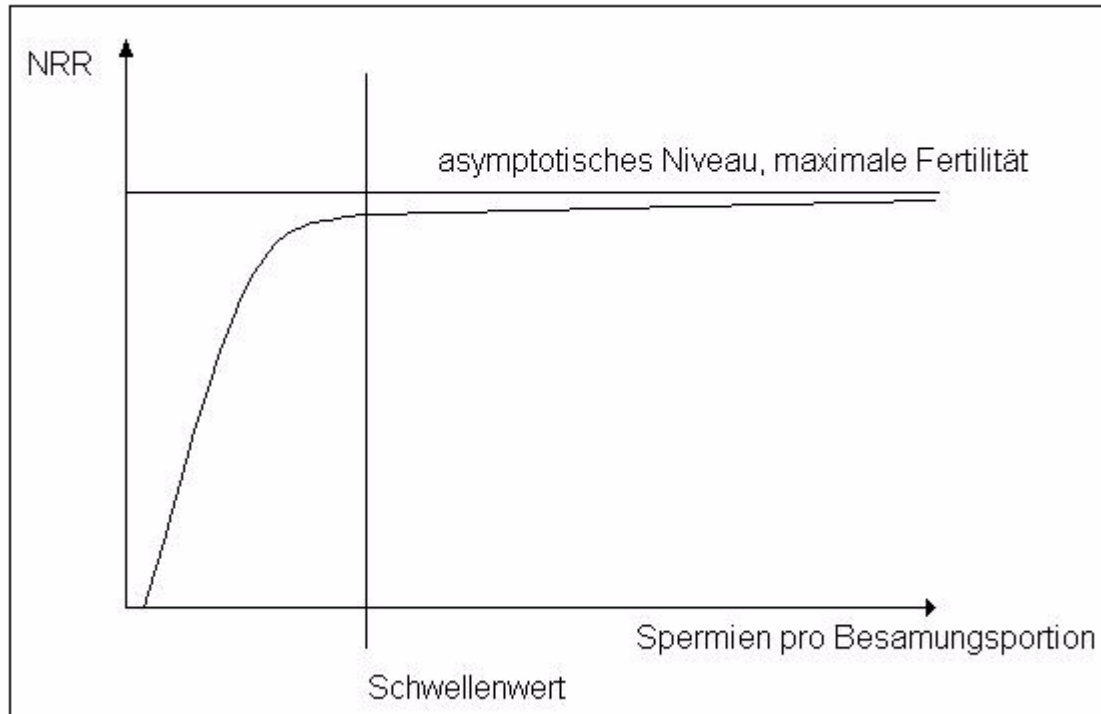
Basis der Anzahl übertragener Spermien geschätzt werden konnte. Mathematische Formeln wurden auch von VAN DUIJN (1965), SCHWARTZ et al. (1981) und PACE et al. (1981) erarbeitet.

Nach übereinstimmender Ansicht einer Vielzahl von Autoren kann der Zusammenhang zwischen der Spermienzahl und den Non-return-Ergebnissen (NR-Ergebnissen) wie folgt beschrieben werden (SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; SULLIVAN u. ELLIOTT 1968; SAACKE 1982; AMANN u. HAMMERSTEDT 1993; DEN DAAS 1992, 1997):

Wird in einem Achsenkreuz die Beziehung zwischen den NR-Ergebnissen (y-Achse) und der Spermienzahl pro Besamungsdosis (x-Achse) dargestellt, so zeigt die Funktionskurve zunächst einen steilen Anstieg, d.h. die Erhöhung der Samenzellen pro Dosis führt zu einer Zunahme der Befruchtungsergebnisse. Jenseits eines Schwellenwertes nimmt die Kurve dann einen asymptotischen Verlauf an und nähert sich einem maximalen NR-Wert. In diesem Bereich führt eine weitere Erhöhung der Besamungsdosis nur noch zu einer unmerklichen Verbesserung der NR-Ergebnisse. Als „critical number“ (UWLAND 1984, AMANN 1989), „threshold value“ (SAACKE et al. 1994) oder „optimal reproductive efficiency“ (DEN DAAS 1997) wurde die Anzahl an Spermien definiert, die nötig war, um einen bestimmten Prozentsatz, z.B. 95% oder 97%, des asymptotischen Wertes zu erreichen. Dabei waren sowohl das Niveau der Asymptote, als auch die Steigung, mit der die Kurve dem Schwellenwert zustrebte, von Bulle zu Bulle unterschiedlich und voneinander unabhängig (SAACKE 1982; AMMAN u. HAMMERSTEDT 1993, 2002; DEN DAAS 1992, 1997).

Um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Besamung zu erhöhen, sollte die Spermienzahl einer einzelnen Besamungsportion nach Angaben der Autoren über dem „threshold value“ des jeweiligen Bullen liegen. Allerdings können die Schwellenwerte einzelner Bullen große Unterschiede aufweisen. So führte DEN DAAS (1997) Versuche mit Tiefgefriersperma von 20 erwachsenen Milchbullen durch, deren Ejakulate zu Besamungsdosen von 2,6 bis 17,3 Millionen Spermien verarbeitet worden waren. Dabei betrug die Spermienanzahl, die von den einzelnen

Bullen benötigt wurde, um 95% des maximalen Befruchtungswertes zu erzielen, zwischen 1 und 11 Millionen Samenzellen.



Darstellung 1: Schematischer Zusammenhang zwischen Non-Return-Rate und der Anzahl an Spermien pro Besamungsdosis (NRR= Non-Return-Rate)

2.7.1.3. Spermaverdünnung und –konservierung

Seit den Anfängen der künstlichen Besamung von Rindern haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Entwicklung geeigneter Medien zur Verdünnung und Konservierung von Sperma beschäftigt. Historisch bedeutende Fortschritte waren dabei u.a. die Entdeckungen der Wirksamkeit von Hühnereigelb gegen den Kälteschock durch PHILLIPS und LARDY (1940) und von Glycerol als Gefrierschutzmittel (POLGE et al. 1949; SMITH u. POLGE 1950).

Verdünnungsmedien müssen nach KUPFERSCHMIED (1993) folgende Voraussetzungen erfüllen: Stabilisierung des pH-Wertes zwischen 6,0 und 7,0,

Erhaltung des osmotischen Druckes von 250 bis 300 mOsm/l, Ernährung und Schutz der Spermien sowie Hemmung des Keimwachstums.

Bewährt haben sich v.a. so genannten Tris-Verdünner (d.h. Medien auf Basis von tri-Natriumzitat-Dihydrat, Tris(hydroxymethyl)-amino-methan) und Verdünnungsmedien auf Milch-Basis, wobei letztere kein Eigelb enthalten (KUPFERSCHMIED 1993).

Die Optimalkonzentration für Eigelb sowohl für die Flüssigkonservierung, als auch für die Gefrierkonservierung beträgt 20-25% BUSCH et al. (1991).

Neben der Möglichkeit Verdünner selbst herzustellen, sind auch Fertigprodukte verschiedener Anbieter im Handel erhältlich, denen lediglich bidestilliertes Wasser und Eigelb zugesetzt werden muss (z.B. Triladyl®, Minitüb, Landshut). Einige der Fertigmischungen verzichten auf Eigelb und beinhalten stattdessen steriles Soja-Lecithin (z.B. Biociphos® und Biociphos-Plus®, IMV, France). Auf diese Weise wird die Gefahr möglicher mikrobieller Kontaminationen durch den Zusatz tierischer Produkte (Eigelb, Milch) ausgeschlossen (BOUSSEAU et al. 1998).

In vergleichenden Studien konnten an aufgetauten Spermaproben von Split-Ejakulaten zwischen Triladyl® und Biociphos® keine hoch signifikanten Unterschiede im Anteil lebender bzw. toter Zellen, im akrosomalen Status und in der Motilität festgestellt werden (HINSCH et al. 1997). Feldversuche mit Split-Ejakulaten ergaben nahezu identische NR-Raten (HINSCH et al. 1997). Auch GIL (1999) fanden keine signifikanten Unterschiede in den NR-Raten von Triladyl® - und Biociphos-Plus® - Besamungsportionen.

MÜLLER-SCHLÖSSER et al. (1995) befanden Biociphos® als „in allen wesentlichen Kriterien wie Non-Return-Rate, Konservierungseigenschaften, Hygienestandards und Handhabung...dem Tris-Standard gegenüber als mindestens leistungsgleich“.

HURTADO (1998) verglich Biociphos-Plus® - Besamungsportionen (konfektioniert bei Zimmertemperatur) mit Tris-Eigelb-Portionen (konfektioniert bei 4°C oder Zimmertemperatur). Nach Berücksichtigung verschiedener Faktoren, wie Verdünnerherstellung, Arbeitsbedingungen, Laborergebnissen und finanziellen

Aufwendungen, war die Verwendung des Tris-Verdünners bei Zimmertemperatur den anderen Methoden überlegen. Allerdings zeigten die NR-Raten der Besamungsportionen der drei Methoden keine signifikanten Unterschiede (HURTADO et al.1997).

Werden Verdünner aus ihren Grundbestandteilen hergestellt, so müssen die hitzestabilen Anteile 3min gekocht oder 20min bei 180°C autoklaviert werden (KUPFERSCHMIED 1993). Der IAHC (2002) nennt als mögliche Sterilisationsmethoden die Filtration durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22µm und das Autoklavieren für 20min bei 121°C.

Die verwendeten Eier dürfen höchstens 3 Tage alt sein und die Eischalen sollte vor Eröffnung mit Alkohol desinfiziert werden (KUPFERSCHMIED 1993).

Beispiele für die Zusammensetzung verschiedener nicht-kommerzieller Verdünnungsmedien sind:

- JONDET (1964):

Verdünner I (ohne Glycerol):

Natriumcitrat	1,47 g
Eidotter	25,00 ml
Aqua bidest	75,00 ml
Penicillin	1000 IE/ml
Streptomycin	2000 µg/ml

Verdünner II (mit Glycerol)

Natriumcitrat	2,53 g
Fructose	2,00 g
Aqua bidest	61,00 ml
Eidotter	25,00 ml
Glycerol	14,00 ml
Penicillin	1000 IE/ml

Streptomycin	2000 µg/ml
--------------	------------

- JENICHEN und BATHE (1965) (nach: BUSCH et al., 1991):

Verdünner I (ohne Glycerol):

Aqua bidest	100 ml
Tris(-hydroxyaminomethan)	3,7855 g
Citronensäure	2,1148 g
Fructose	1,2260 g
Eidotter	20 ml
Streptomycin	500 IE/ml
Penicillin	500 IE/ml

Verdünner II (mit Glycerol):

Aqua bidest	100 ml
Tris(-hydroxyaminomethan)	3,7855 g
Citronensäure	2,1148 g
Fructose	1,2260 g
Glycerol	15ml
Eidotter	20ml
Streptomycin	500 IE/ml
Penicillin	500 IE/ml

- KUPFERSCHMIED (1993):

Trisverdünner:

Stammlösung:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	24,22 g
Zitronensäure-Monohydrat	13,60 g
D(-)-Fruktose	10,00 g
Aqua bidest.	ad 672,00 ml
Penicillin	500 IE/ml
Streptomycin	500 IE/ml
Lincomycin	150 µg/ml

Spectinomycin	300 µg/ml
---------------	-----------

Verdünner I (ohne Glycerol):

Stammlösung	336,00 ml
Eigelb	100,00 ml
Aqua bidest.	64,00 ml

Verdünner II (mit Glycerol):

Stammlösung	336,00 ml
Eigelb	100,00 ml
Glycerol	64,00 ml

In der Europäischen Gemeinschaft sind durch Richtlinie 88/407/EWG (Anhang C, Punkt 2) folgende Antibiotika nach Endverdünnung vorgeschrieben:

Penicillin	500 IE/ml
Streptomycin	500 IE/ml
Lincomycin	150 µg/ml
Spectinomycin	300 µg/ml

Das verdünnte Sperma muss nach der Beimischung der Antibiotika für mindestens 45min bei Temperaturen nicht unter 5°C gehalten werden.

Der IAHC (2002) enthält neben den in Richtlinie 88/407/EWG genannten Antibiotika folgende weitere Kombination (Endkonzentrationen):

Gentamicin	250 µg/ml
Tylosin	50 µg/ml
Lincomycin	150 µg/ml
Spectinomycin	300 µg/ml

Bei der Zumischung von Antibiotika ist grundsätzlich zu bedenken, dass eine völlige Eliminierung der im Ejakulat vorhandenen Keime nicht möglich ist, da die dafür erforderliche Konzentration spermientoxisch wirkt (BUSCH et al. 1991). Die Verwendung von Antibiotika ist daher kein Ersatz für einen einwandfreien hygienischen Status einer Besamungsstation (KUPFERSCHMIED 1993).

Bezüglich des eigentlichen **Verdünnungsvorganges** berichteten einige frühe Untersuchungen von besseren Überlebensraten der Samenzellen, bei schrittweiser Zugabe des Verdünnungsmediums und Glycerols (MILLER u. VAN DENMARK 1954; O'DELL u. ALMQUIST 1954; ALMQUIST u. WICKERSHAM 1962).

In neuerer Zeit werden in der Regel ein- oder zweistufige Verdünnungsverfahren angewendet (KUPFERSCHMIED 1993). Beim zweistufigen Verfahren enthält die erste Verdünnungsstufe zumeist kein Glycerol (s.o.). Der Verdünner wird bei Wasserbad- bzw. Zimmertemperatur beigemischt. Nach einer Temperaturabsenkung auf 5°C erfolgt die zweite, glycerolhaltige Verdünnungsstufe. Dagegen werden beim einstufigen Verfahren die erste und zweite Verdünnungsstufe direkt hintereinander durchgeführt oder nur ein glycerolhaltiger Einheitsverdünner verwendet.

SCHENK et al. (1987) verglichen ein einstufiges mit zwei zweistufigen Verdünnungsmedien. Dabei zeigten sich in den jeweiligen NR-Raten keine signifikanten Unterschiede.

KUPFERSCHMIED (1993) riet bei der Herstellung von Tiefgefrierportionen zur Verwendung eines Trisverdünners (s.o.) in zwei Stufen. Übersicht 8 gibt die entsprechenden Zeit- und Temperaturverhältnisse wieder.

Übersicht 8: Zeit- und Temperaturverhältnisse beim Tiefgefrieren von Sperma, Trisverdünner, zwei Phasen (KUPFERSCHMIED 1993)

Intervall (min)	Vorgang	Temperatur (°C)
	Spermagewinnung	~ 40
10-15	Ejakulat im Wasserbad	32
	Mikroskopische Untersuchung	37
	Verdünnung I (ohne Glycerol), bis halbes Endvolumen	32
10	Raumtemperatur	~22
90-120	Kühlraum oder -vitrine	5
	Verdünnung II (mit Glycerin) bis Endvolumen	5
150	Abfüllen der Dosen	5
	Tiefgefrieren innerhalb von 7-10min	-196

In einem ähnlichen System wird der erste Verdünnungsschritt ebenfalls in direktem Anschluss an die Spermagewinnung vorgenommen (GIL 1999). Die Verdünnungstemperatur beträgt 35°C. Allerdings wird das Verdünnungsmedium schrittweise zugesetzt. Danach folgt eine 1,5 bis 2-stündige Abkühlungsphase auf 5°C, bevor die zweite Verdünnerfraktion, die das Glycerin enthält, beigemischt wird. Die sich anschließende Äquilibrationsphase, die hier der Konfektionierung vorausgeht, dauert drei bis vier Stunden (bei 5°C) und ist damit deutlich länger als von KUPFERSCHMIED (1993) empfohlen (s.o.). Die Besamungsportionen werden unmittelbar nach dem Abfüllen tiefgefroren.

Nach Gil (1999) ist es wichtig, Glycerol langsam und schrittweise zuzugeben. Demgegenüber fand FOOTE (1970) bei der Untersuchung verschiedener Verdünnungsverfahren, dass ein langsames Zufügen von Glycerol zum Sperma-Verdünner-Gemisch für Motilität und Fertilität der aufgetauten Besamungsportionen nicht vorteilhaft war.

Die Literaturangaben bezüglich der Dauer einer Äquilibrationsphase, in der sich die Samenzellen an das Gefrierschutzmittel **Glycerol** anpassen sollen, liegen zwischen 10 Sekunden (BERNDTSON u. FOOTE 1969) und 18 Stunden (POLGE et al. 1949; MARTIN u. EMMENS 1958). Insgesamt werden aber überwiegend kurze Einwirkzeiten des Glycerols empfohlen (O'DELL u. HURST 1956; BERNDTSON u. FOOTE 1969; KUPFERSCHMIED 1993).

Nach SHERMAN (1963) spielt neben der Äquilibrationsdauer v.a. die Temperatur der glycerolhaltigen Fraktion des Verdünnungsmediums eine wesentliche Rolle. Der Autor erzielte die besten Ergebnisse, wenn die Glycerolfraktion bei 5°C zugegeben wurde (nach: BUSCH et al. 1991).

Wichtiger als eine lange Einwirkdauer des Glycerol ist die langsame Absenkung der Temperatur des Sperma-Verdünner-Gemisches vor Durchführung des Gefriervorganges, um einen Kälteschock der Samenzellen zu vermeiden (BUSCH et al. 1991).

Übersicht 9 enthält einige der Literatur entnommene Empfehlungen bezüglich des für die Gefrierkonservierung von Rindersperma optimalen Glycerolanteils in den jeweiligen Verdünnungsmedien.

Übersicht 9: Literaturangaben über empfohlene Glycerolanteile im Verdünnungsmedium (%)

Quelle	Glycerol (%)	Anmerkung
POLGE et al. (1949)	20	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
MILLER und VAN DENMARK (1953)	6-8	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
EIBL (1959)	16	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
ALMQUIST und WICKERSHAM (1962)	5	Magermilch-Verdünner
JONDET (1964)	7,0	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
JENICHEN und BATHE (1965)	6,4	Tris-Zitronensäure-Verdünner
(nach: BUSCH et al., 1991)		
FOOTE (1970)	6,4	Tris-Fruktose-Glycerol-Verdünner
FOOTE (1970)	5,6	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
ROBBINS et al. (1973)	10,22	
BERNDTSON und FOOTE (1972)	9,5	
WIGGIN (1975)	10,7	Milchverdünner; Auftemperatur: 75°C
ROBBINS et al. (1976)	8,5	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner; Auftemp.: 65°C; Auftauzeit: 7,5 sec
PACE et al. (1981)	7	Natriumcitrat-Eigelb-Verdünner
KUPFERSCHMIED (1993)	6,4	Tris-Zitronensäure-Verdünner
ANZAR et al. (2002)	6	Tris-Zitronensäure-Verdünner

Der **Gefriervorgang** kann entweder in großen Gefäßen mit flüssigem Stickstoff oder mit Hilfe entsprechender Maschinen, nach einer standardisierten oder programmierten Einfrierkurve, erfolgen (KUPFERSCHMIED 1993).

Durch den Gefriervorgang kann bei bovinen Spermien die Plasmamembran über dem Akrosom verloren gehen und im postakrosomalen Bereich sowie im Spermien-Mittelstück beschädigt oder gebrochen werden (JONES u. STEWARD 1979).

Der Anteil der Spermien mit geschädigten Kopfkappen stieg in Folge des Gefrierprozesses durchschnittlich von 5-7% auf 30% (KUPFERSCHMIED 1993).

Zudem kann es zu einer „Überkondensation“ („overcondensation“) der DNS (GRAVANCE et al. 1998), einem Anstieg der apoptotischen Samenzellen auf bis zu 40% und einem Abfall der lebensfähigen Spermien um 10 – 20% (ANZAR et al. 2002) kommen.

Selbst bei Anwendung der besten Verdünnungs- und Gefrierprotokolle beträgt die durchschnittliche Überlebensrate der Samenzellen von Milchviehbulen nur etwa 50% (HAMMERSTEDT et al. 1990; WATSON 1995).

Eine Vielzahl von Autoren ist der Auffassung, dass selbst eine jahrelange **Lagerung** von Spermaportionen in flüssigem Stickstoff bei -196°C nicht zu einem Rückgang der Befruchtungsfähigkeit der Besamungsportionen führt (CLEGG u. PICKETT 1966; BERNDTSON u. FOOTE 1972; LEE et al. 1977; KUPFERSCHMIED 1993).

Die Lebensfähigkeit tiefgefrorener Zellen bei -196°C bleibt bis zu 10 000 Jahren erhalten MAZUR (1980).

2.7.1.4. Qualitätskontrolle

Das korrekte, standardisierte Auftauen tiefgefrorener Besamungsportionen ist eine wichtige Voraussetzung für deren Beurteilung (KUPFERSCHMIED 1993). KUPFERSCHMIED (1993) schlug eine Wasserbadtemperatur von 38°C und eine Auftaudauer von 30 Sekunden vor.

Der Einfluss unterschiedlicher Auftaubedingungen auf die Motilität der Samenzellen sowie anderer Parameter wurde von einer Reihe von Untersuchern beschrieben: AAMDAL und ANDERSEN (1968) fanden einen höheren Anteil lebender Spermien wenn Tiefgefrierportionen für 12 Sekunden bei 75°C anstatt bei 35°C aufgetaut wurden. ROBBINS et al. (1976) berichteten von einem signifikanten Zusammenhang zwischen der optimalen Glycerolkonzentration und der Auftautemperatur bzw. –zeit. Bei Besamungsportionen mit 8,5% Glycerol erbrachten eine Auftauzeit von 7,5

Sekunden und eine Auftautemperatur von 65°C, die besten Ergebnisse in Bezug auf Motilität und akrosomaler Integrität.

PACE et al. (1981) führten verschiedenen Labortests an Spermaproben durch, die entweder bei 37°C, 10°C oder im Eisbad (1°C bis 3°C) aufgetaut worden waren. Dabei erzielten „37°C-Proben“ in allen Labortests die besten Ergebnisse. Lediglich der hypotone Stresstest ergaben für alle drei Auftauregime ähnliche Befunde. Die NR-Raten der „37°C-Proben“ waren signifikant höher, als die der anderen Proben. Zwischen den „Eiswasser-“ und den „10°C-Proben“ bestanden in Labortests und NR-Raten keine signifikanten Unterschiede.

2.7.2. Flüssigkonservierung

Zur Flüssigkonservierung von Sperma entwickelten SHANNON und CURSON (1984) den Caprogen®-Verdünner, der zur Spermalagerung bei 4-5°C u.a. 1,25% Glycerol, 0,03125% Capronsäure und 20% Eigelb enthält. In einer modifizierten Version zur Lagerung bei 15-25°C beträgt der Eigelbanteil nur 5%.

Für Frischsperma sind die empfohlenen Besamungsportionen erheblich kleiner als für Tiefgefriersperma: FOOTE (1978) berichtete von zufrieden stellenden Ergebnissen bei Besamungen 0,5 bis 2,5 Millionen Spermien. JANSEN und UWLAND (1988) beobachteten, dass Frischsperma- im Vergleich zu Tiefgefriersperma-Portionen, nur halb so viele Samenzellen benötigten, um vergleichbare Befruchtungserfolge zu erzielen, sofern das Frischsperma am ersten Tag nach der Gewinnung verwendet wurde. Nach 2 bzw. 3-tägiger Lagerung fiel die Befruchtungsfähigkeit des Frischspermas um 2 bzw. 4 % ab.

SHANNON und VISHWANATH (1995) führten Untersuchungen an Frisch- und Tiefgefriersperma durch, das nach dem Auftauen weiter verdünnt worden war. In Inkubationsversuchen bei 37°C zeigte Frischsperma eine deutlich längere Aktivität: Die Zeitspanne innerhalb der noch mindestens 10% der Samenzellen eine Motilität aufwiesen, betrug bei Frischsperma $124 \pm 5,5$ h und bei Tiefgefriersperma $75,8 \pm 3,1$ h

($M \pm SD$). Allerdings konnte bei Besamungen mit 20 Millionen (Tiefgefriersperma) bzw. 2,5 Millionen (Frischsperma) Samenzellen kein signifikanter Unterschied in den Non-Return-Raten (NR-Raten) festgestellt werden. Bei Verwendung von nur 5 Millionen (Tiefgefriersperma) bzw. 0,5 Millionen (Frischsperma) Samenzellen trat ein Abfall der NR-Raten um 7,9% bzw. 7,0% ein. Die Autoren vermuteten, dass die Freisetzung nicht identifizierter, toxischer Stoffe aus toten Samenzellen zu der kürzeren Überlebensspanne des Tiefgefrierspermas im Inkubationsversuch geführt hatte, die Überlebenszeit von Frisch- und Tiefgefriersperma im weiblichen Geschlechtstrakt aber gleich war. Der Tiefgefriervorgang hätte jedoch zu einer Schädigung der Samenzellen geführt, so dass die Befruchtungswahrscheinlichkeit von Frischsperma fünf bis sechs Mal höher war.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Untersuchung wurde in Form einer Fragebogenaktion von März bis August 2002 an 60 Besamungsstationen für Rinder aus 17 verschiedenen Ländern durchgeführt.

3.1. Auswahl der Besamungsstationen

Für die Studie wurden Besamungsstationen für Rinder ausgewählt, die entsprechend den Richtlinien der Europäischen Union zum Handel mit bovinem Sperma zugelassen sind.

Insgesamt wurden weltweit 238 Unternehmen telefonisch sowie durch Briefe, Postkarten und Emails angesprochen. Es stellte sich heraus, dass ein großer Teil der Einrichtungen nur für Warte- oder Jungbullen bzw. zur Lagerung von Besamungsportionen genutzt wurde und somit nicht den Kriterien für eine Aufnahme in die Studie entsprach. Zu einer Reihe von Betrieben konnte trotz intensivster Bemühungen kein Kontakt hergestellt werden. Insgesamt waren 63 Rücksendungen zu verzeichnen. 3 davon enthielten keine Absenderangaben und wurden deshalb von der Untersuchung ausgeschlossen. Von den verbliebenen 60 Antworten kamen 41 (68,3%) aus Mitgliedsländern der Europäischen Gemeinschaft, 6 (10%) aus europäischen Ländern außerhalb der EU und 13 (21,7%) aus nicht-europäischen Ländern. Im einzelnen verteilten sich die Betriebe folgt:

<u>Mitglieder der Europäischen Gemeinschaft:</u>	Deutschland:	19
	Dänemark:	1
	Finnland:	2
	Frankreich:	2
	Großbritannien:	5
	Irland:	3
	Italien:	1
	Niederlande:	2

	Österreich:	5
	Portugal:	1
<u>Europäische Länder außerhalb der EU:</u>	Polen:	2
	Schweiz:	2
	Tschechei:	2
<u>Nicht europäische Länder:</u>	Australien:	1
	Canada:	4
	Neuseeland:	4
	U.S.A.:	4

3.2. Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte von März bis August 2002 und wurde mit Hilfe eines Fragebogens durchgeführt. Der Fragebogen wurde in deutscher, englischer und französischer Sprache verfasst. Allen Betrieben wurde ein ausgedrucktes Exemplar sowie eine Diskette, auf welcher der Fragebogen als Word-Dokument abgespeichert war, zugesandt. Außerdem war jedem Schreiben ein portofreier Rückumschlag beigelegt.

Der Fragebogen umfasste die folgenden Themenkomplexe:

1. Allgemeine Merkmale der Besamungsstation
2. Bullenhaltung, -pflege und -fütterung
3. Spermagewinnung, -beurteilung und -verarbeitung

Die deutsche Version des Fragebogens ist in Kapitel 10 wieder gegeben.

3.3. Auswertung

Um einen Vergleich zwischen den deutschen und den ausländischen Besamungsstationen zu ermöglichen und gleichzeitig die Anonymität individueller

Stationen zu sichern, wurden die untersuchten Betriebe in 5 „**geographische Gruppen**“ unterteilt.

1. „**D**“ – Gruppe: deutsche Besamungsstationen (n=19)
2. „**EU**“ – Gruppe: Besamungsstationen in Mitgliedsländern der Europäischen Union mit Ausnahme der deutschen Stationen (n=22)
3. „**NEU**“ – Gruppe: Europäische Länder, die nicht Mitglieder der EU sind (n=6)
4. „**NA**“ – Gruppe: USA und Canada (n=8)
5. „**ANZ**“ – Gruppe: Australien und Neuseeland (n=5)

Bei einem Teil der Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert (M) und die Standardabweichung (SD) bestimmt. Bei starker Streuung der Werte werden zusätzlich Maximal- und Minimalwerte angegeben. Dabei ist die Aussagekraft umso größer, je mehr Besamungsstationen in einer Gruppe enthalten sind. Da nicht alle befragten Zuchtstationen zu jedem Punkt Auskunft gaben, beziehen sich die genannten Prozentwerte jeweils auf die Anzahl auswertbarer Angaben (n) pro hinterfragtem Kriterium. Statistische Prüfverfahren fanden keine Anwendung, da die Daten nicht aus einer Stichprobe gewonnen wurden, sondern die Grundgesamtheit darstellten (SACHS 1984).

4. ERGEBNISSE

4.1. Allgemeine Struktur- und Organisationsmerkmale

4.1.1. Alter der Besamungsstationen

Das Alter von 57 Besamungsstationen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Vor 1945 wurden lediglich eine Station in Portugal (1942) und eine Station in Kanada (1944) in Betrieb genommen. Später gab es weltweit 2 Phasen der verstärkten Inbetriebnahme von Besamungszentren. Die erste Phase begann nach Ende des zweiten Weltkrieges und dauerte bis in die Siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts. Die zweite Phase begann nach 1990 und setzt sich bis heute fort. In den Jahren dazwischen wurden nur wenige neue Zuchtstationen gegründet.

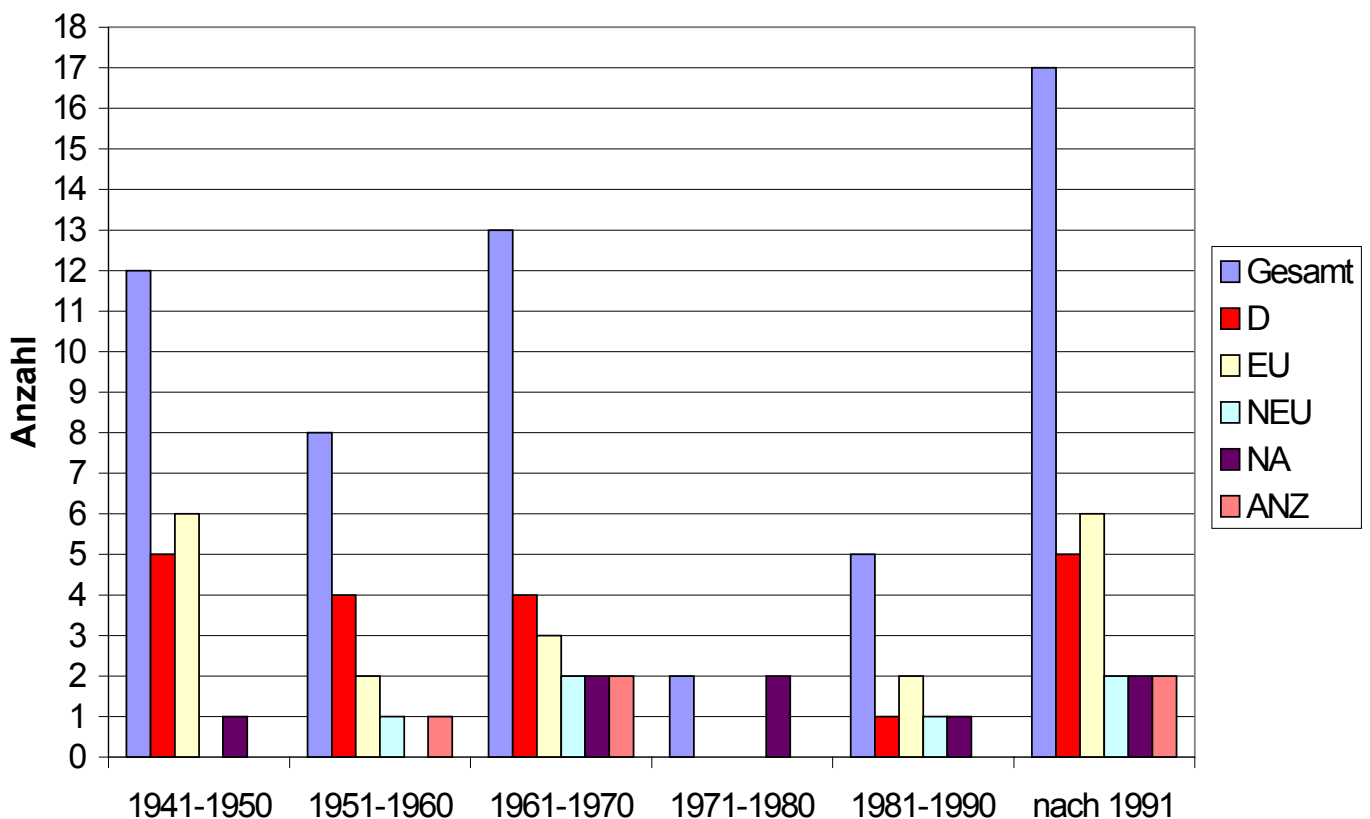


Abbildung 1: Gründungen von Besamungszentren

4.1.2. Durchschnittliche Anzahl an Bullen je Besamungsstation

Tabelle 1 zeigt die durchschnittliche Anzahl Bullen pro Betrieb. Die Stationen sind in 5 Gruppen verschiedener Größe („≤10“ bis „≥ 1001“) eingeordnet. „n“ gibt die Gesamtzahl an Besamungsstationen in den jeweiligen geographischen Gruppen an. Betriebe mit 10 oder weniger eingestellten Bullen finden sich in Großbritannien (2), Irland (1) und Österreich (1). Die deutschen Besamungsstationen sind mittlerer Größe. Die größte deutsche Station weist 300 Bullen auf, die kleinste 27. Der durchschnittliche Bestand aller teilnehmenden deutschen Stationen liegt bei 151 Tieren. Der mit 580 durchschnittlich eingestellten Bullen größte untersuchte europäische Betrieb befindet sich in Dänemark. Die kleinste europäische Station wird in Österreich betrieben. Sie führt durchschnittlich 3 Bullen. Die durchschnittliche Bestandsgröße in der „EU“-Gruppe beträgt 91,6 Tiere. Besamungsstationen mit über 1000 Bullen finden sich nur in den USA.

Tabelle 1: Bullen je Betrieb (%)

	n	≤10	11-100	101 – 500	501 - 1000	≥1001
Gesamt	60	6,7	51,7	35,0	3,3	3,3
D	19	0	36,8	63,2	0	0
EU	22	18,2	54,5	22,7	4,5	0
NEU	6	0	100 (6/6)	0	0	0
NA	8	0	25 (2/8)	50 (4/8)	0	25 (2/8)
ANZ	5	0	80 (4/5)	0	20 (1/5)	0

4.1.3. Rinderrassen

In Abbildung 2 ist die Anzahl der gehaltenen Rinderrassen pro Besamungsstation dargestellt. Hierbei sind die Besamungszentren in 3 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erfasst Besamungszentren mit weniger als 5 Rassen, die zweite Gruppe Besamungszentren mit 5 bis 9 Rinderrassen und die dritte Gruppe Zentren, in denen Bullen von mehr als 9 verschiedenen Rassen eingestellt sind.

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit werden die prozentualen Verteilungen der jeweiligen geographischen Gruppen gezeigt. Dabei ist zu beachten, dass die

absolute Zahl der Betriebe in der „NEU“- , „NA“- , und „ANZ“-Gruppe relativ klein und daher nur von begrenzter Aussagefähigkeit ist.

In Deutschland halten 73,7% aller befragter Besamungsstationen weniger als 5 verschiedene Rinderrassen und die übrigen 26,3% 5 bis 9 verschiedene Rassen. Ein ähnliches Bild zeigt sich in den anderen europäischen Mitgliedsstaaten (66,7% bzw. 23,8%). Dagegen ist in Besamungsstationen außerhalb der Europäischen Gemeinschaft der Anteil mit mehr als 9 verschiedenen Rassen deutlich größer (NEU=16,7%, NA=25%, ANZ=40%). Werden alle außerhalb der Europäischen Gemeinschaft liegenden Besamungszentren zusammengefasst (n=19), so liegt hier der Anteil der Besamungsstationen mit mehr als 9 verschiedenen Rinderrassen bei 21,1%.

Eine differenzierte Auflistung der einzelnen Rassen ist nicht möglich, da die Antworten vieler Betriebe lediglich die Anzahl an Rassen, nicht aber deren Namen beinhalteten.

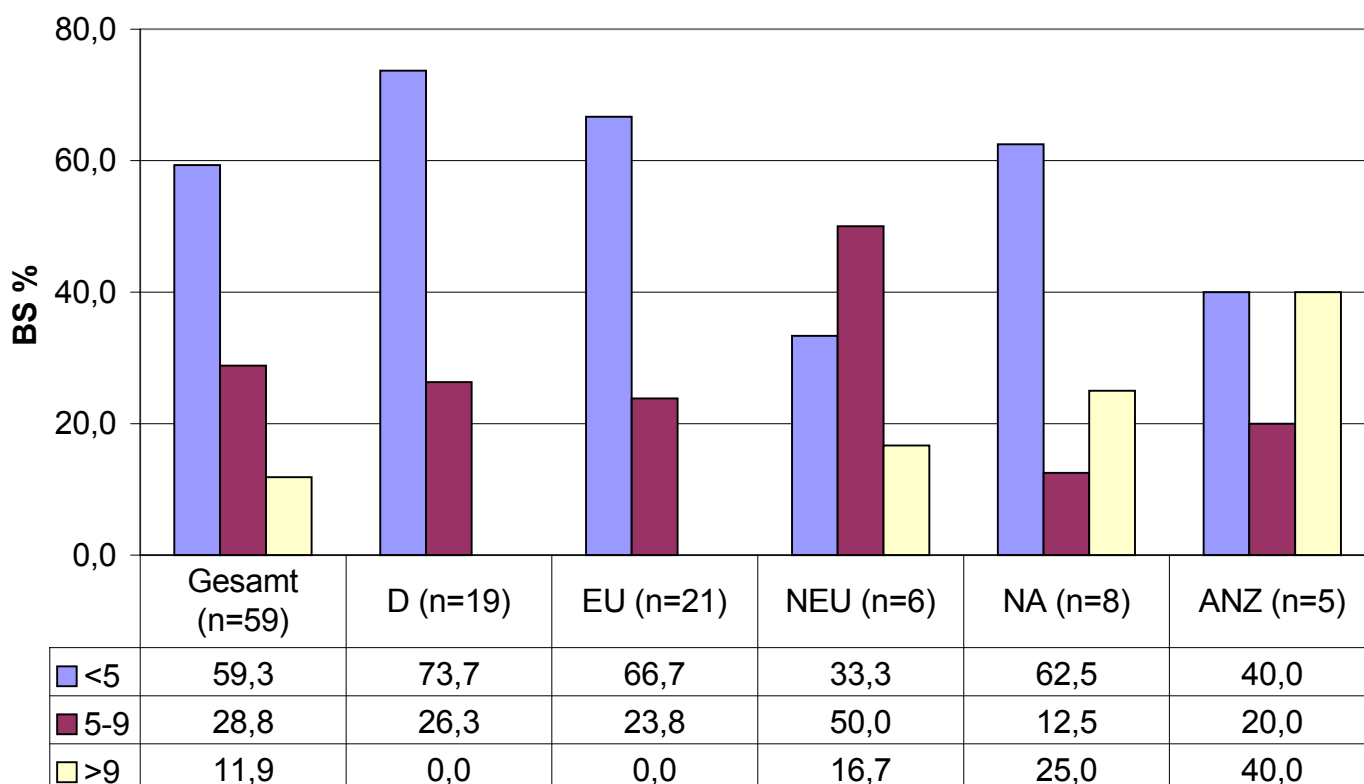


Abbildung 2: Rinderrassen pro Besamungsstation (BS%)*

*BS%: prozentualer Anteil an Stationen mit „<5“, „5-9“ oder „>9“ Rinderrassen

4.1.4. Betriebseigene und -fremde Bullen

Etwa die Hälfte der befragten Besamungszentren führt nur eigene Tiere, d.h. alle eingestellten Bullen befinden sich im Besitz der Besamungsstation. In den restlichen Betrieben stehen neben betriebseigenen Bullen auch solche anderer Besitzer. Diese Verteilung findet sich in allen untersuchten geographischen Gruppen und ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Internationale Besamungsstationen mit ausschließlich betriebseigenen Bullen oder betriebseigenen und –fremden Bullen (%)

	n	Nur betriebseigene Bullen	Auch betriebsfremde Bullen
Gesamt	55	47,3	52,7
D	19	47,4	52,6
EU	19	47,4	52,6
NEU	5	40,0 (2/5)	60,0 (3/5)
NA	8	50,0 (4/8)	50,0 (4/8)
ANZ	4	50,0 (2/4)	50,0 (2/4)

Alle deutschen Betriebe, die sowohl betriebsfremde, als auch betriebseigene Bullen führen, halten diese Tiere in gemeinsamen Einheiten. Dies ist auch in allen entsprechenden Betrieben der „NEU“- und „NA“-Gruppe der Fall. Aus der Gruppe der europäischen Mitgliedsstaaten gab nur eine französische Station an, betriebsfremde und –eigene Bullen in getrennten Einheiten zu halten. In der „ANZ“- Gruppe sind in einem der beiden Betriebe, in denen eigene und fremde Tiere gehalten werden, getrennte Einheiten für diese eingerichtet.

In Tabelle 3 ist die Haltung von betriebseigenen und -fremden Bullen in getrennten oder gemeinsamen Stallungen dargestellt. Stationen, die ausschließlich betriebseigene Bullen besitzen, wurden nicht einbezogen, daher ist n-Gesamt = 29.

Tabelle 3: Besamungsstationen mit betriebseigenen und –fremden Bullen: getrennte oder gemeinsame Haltung (%)

	n	Gemeinsam	Getrennt
Gesamt	29	93,1 (27/29)	6,9 (2/29)
D	10	100,0 (10/10)	0,0
EU	10	90,0 (9/10)	10,0 (1/10)
NEU	3	100,0 (3/3)	0,0
NA	4	100,0 (4/4)	0,0
ANZ	2	50,0 (1/2)	50,0 (1/2)

4.1.5. Tierpfleger

Die durchschnittliche Anzahl an Bullen je Tierpfleger wurde aus den Angaben über die durchschnittliche Zahl an Bullen in der Besamungsstation und der Anzahl der in derselben Station beschäftigten Tierpfleger berechnet. Dabei finden sich zwischen den einzelnen Besamungszentren teilweise deutliche Unterschiede. Die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der jeweiligen geographischen Gruppen sind in Tabelle 4 gezeigt.

In einer österreichischen Station sind mehr Tierpfleger an- als Bullen eingestellt. Das Verhältnis „Bullen / Tierpfleger“ beträgt hier nur „0,6“ und ist damit von allen untersuchten Besamungsstationen das niedrigste. Das mit „96,7“ höchste Verhältnis findet sich in einem dänischen Unternehmen.

Tabelle 4: Durchschnittliche Anzahl an Bullen, die von einem Tierpfleger versorgt werden (M±SD, Maximal- und Minimalwerte)

	n	M±SD	Maximum	Minimum
Gesamt	60	22,9 ± 16,7	96,7	0,6
D	19	29,5 ± 9,0	50,0	13,5
EU	22	17,8 ± 12,4	96,7	0,6
NEU	6	12,9 ± 4,4	19,0	8,0
NA	8	32,0 ± 18,4	73,3	10,0
ANZ	5	17,1 ± 14,9	42,3	6,5

Um die Intensität des Kontaktes zwischen Tierpflegern und Laborpersonal beurteilen zu können, wurde gefragt, ob beide Gruppen gemeinsame Aufenthaltsräume

benutzen und in welcher Häufigkeit Laborräume von Tierpflegern betreten werden. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 5 bzw. Tabelle 6.

Tabelle 5: Gemeinsame Aufenthaltsräume für Tierpfleger und Laborpersonal, prozentuale Verteilung der geographischen Gruppen (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	60	31,7	68,3
D	19	26,3	73,7
EU	22	31,8	68,2
NEU	6	0,0	100,0 (6/6)
NA	8	50,0 (4/8)	50,0 (4/8)
ANZ	5	60,0 (3/5)	40,0 (2/5)

Tabelle 6: Besamungsstationen in denen Tierpfleger Zutritt zu den Laborräumen haben (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	60	40,0	60,0
D	19	42,1	57,9
EU	22	40,9	59,1
NEU	6	0,0	100,0 (6/6)
NA	8	50,0 (4/8)	50,0 (4/8)
ANZ	5	60,0 (3/5)	40,0 (2/5)

In 11 der 19 deutschen Besamungsstationen (57,9%) betreten Tierpfleger niemals den Laborbereich. Zwei dieser 11 Betriebe weisen aber gleichzeitig gemeinsame Aufenthaltsräume für Pfleger und Laborpersonal auf.

In 13 der 22 Labors der anderen Mitgliedsstaaten der EU (59,1%) haben Tierpfleger keinen Zutritt. Drei dieser Betriebe besitzen aber gemeinsame Aufenthaltsräume für Tierpfleger und Laborpersonal.

In der „NA“- und der „ANZ“-Gruppe weisen je eine Station, in der Tierpfleger das Labor nie betreten, gemeinsame Aufenthaltsräume aus.

In allen 6 untersuchten Stationen der „NEU“ Gruppe haben Tierpfleger keinen Zutritt zu den Laborräumen; es fehlen aber auch gemeinsame Sozialräume.

Außerdem wurde der Anteil der Besamungsstationen ermittelt, deren Tierpfleger zusätzlich in anderen Betrieben tätig sind. Die entsprechenden Prozentsätze sind für

Deutschland, die „EU“-Gruppe und die „ANZ“-Gruppe mit 21,1%, 22,7% und 20% nahezu gleich. Die „NEU“-Gruppe weist mit 16,7% einen niedrigeren Anteil auf. Lediglich in der Nordamerika-Gruppe sind die Tierpfleger aller untersuchten Station ausschließlich an der Besamungsstation tätig.

Tabelle 7: Anteil an Besamungsstationen mit zusätzlicher Tätigkeit von Tierpflegern in Betrieben außerhalb der Besamungsstation (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	60	18,3	81,7
D	19	21,1	78,9
EU	22	22,7	77,3
NEU	6	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)
NA	8	0,0	100,0 (8/8)
ANZ	5	20,0 (1/5)	80,0 (4/5)

4.1.6. Isolationsställe

Nach der EG-Richtlinie 88/407/EEC müssen alle Tiere, die in einer von der Europäischen Gemeinschaft zugelassenen Besamungsstation untergebracht werden, zunächst 30 Tage in zulassungspflichtigen Isolationsställen gehalten werden. Die EU-Richtlinie regelt zwar die hier durchzuführenden zuchthygienischen Untersuchungen, lässt aber offen, nach welchem Prinzip die Isolationsställe belegt werden sollen.

Es wurde gefragt, ob die Isolationsställe nach einem „All in – All out“ System geführt werden. Wobei „All in – All out“ meint, dass eine Gruppe von Tieren erst dann in die Isolationsställe eingeführt wird, nachdem alle Tiere der vorhergehenden Gruppe ihren Aufenthalt erfolgreich beendet haben und aus Isolationsställen in die eigentliche Besamungsstation überführt wurden. Auf diese Weise wird eine Kontaktmöglichkeit zwischen neu ankommenden und bereits eingestellten Tieren vermieden.

Wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist, belegen alle Besamungsstationen der Gruppen „NEU“ und „NA“ ihre Isolationsställe nach einem „All in – All out“ System. Das gilt auch für 94,7% (18/19) der deutschen Betriebe.

In den anderen Betrieben der „EU“-Gruppe wenden 6 kein „All in – All out“ System an. Vier dieser Stationen befinden sich in Großbritannien (4/5).

In der „ANZ“-Gruppe finden sich 2 Betriebe ohne „All in – All out“ System.

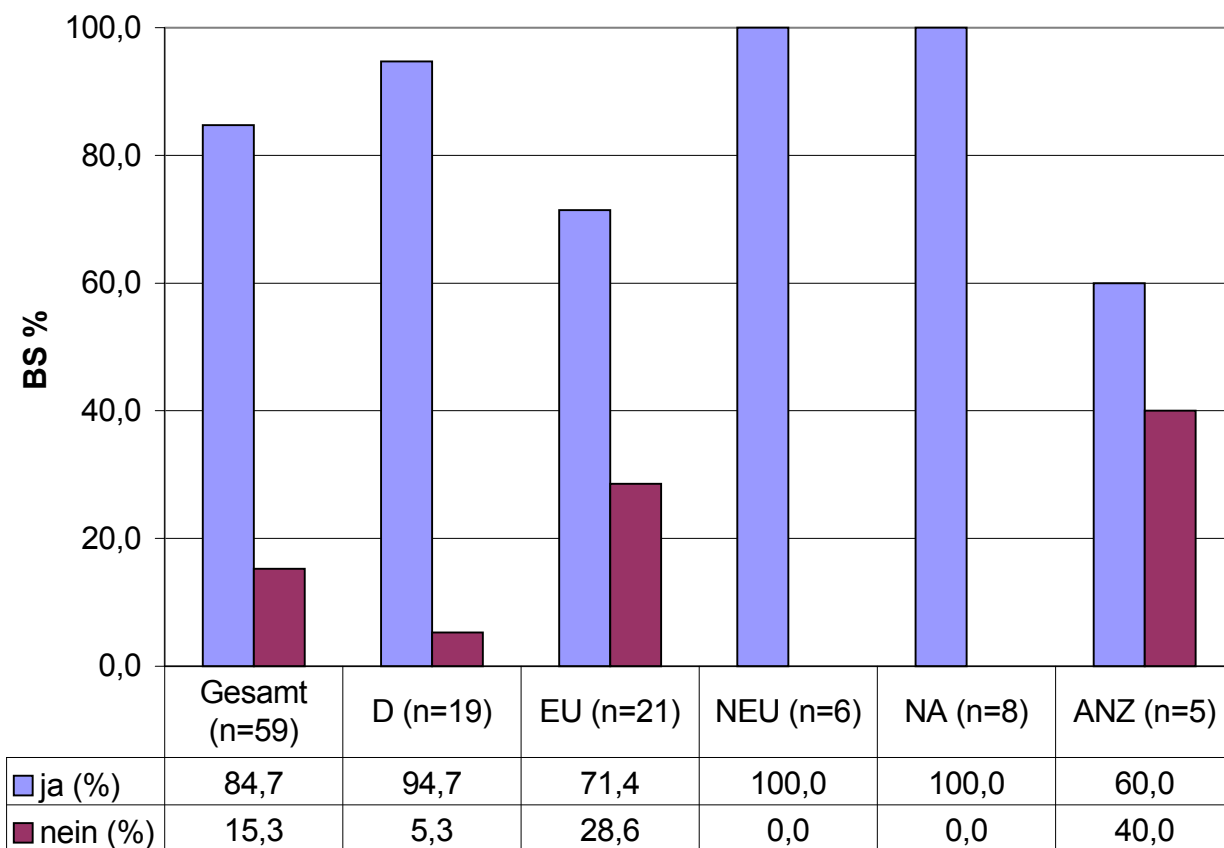


Abbildung 3: Besamungsstationen mit „All in – All out“ System in den Isolationsställen (BS %)*

* BS%: prozentualer Anteil an Besamungsstationen, die über ein „All in – All out“ System verfügen („ja“) oder nicht verfügen („nein“)

4.1.7. Allgemeine Hygienemaßnahmen

In jeder der untersuchten **deutschen Besamungsstationen** ist nur einem eingeschränkten Personenkreis Zutritt gestattet. Stets Zutritt haben Amtstierärzte. Weitere zugelassene Besucher sind Handwerker, Absamungstechniker, Mitglieder des Vorstandes und der Geschäftsführung, Vertreter von Zuchtverbänden und der Körkommissionen, Vertreter der Landesregierung, Angehörige anderer Besamungsstationen, Vertragstierärzte und Schüler. Besuche sind immer nur in Schutzkleidung und zum Teil nur in entsprechenden Besucherräumen möglich.

Bezüglich des zeitlichen Abstandes zwischen dem Besuch der Besamungsstation und einem vorausgehenden Kontakt mit Klautieren gelten unterschiedliche Regelungen.

In einer Station beträgt die Karenzzeit 72h. Zwei Betriebe schreiben 24h vor. Eine dritte Station gewährt keinen Zutritt, falls der Kontakt zu anderen Klautieren am selben Tag stattgefunden hat und eine vierte, falls am selben Tag ein nicht BHV-1 freier Betrieb besucht wurde.

Vier Stationen verfügen über keine derartigen Regelungen und ein Betrieb gibt an, den Besuch sogar bei vorausgegangenem potentiell MKS-Kontakt zu erlauben, sofern die Besucher zuvor geduscht haben. In den Antworten der übrigen deutschen Besamungsstation fehlen die entsprechenden Informationen.

In den Besamungsstationen der „**EU**“-Gruppe sind die gleichen Besucher zugelassen wie in den deutschen Stationen. Einige Betriebe nennen zusätzlich Wissenschaftler, Studenten, Photographen und Handelsvertreter. Ein britischer Betrieb führt 12 erlaubte Personengruppen an und berichtet von der Durchführung eines „Tages der offenen Tür“, bei dem ca. 700 interessierten Personen Zutritt über eine Zuschauergalerie gestattet wird.

In 4 Stationen existieren keine Besuchervorschriften. In 86,4% der Stationen der „EU“-Gruppe (19/22) ist das Tragen von Schutzkleidung angeordnet. Die

Rückantworten von zwei österreichischen Betrieben und einer holländischen Station enthielten keine Information zum Thema „Schutzkleidung“.

Bezüglich eines zeitlichen Mindestabstandes zwischen dem Besuch der jeweiligen Station und einem vorangegangenen Kontakt zu Klauentieren gilt in einem britischen Betrieb eine Karenzzeit von 12h. Vier weitere britische Betriebe fordern 24h und je ein Betrieb in Portugal und Dänemark 48h. Unter den vier britischen Betrieben mit 24-stündiger Karenzzeit befindet sich auch derjenige, der den „Tag der offenen Tür“ durchführt.

Bei 2 skandinavischen Betrieben ist für Besucher aus dem Ausland eine Karenzzeit von 48h bzw. 96h vorgeschrieben.

In der **„NEU“-Gruppe** geben 4 von 5 Betrieben an, nur Amtstierärzte und Tierärzte als Besucher zuzulassen, generell aber keine Besuchsregelungen zu haben.

Ein Schweizer Betrieb ist in drei Zonen organisiert. Die erste Zone umfasst den Bürotrakt, das Sitzungszimmer, die Kantine, die Toiletten und den Besucherraum. Hier sind Besucher mit normalem Seuchenstatus unter Führung erlaubt. Die zweite Zone ist durch ein Schließsystem von der ersten getrennt und besteht aus dem Labor und dem Samenlager. In dieser Zone muss Schutzkleidung getragen werden. Es sind außer dem Laborpersonal nur Handwerker und Fachleute zugelassen. Die dritte und letzte Zone ist ebenfalls getrennt und umfasst den eigentlichen Tierhaltungsbereich. Betreten wird dieser Bereich nur von Tierpflegern und dem Stationstierarzt. Besuche sind nur in Schutzkleidung und unter Aufsicht möglich. Eine Karenzzeit von 10 Tagen ist vorgeschrieben. Andere Stationen der „NEU“-Gruppe machen keine entsprechenden Angaben.

Von den Besamungsstationen der **„NA“-Gruppe** nennen 3 lediglich Tierärzte als erlaubte Besucher, eine nur Amtstierärzte und zwei auch Klauenpfleger, Photographen, Körrichter und Zuchtexterten. Schutzkleidung ist in 6 Betrieben vorgeschrieben. Es werden keine Karenzzeiten genannt.

Auch die Betriebe der „ANZ“ Gruppe schränken den Kreis möglicher Besucher ein. Allerdings geben 4 der 5 Betriebe hierzu keine nähere Erläuterung. Im 5. Betrieb sind Tierärzte, veterinärmedizinische Studenten, Vertreter der Landwirtschaftsbehörde und Geschäftspartner zugelassen. Bei Besuchen bestehen 4 Stationen auf das Tragen von Schutzkleidung und eine Station nur auf entsprechend saubere Kleidung und Schuhwerk. Eine Karenzzeit wird nur von einer Station der „ANZ“-Gruppe genannt. Hier sind nur Besucher gestattet, die sich seit mindestens 30 Tagen im Land aufhalten.

4.2. Bullentransport und -haltung

4.2.1. Transport

Es wurde gefragt, ob Tiertransporte in betriebseigenen Fahrzeugen und/oder durch Fuhrunternehmer durchgeführt werden. In Deutschland verwenden 63,2% aller Betriebe ausschließlich eigene Fahrzeuge. In der „EU“-Gruppe gilt dies für je 2 Stationen aus den Niederlanden, Frankreich, Österreich und Großbritannien, sowie je eine Station aus Irland und Finnland. Ein niederländischer Betrieb stattet seine Transportfahrzeuge zudem mit bakterien- und virusdichten Luftfiltern aus. In den Betrieben der „NEU“- , „NA“- und „ANZ“- Gruppe überwiegen Betriebe, die teilweise oder ausschließlich Fuhrunternehmer zum Transport ihrer Tiere benutzen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Internationale Besamungsstationen: Verwendete Tiertransporter (%)

	n	Nur betriebseigene Fahrzeuge	Nur Fuhrunternehmer	Sowohl als auch
Gesamt	60	50,0	30,0	20,0
D	19	63,2	10,5	26,3
EU	22	45,5	40,9	13,6
NEU	6	50,0 (3/6)	33,3 (2/6)	16,7 (1/6)
NA	8	37,5 (3/8)	25,0 (2/8)	37,5 (3/8)
ANZ	5	40,0 (2/5)	20,0 (1/5)	40,0 (2/5)

4.2.2. Aufstallung

In allen untersuchten Besamungsstationen werden zur Absamung vorgesehene Bullen einzeln, bzw. in Anbindung gehalten. Wartebullen, Jungbullen und Bullen in der Quarantäne stehen z.T. auch in Gruppen.

16 deutsche Besamungsstationen (84,2%; 16/19) gaben an, ihre einzeln gehaltenen Bullen durch den alleinigen oder kombinierten Gebrauch von Halsriemen bzw. –ketten, Nasenring- oder Hornketten zeitweise oder ständig zu sichern.

In den anderen Mitgliedsländern der Europäischen Union benutzen 8 von 21 Betrieben (38,1%) derartige Maßnahmen zumindest bei einigen Bullen. 13 (61,9%; 13/22) Stationen fixieren ihre Bullen nicht. Ein Betrieb gab keine diesbezüglichen Auskünfte.

In der „NEU“-Gruppe überwiegt die Anbindehaltung.

In den „NA“ und „ANZ“-Gruppen werden in 4 bzw. 2 Stationen einige Bullen gesichert gehalten.

Tabelle 10: Sicherung von Bullen in internationalen Besamungsstationen:

Anbindehaltung (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	59	57,6	42,4
D	19	84,2	15,8
EU	21	38,1	61,9
NEU	6	66,7 (4/6)	33,3 (4/6)
NA	8	50,0 (4/8)	50,0 (4/8)
ANZ	5	40,0 (2/5)	60,0 (2/5)

In Deutschland stehen für Bullen in Anbindehaltung je nach Station 3,75m² bis 8,0m² zur Verfügung. Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD) betragen 5,6±2,1m². Bei Boxenhaltung schwanken die Werte zwischen 12,25m² und 22m² pro Tier (M±SD: 16,7±2,7m²).

In Betrieben anderer EU-Ländern sind Standplätze 1,65m² bis 7,5m² groß (M±SD: 4,1±2,1m²) und Boxen umfassen 10m² bis 72m² pro Tier (M±SD: 25,2±16,9 m²).

In der „NEU“-Gruppe sind Anbindeplätze zwischen 3m² und 6 m² groß (M±SD: 4,1±1,4m²). Bei Boxenhaltung stehen jedem Tier 10m² bis 40 m² zur Verfügung (M±SD: 20,8±13,7 m²).

Eine Besamungsstation der „NA“-Gruppe besitzt Freigehege mit 216m² pro Tier. Eine andere hält Bullen in Boxen mit 12m² pro Tier. Angaben über Standplatzgrößen in dieser Gruppe sind 2m² bzw. 3,1m².

In 4 der 5 Betriebe der „ANZ“ Gruppe werden Tiere einzeln in bis zu 2640m² großen Außengehegen gehalten. Die 5. Station weist Boxen mit 25m² auf.

In den jeweiligen geographischen Gruppen verwenden die einzelnen Betriebe unterschiedliche Materialien von **Einstreu** bzw. andere Methoden, die Einstreumaterialien ganz oder teilweise ersetzen.

Während alle deutschen Betriebe und sämtliche Stationen der „NEU“-Gruppe Stroh verwenden, werden in der „NA“-Gruppe Bullen zu 87,5% (7/8) auf Sägespänen bzw. –mehl und zu 12,5% (1/8) auf Sand gehalten. In 80% (4/5) der Betriebe der „ANZ“-Gruppe stehen die Tiere in Freigehegen ohne Einstreu. In der 5. Station kommen Sägespäne zum Einsatz.

In der „EU“- Gruppe wird in 77,3% (17/22) der Betriebe Stroh und in 40,9% (9/22) Sägemehl bzw. –späne benutzt. Eine englische Station hält Bullen auf Wasserbetten und je ein weiteres Besamungszentrum in England und der Tschechischen Republik verwendet Gummimatten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt. Aufgrund von Mehrfachnennungen ist die Summe der prozentualen Anteile in der „EU“-Gruppe und in Folge in der „Gesamt“-Gruppe größer als 100.

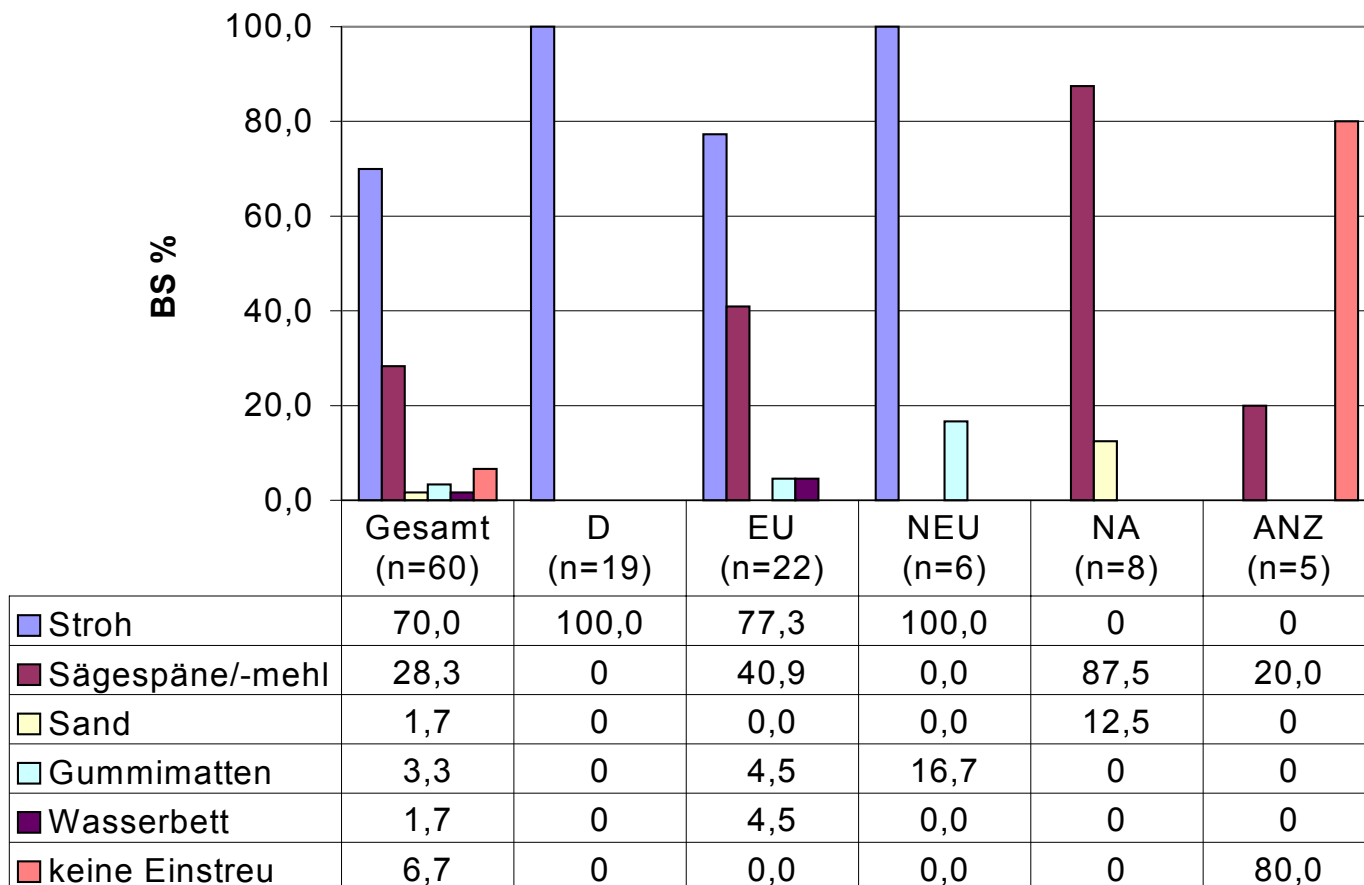


Abbildung 4: Einstreumaterialien oder einstreueretzende Methoden in internationalen Besamungsstationen (BS%)*

Mehrfachnennungen möglich;

BS%: prozentualer Anteil an Besamungsstationen, die ein bestimmtes Einstreumaterial bzw. einstreueretzende Materialien verwenden

Eine automatisierte oder teil-automatisierte Entmistung unter Einsatz von Stallschleppern o.ä. Geräten erfolgt in etwa zwei Dritteln aller deutscher Besamungsstationen (68,4%). Die entsprechenden Anteile in der „EU“-Gruppe und der „NA“-Gruppe sind 52,4% und 37,5%. Alle Betriebe der „NEU“-Gruppe führen die Entmistung rein manuell durch. Die Außengehege der „ANZ“-Gruppe werden entweder manuell oder überhaupt nicht gereinigt.

4.2.3. Fütterung

Die meisten Betriebe füttern ihre Zuchtbullen mit einer Mischung verschiedener Grundfuttersorten. Vier deutsche Stationen, sowie ein tschechischer und ein Schweizer Betrieb nennen nur Heu als Grundfutter, allerdings steht den Bullen auch eingestreutes Stroh zur Verfügung. Ein englischer und drei kanadische Betriebe verwenden ausschließlich Heu und je ein Betrieb in England, Dänemark und den Niederlanden nur Stroh. In Neuseeland stehen die Tiere in 3 von 4 Betrieben auf Grasweiden. Tabelle 11 listet die verschiedenen Grundfuttersorten auf und zeigt die prozentuale Verteilung in den geographischen Gruppen. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind die Summen der einzelnen Gruppen größer als 100.

Tabelle 11: In internationalen Besamungsstationen verwendetes Grundfutter (%)*

	n	Heu	Silage	Stroh	Gras
Gesamt	60	80,0	66,7	70,0	5,0
D	19	89,5	100,0	100,0	0,0
EU	22	63,6	54,5	77,3	0,0
NEU	6	100,0 (6/6)	50,0 (3/6)	100,0 (6/6)	0,0
NA	8	87,5 (7/8)	37,5 (3/8)	0,0	0,0
ANZ	5	80,0 (4/5)	60,0 (3/5)	0,0	60,0 (3/5)

*Mehrfachnennungen möglich

Ein großer Anteil der befragten Besamungsstationen gibt keine Auskünfte zur Verabreichung eines **Kraffutters** bzw. **Konzentrates** oder dessen Zusammensetzung. Einige Betriebe machen zwar Angaben darüber, ob ein Konzentrat verwendet wird, erläutern aber nicht dessen Inhaltsstoffe. Andere zählen die Inhaltsstoffe auf, nennen aber keine Werte bezüglich des Energie- und Proteingehaltes.

Die Tabellen 12 und 13 berücksichtigen die vorliegenden Angaben.

Die verwendeten Konzentrate gleichen sich in ihren Rohproteinanteilen.

Tabelle 12: Besamungsbullen-Fütterung: Rohproteingehalt (%), (M±SD)

	n	Rohprotein
Gesamt	34	15,1 ± 2,2
D	11	15,5 ± 2,7
EU	12	15,1 ± 1,3
NEU	4	15,1 ± 3,8
NA	5	14,6 ± 1,7
ANZ	2	13,3 ± 1,8

14 Besamungsstationen geben Auskunft zum Energiegehalt ihres Konzentratfutters. Neun geben die umsetzbare Energie (ME = metabolizable energy) an, fünf die Netto-Energie-Laktation (NEL). Die Angaben erfolgen in MJ/kg Futter-Trockensubstanz (TS).

Die umsetzbare Energie (ME) entspricht dem Bruttoenergiegehalt (GE = gross energy) abzüglich der unverdaulichen Energie, sowie der Verluste durch energiehaltige Ausscheidungen (Harn) und durch Gärgase. Die Netto-Energie-Laktation (NEL) entsteht durch Umwandlung der ME im Erhaltungsstoffwechsel unter Verlust von nicht nutzbarer thermischer Energie.

Die angegebenen NEL-Werte werden mit folgender Formel in ME-Werte umgerechnet (MEYER et al.1989):

$$\text{NEL (MJ/kg TS)} = k_1 (1 + 0,004(q-57)) \text{ ME (MJ/kg)} = \mathbf{0,6432 \text{ ME (MJ/kg TS)}}$$

k_1 : Teilwirkungsgrad der ME = 0,6

q: Umsetzbarkeit der Energie, für Getreideprodukte = 75

$$\Rightarrow \mathbf{ME (MJ/kg TS) = 1,555 \text{ NEL (MJ/kg TS)}}$$

Tabelle 13: Besamungsbullen-Fütterung: Gehalt an umsetzbarer Energie: ME (MJ/kg TS), (M±SD)

	n	ME
Gesamt	15	9,7 ± 1,2
D	8	9,7 ± 1,2
EU	2	10,2 ± 0,3
NEU	4	9,4 ± 1,8
ANZ	1	10,0 ± 0,0

Der Anteil der Betriebe, der zusätzliche Mineralmischungen verabreicht, beträgt in Deutschland 89,5%, in der „EU“- Gruppe 70%, in der „ANZ“- Gruppe 33,3% und in der „NEU“-, sowie der „NA“- Gruppe 100%.

84,2% der deutschen Betriebe, 60% der Stationen der „EU“- und der „ANZ“- Gruppe, sowie alle Betriebe der „NEU“- und der „NA“- Gruppe geben ihren Bullen Vitaminergänzungen. Drei deutsche Stationen und ein Schweizer Betrieb füttern zudem β -Carotin. Ein weiteres deutsches Besamungszentrum gibt Hefe, ein tschechischer Betrieb L-Carnithin und eine englische Station Olivenöl. Ein kanadischer Betrieb verabreicht bei Einstellung zusätzlich eine Vitamininjektion (A,D und E).

Mit Ausnahme einer deutschen Besamungsstation, in der Wasser zweimal täglich zugeteilt wird, bieten alle Stationen Wasser ad libitum.

Tabelle 14: Besamungsstationen mit Vitamin- und Mineralienergänzungen (%)

	n	Mineralienergänzung		Vitaminergänzung	
		Ja	Nein	Ja	Nein
Gesamt	55	81,8	18,2	76,4	23,6
D	19	89,5	10,5	84,2	15,8
EU	20	70,0	30,0	60,0	40,0
NEU	6	100,0 (6/6)	0,0	100,0 (6/6)	0,0
NA	7	100,0 (7/7)	0,0	100,0 (7/7)	0,0
ANZ	3	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)

4.2.4. Pflege

Es wurde die Durchführung verschiedener Pflegemaßnahmen ermittelt. Die hinterfragten Maßnahmen umfassten: Klauenkorrekturen, Haarklippen, Trockenreinigung, Nassreinigung, sowie Kürzen der Präputialbehaarung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Internationale Besamungsstationen: Allgemeine Bullenpflege (%)

	n	KK	HK	TR	NR	PHK
Gesamt	60	95,0	73,3	63,3	86,7	86,7
D	19	100,0	57,9	52,6	100,0	94,7
EU	22	90,9	72,7	63,6	72,7	72,7
NEU	6	100,0 (6/6)	100,0 (6/6)	66,7 (4/6)	100,0 (6/6)	83,3 (5/6)
NA	8	100,0 (8/8)	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)	100,0 (8/8)
ANZ	5	80,0 (4/5)	80,0 (4/5)	60,0 (3/5)	80,0 (4/5)	100,0 (5/5)

KK: Klauenkorrektur

HK: Haarklippen

TR: Trockenreinigung

NR: Nassreinigung

PHK: Präputialhaarkürzung

4.3. Samengewinnung

4.3.1. Sprungplatz

Mit Ausnahme eines englischen Betriebes besitzen alle Besamungsstationen einen überdachten, wettergeschützten Sprung- oder Absamungsplatz („Indoor“). Eine Reihe von Stationen weist zudem im Freien gelegene Absamungsbereiche auf („Outdoor“). Die prozentualen Anteile sind in Tabelle 16 wieder gegeben. Aufgrund von Mehrfachnennungen ist die Summe der Anteile der einzelnen Gruppen größer als 100.

Tabelle 16: Lage des Sprungplatzes in befragten Besamungsstationen (%)*

	n	„Outdoor“ (%)	„Indoor“ (%)
Gesamt	59	49,2	98,3
D	19	52,6	100,0
EU	21	47,6	95,2
NEU	6	50,0 (3/6)	100,0 (6/6)
NA	8	25,0 (2/8)	100,0 (8/8)
ANZ	5	80,0 (4/5)	100,0 (5/5)

*Mehrfachnennungen möglich

Die durchschnittliche **Größe** des Sprungplatzes beträgt in Deutschland 188 m², in der „EU“-Gruppe 299 m², in der „NEU“- Gruppe 146 m², in der „NA“-Gruppe 374 m² und in der „ANZ“- Gruppe 329 m². Allerdings bestehen innerhalb der einzelnen Gruppen große Schwankungen. So misst der kleinste deutsche Sprungplatz 20 m², der größte 500 m². In den anderen Mitgliedsländern der EU weist der Sprungplatz einer österreichischen Station mit 18 m² die kleinsten und der einer irischen Station mit 900 m² die größten Ausmaße auf. Ein kanadischer Absamungsplatz ist 2000 m² groß.

Die meisten Sprungplätze weisen **Fußböden** aus Beton, Bitumen oder Asphalt auf, die entweder allein oder in Kombination mit Kunststoff- oder Gummimatten verwendet werden. Ein englischer Betrieb setzt Kokosnussmatten ein. In einer deutschen Station wurden spezielle Fliesen und in einer anderen ein Teerbelag angebracht. In den finnischen Stationen wurden die Oberflächenmaterialien Epoxyd und Acryl eingesetzt. Ein Epoxydbelag findet sich auch in einer Station in Frankreich. Je eine Station in England, Italien, den Niederlanden sowie den USA führen ihre Absamungen auf Sandböden durch.

Tabelle 17: Sprungplätze in internationalen Besamungsstationen: Bödenbeläge (%)*

	n	BBA	GK	Sand	Sonst.
Gesamt	60	75,0	58,3	11,7	10,0
D	19	84,2	57,9	0,0	10,5
EU	22	63,6	54,5	22,7	18,2
NEU	6	100,0 (6/6)	66,7 (4/6)	0,0	0,0
NA	8	62,5 (5/8)	37,5 (3/8)	12,5 (1/8)	0,0
ANZ	5	80,0 (4/5)	100,0 (5/5)	20,0 (1/5)	0,0

BBA = Beton, Bitumen, Asphalt

GK= Gummi-, Kunststoffmatten

Sonstige Beläge: Teer, Akryl, Epoxyd, Kokosnussmatte

*Mehrfachnennungen möglich

Um ein Ausrutschen der Tiere zu vermeiden, streuen einige Betriebe im Absamungsbereich zusätzlich Sand oder Sägespäne.

Tabelle 18: Internationale Besamungsstationen: Verwendung zusätzlicher Einstreu im Absamungsbereich (%)*

	n	Sand	Sägespäne
Gesamt	55	32,7	16,4
D	17	5,9	5,9
EU	20	35,0	5,0
NEU	6	50,0 (3/6)	0,0
NA	7	85,7 (6/7)	71,4 (5/7)
ANZ	5	20,0 (1/5)	40,0 (2/5)

*Mehrfachnennungen möglich

4.3.2. Absamungsausrüstung

Zur Spermagewinnung eingesetzte **künstliche Scheiden** sind überwiegend mit Wasser oder Wasser und Luft gefüllt. Allerdings verwenden 2 finnische, sowie ein deutscher, ein österreichischer und ein niederländischer Betrieb künstliche Scheiden, die ausschließlich Luft enthalten.

Tabelle 19: Verwendung von Wasser und/oder Luft zur Füllung der künstlichen Scheiden in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Wasser	Luft	Wasser und Luft
Gesamt	60	61,7	8,3	30,0
D	19	73,7	5,3	21,1
EU	22	63,6	18,2	18,2
NEU	6	50 (3/3)	0	50 (3/3)
NA	8	62,5 (5/8)	0	37,5 (3/8)
ANZ	5	20 (1/5)	0	80 (4/5)

Ermittelt wurde auch die Temperatur der künstlichen Scheiden zum Zeitpunkt der Samengewinnung. Sofern in den Antworten Temperaturbereiche angegeben wurden, wurden die oberen Werte in die Berechnung einbezogen. Also z.B. „42°C“ bei einem angegebenen Spektrum von „40°C bis 42°C“. Als Einheit wurde Grad Celsius gewählt.

In Fahrenheit angegebene Temperaturen wurden mit Hilfe folgender Formel umgerechnet (HAAS 1988):

$$\text{T-Celsius (}^{\circ}\text{C)} = (\text{T-Fahrenheit (F)} - 32) \times 5/9$$

Die mit „36°C“ am niedrigsten temperierten Scheiden setzt eine Station in der Schweiz ein. Die höchsten Temperaturen finden sich in einem amerikanischen Besamungsunternehmen. Hier werden künstliche Scheiden mit 63 °C verwendet.

Tabelle 20: Durchschnittliche Temperatur der in internationalen Besamungszentren verwendeten künstlichen Scheiden, zum Zeitpunkt der Samenentnahme (C°) (M±SD)

	n	C°
Gesamt	60	42,9 ± 5,1
D	19	40,4 ± 1,3
EU	22	42,6 ± 4,3
NEU	6	40,7 ± 3,2
NA	8	49,5 ± 6,7
ANZ	5	46,0 ± 7,4

Um dem Penis beim Eindringen in die künstliche Scheide möglichst wenig Widerstand und Reibung entgegenzusetzen, feuchten 78,3% aller untersuchten Besamungszentren den Scheideninnenraum mit einem **Gleitmittel** an.

Tabelle 21: Verwendung von Gleitmitteln bei der Samenentnahme in internationalen Besamungsstationen (%):

	n	Ja	Nein
Gesamt	60	78,3	21,7
D	19	68,4	31,6
EU	22	77,3	22,7
NEU	6	50 (3/6)	50 (3/6)
NA	8	100 (8/8)	0
ANZ	5	100 (5/5)	0

Als Gleitmittel werden verschiedene Produkte verwendet. 31,7% aller Unternehmen verwenden Erzeugnisse auf Basis von gesättigten Kohlenwasserstoffverbindungen, wie z.B. Vaseline. 20% der Betriebe benützen Produkte auf Propylenglykolbasis wie

z.B. KY-Lubricant®. Vier deutsche Stationen feuchten den Scheideninnenraum mit einigen Tropfen Spermaverdünner an. In Tabelle 22 sind die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Tabelle 22: Gleitmittel, die in internationalen Besamungszentren verwendet werden (%)*

	n	SV	CH	PG	S
Gesamt	60	6,7	31,7	20,0	21,7
D	19	21,1	31,6	5,3	10,5
EU	22	0,0	40,9	22,7	9,1
NEU	6	0,0	33,3 (2/6)	0,0	16,7 (1/6)
NA	8	0,0	25,0 (2/8)	75,0 (6/8)	25,0 (2/8)
ANZ	5	0,0	20,0 (1/5)	40,0 (2/5)	40,0 (2/5)

SV: Spermaverdünner

CH: gesättigte Kohlenwasserstoffverbindungen, z.B. Vaseline

PG: wasserlösliche Verbindungen auf Propylenglykolbasis, z.B. KY-Lubrikant®

Sonstige: Gleitmittel eigener Rezeptur, nicht näher bezeichnete Gele

*Mehrfachnennungen möglich

Um temperaturbedingte Schädigungen des Ejakulates zu vermeiden, werden in 83,1% der Betriebe die Spermaauffanggläser während und nach der Samengewinnung mit **Warmhaltebeuteln** oder anderen isolierenden Hüllen geschützt. Der Anteil der Betriebe, die derartige Schutzhüllen nicht verwenden, ist in der „D“-Gruppe am größten.

Tabelle 23: Verwendung von Schutzhüllen und Warmhaltebeuteln bei der Samenentnahme auf internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	59	83,1	16,9
D	19	63,2	36,8
EU	21	90,5	9,5
NEU	6	100,0 (6/6)	0,0
NA	8	100,0 (8/8)	0,0
ANZ	5	80,0 (4/5)	20,0 (1/5)

Elektroejakulatoren werden in keiner deutschen Station und ebenso wenig in der Mehrzahl der Stationen der „EU“- und der „NEU“-Gruppe verwendet. Dagegen

setzen die Mehrzahl der Betriebe der „NA“- und der „ANZ“-Gruppe Elektroejakulatoren gelegentlich oder regelmäßig ein.

Tabelle 24: Einsatz von Elektroejakulatoren auf internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	60	23,3	76,7
D	19	0,0	100,0
EU	22	18,2	81,8
NEU	6	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)
NA	8	75 (6/8)	25 (2/8)
ANZ	5	60 (3/5)	40 (2/5)

Der Gebrauch von **Phantomen** als Aufsprungpartner ist unterschiedlich verbreitet. Während von den deutschen Besamungsstationen 83,3% ein Phantom aufweisen, beträgt der Anteil in der „EU“-Gruppe 54,5% und in der „NEU“-Gruppe nur 33,3%. In Betrieben der „NA“- und der „ANZ“- Gruppe werden keine Phantome verwendet. In Tabelle 25 ist die Verwendung von Phantomen in den jeweiligen geographischen Gruppen dargestellt.

Tabelle 25: Verwendung von Phantomen in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	59	49,2	50,8
D	18	83,3	16,7
EU	22	54,5	45,5
NEU	6	33,3 (2/6)	66,6 (4/6)
NA	8	0,0	100,0 (8/8)
ANZ	5	0,0	100,0 (5/5)

Zusätzlich oder anstelle von Phantomen setzen alle befragten Besamungszentren andere Bullen als **Sprungpartner** ein. Diese werden entweder als Standbullen gehalten oder befinden sich als Warte- oder Produktionsbullen in der Station. Kastrierte Standbullen werden von allen Betrieben der „NA“- und der „ANZ“- Gruppe, sowie allen untersuchten britischen und französischen Stationen verwendet. Von den 19 deutschen Stationen hält nur eine Kastraten.

Weibliche Rinder werden lediglich in 18,2% (4/22) der Besamungszentren der „EU“-Gruppe, sowie in 60% (3/5) der Betriebe der „ANZ“-Gruppe, nicht aber in den anderen Gruppen gehalten. Tabelle 26 zeigt die prozentualen Ergebnisse. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind die Summen der einzelnen Gruppen größer als 100.

Tabelle 26: Verwendung verschiedener Sprungpartner in internationalen Besamungszentren (%)*

	n	Bullen (%)	Kastraten (%)	Weibliche Rinder (%)
Gesamt	60	100,0	41,7	11,7
D	19	100,0	5,3	0,0
EU	22	100,0	45,5	18,2
NEU	6	100,0 (6/6)	16,7 (1/6)	0,0
NA	8	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)	0,0
ANZ	5	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)	60,0 (3/5)

*Mehrfachnennungen möglich

4.3.3. Organisation

In allen untersuchten Besamungsstationen werden die Bullen gewöhnlich am Vormittag abgesamt. Ein **Absamungsplan**, der die abzusamenden Bullen aufführt, ist in 70% aller Stationen im Sprungraum ausgehängt. In 63,3% der Betriebe ist derselbe Plan auch im Labor vorhanden. Deutschland weist mit 68,4% den größten Anteil an Besamungsstationen auf, bei denen die im Plan vorgegebene Reihenfolge der tatsächlichen Absamungsabfolge entspricht.

Tabelle 27: Besamungsstationen, bei denen ein Absamungsplan in Sprungraum und Labor sichtbar ist (%); Anteil der Stationen, in denen der Plan die tatsächliche Absamungsabfolge festlegt (%)

	N	Sprungraum	Labor	Festlegung der Reihenfolge
Gesamt	60	70,0	63,3	48,3
D	19	68,4	57,9	68,4
EU	22	63,6	59,1	45,5
NEU	6	83,3 (5/6)	83,3 (5/6)	33,3 (2/6)
NA	8	75,0 (6/8)	75,0 (6/8)	37,5 (3/8)
ANZ	5	80,0 (4/5)	60,0 (3/5)	20,0 (1/5)

Samennehmer bzw. spermagewinnende Personen oder „Operateure“ sind in den meisten Fällen Tierpfleger, Techniker oder Facharbeiter, in einigen Betrieben auch Tierärzte und Veterinär- oder Agraringenieure. Als weitere Samennehmer werden Laborpersonal, Studenten und die Betriebsleiter genannt. Tabelle 28 enthält die prozentualen Anteile. Aufgrund von Mehrfachnennungen ist die Summe je geographischer Gruppe größer als 100.

Tabelle 28: Qualifikation der Samennehmer in internationalen Besamungsstationen (%)*

	n	Tierpfleger, Techniker, Facharbeiter	Tierärzte, Ingenieure	Sonstige
Gesamt	60	88,3	15,0	11,7
D	19	89,5	31,6	5,3
EU	22	90,9	9,1	9,1
NEU	6	66,7 (4/6)	0,0	50,0 (3/6)
NA	8	100,0 (8/8)	0,0	0,0
ANZ	5	80,0 (4/5)	20,0 (1/5)	20,0 (1/5)

Sonstige: Betriebsleiter, Laborpersonal, Studenten

*Mehrfachnennungen möglich

4.3.4. Bullenidentifikation und –sicherung

Abzusamende Bullen werde durch Namen, Nummern, Ohrmarken, (Kalt-) Brandnummern, sowie elektronische Transponder identifiziert. Dabei verwenden die meisten Besamungszentren eine Kombination der drei erst genannten Identifikationsmöglichkeiten. Brandnummern werden in allen Betrieben der „ANZ“-Gruppe, sowie in einer französischen und einer irischen Station verwendet. Über elektronische Transponder verfügen lediglich derselbe französische Betrieb, sowie eine italienische und eine Schweizer Station.

Tabelle 29: Bullen-Identifikation in internationalen Besamungszentren (%)*

	n	Name	Nummer	Ohrmarke	(Kalt-)Brand	Transponder
Gesamt	60	90,0	66,7	81,7	11,7	6,7
D	19	94,7	57,9	73,7	0,0	5,3
EU	22	90,9	54,5	77,3	9,1	9,1
NEU	6	100,0 (6/6)	83,3 (5/6)	83,3 (5/6)	0,0	16,7 (1/6)
NA	8	100,0 (8/8)	87,5 (7/8)	100,0 (8/8)	0,0	0,0
ANZ	5	40,0 (2/5)	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)	0,0

*Mehrfachnennungen möglich

Produktionsbullen tragen in der Regel ein bis zwei **Nasenringe**. Nur an einer tschechischen Station werden mitunter 3 Nasenringe und an einer australischen Station bei einem Teil der Bullen keine Nasenringe eingezogen. In der Mehrzahl der Betriebe werden Bullen durch einen oder zwei Tierpfleger geführt. Zur Sicherung der Tiere werden Nasenstricke, Halfter und Führstangen verwendet.

Tabelle 30: Bullen-Sicherung in internationalen Besamungsstationen (%)*

	n	Halfter	Nasestrick	Führstange
Gesamt	60	60,0	86,7	45,0
D	19	57,9	89,5	73,7
EU	22	54,5	86,4	40,9
NEU	6	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)	50,0 (3/3)
NA	8	87,5 (7/8)	87,5 (7/8)	12,5 (1/8)
ANZ	5	100,0 (5/5)	80,0 (4/5)	0,0

*Mehrfachnennungen möglich

Von Bullen in deutschen Besamungsstationen wird im Durchschnitt pro Woche $2,4 \pm 0,7$ Mal Sperma gewonnen. Seltener kommen Bullen in Besamungsstationen in Portugal (2), Österreich ($2,3 \pm 0,5$) und Irland ($2,3 \pm 0,8$) zum Einsatz. Die meisten Absamungen pro Einzeltier und Woche werden in Italien (10) und Frankreich ($7,0 \pm 1,4$) durchgeführt.

In Tabelle 31 werden die wöchentlich durchgeführten Absamungen pro erwachsenem Bullen dargestellt. Da innerhalb der einzelnen geographischen Gruppen größere Schwankungen auftreten, sind in Tabelle 32 zusätzlich die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) für die einzelnen Länder gezeigt.

Tabelle 31: Einzeltierabsamungen pro Woche auf internationalen Besamungsstationen (M±SD)

	n	Absamungen pro Woche
Gesamt	60	3,7 ± 2,1
D	19	2,4 ± 0,7
EU	22	3,5 ± 2,2
NEU	6	4,8 ± 2,1
NA	8	5,6 ± 1,1
ANZ	5	5,6 ± 2,5

Tabelle 32: Einzeltierabsamungen pro Woche auf internationalen Besamungsstationen (M±SD), Länderverteilung

	n	Absamungen pro Woche
Deutschland	19	2,4 ± 0,7
Dänemark	1	3,0
Finnland	2	4,0 ± 0
Frankreich	2	7,0 ± 1,4
Großbritannien	4	2,6 ± 1,1
Irland	3	2,3 ± 0,8
Italien	1	10,0
Niederlande	2	2,8 ± 0,4
Österreich	4	2,3 ± 0,5
Portugal	1	2,0
Polen	2	6,5 ± 3,5
Schweiz	2	4,3 ± 0,4
Tschechei	2	3,5 ± 0,7
Kanada	4	5,3 ± 1,0
USA	4	5,8 ± 1,3
Australien	1	3,8
Neuseeland	4	6,1 ± 2,6

Auch bezüglich der Dauer der sexuellen **Stimulations-** oder **Vorbereitungszeit**, die der Spermagewinnung vorausgeht, bestehen zwischen den Stationen erhebliche Unterschiede.

In Deutschland beträgt die kürzeste Anreizperiode 1 min, die längste 150 min. In einem niederländischen Betrieb werden bis zu 3h auf einen einzelnen Bullen verwendet. Dagegen gewinnen die Samennehmer einer australischen Station Ejakulate zum Teil bereits nach einer 30-sekündigen Vorbereitungszeit.

Es wurde nach der durchschnittlichen, sowie der maximalen und der minimalen Anreizdauer gefragt.

In den Tabellen 33 und 34 sind die Mittelwerte (M) und die Standardabweichungen (SD) der geographischen Gruppen bzw. der einzelnen Länder dargestellt.

Tabelle 33: Anreizdauer vor Samenentnahme in internationalen Besamungsstationen: minimale, maximale und durchschnittliche Zeitspanne (min); Verteilung der geographischen Gruppen (M±SD)

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt
Gesamt	53	4,8 ± 3,1	30,6 ± 35,2	8,3 ± 4,5
D	19	4,1 ± 1,5	25,9 ± 33,8	6,4 ± 2,5
EU	20	5,9 ± 4,0	30,6 ± 39,3	10,6 ± 5,9
NEU	6	3,8 ± 1,8	20,8 ± 7,4	9,1 ± 4,8
NA	8	4,9 ± 2,7	39,3 ± 39,8	8,8 ± 4,3
ANZ	5	4,3 ± 3,8	45,0 ± 42,1	6,6 ± 3,1

Tabelle 34: Anreizdauer vor Samenentnahme in internationalen Besamungsstationen: minimale, maximale und durchschnittliche Zeitspanne (min); Länderverteilung (M±SD)

	n	Minimum	Maximum	Durchschnitt
Deutschland	19	4,1 ± 1,5	25,9 ± 33,8	6,4 ± 2,5
Dänemark	1	10,0	20,0	15,0
Finnland	2	4,0 ± 1,4	20,0 ± 14,1	5,0 ± 0,0
Frankreich	2	7,5 ± 3,5	16,0 ± 19,8	15,0 ± 0,0
Großbritannien	5	8,4 ± 5,0	35,0 ± 26,0	15,0
Irland	3	3,3 ± 2,1	18,3 ± 10,4	15,0
Italien	1	5,0	30,0	15,0
Niederlande	2	10 ± 0,0	112 ± 95,5	16,0 ± 5,7
Österreich	3	1,7 ± 1,2	6,7 ± 2,9	3,7 ± 1,5
Portugal	1	2,0	15,0	5,0
Polen	2	5,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	10 ± 0,0
Schweiz	2	3,5 ± 2,1	22,5 ± 10,6	10,0 ± 7,1
Tschechei	2	3,0 ± 2,8	25,0 ± 7,1	7,8 ± 6,0
Kanada	4	3,3 ± 2,1	18,8 ± 13,1	7,0 ± 3,6
USA	4	6,5 ± 2,4	66,7 ± 50,3	11,5 ± 4,9
Australien	1	0,5	5,0	2,0
Neuseeland	4	5,3 ± 3,7	55,0 ± 41,2	7,8 ± 2,1

Teil der sexuellen Vorbereitung ist die Durchführung von **Blindsprüngen**, bei denen der abzusamende Bulle zwar auf das Phantom oder den Standpartner aufspringt, aber nicht ejakuliert. In Deutschland werden in der Regel ein bis zwei, seltener 3, Blindsprünge durchgeführt. In einem österreichischen Betrieb werden überhaupt keine oder nur ein Blindsprung durchgeführt. Dagegen werden die Bullen in je einer englischen und einer irischen Station nach 5 und in einer weiteren englischen Station sogar erst nach 6 Blindsprüngen abgesamt.

Tabelle 35: Durchschnittliche Anzahl Blindsprünge in internationalen Besamungsstationen: Verteilung der geographischen Gruppen (M±SD)

	n	Blindsprünge
Gesamt	59	2,3 ± 1,0
D	18	2,1 ± 0,5
EU	22	2,5 ± 1,4
NEU	6	2,2 ± 0,6
NA	8	2,6 ± 0,4
ANZ	5	2,1 ± 0,7

Tabelle 36: Durchschnittliche Anzahl Blindsprünge in internationalen Besamungsstationen: Länderverteilung (M±SD)

	n	Blindsprünge
Deutschland	19	2,1 ± 0,5
Dänemark	1	2,5
Finnland	2	2,5 ± 0,7
Frankreich	2	3,0 ± 0,7
Großbritannien	5	3,5 ± 1,9
Irland	3	3,0 ± 2,0
Italien	1	1,0
Niederlande	2	3,0 ± 0,0
Österreich	5	1,2 ± 0,6
Portugal	1	2,0
Polen	2	2,3 ± 0,4
Schweiz	2	2,8 ± 0,4
Tschechei	2	1,5 ± 0,0
Kanada	4	2,4 ± 0,5
USA	4	2,8 ± 0,3
Australien	1	2,0
Neuseeland	4	2,1 ± 0,9

4.3.5. Samengewinnung außerhalb der Besamungsstation

In 21,7% der untersuchten Stationen werden Absamungen in anderen Betrieben und in 23,3% in den stationseigenen Isolationsställen durchgeführt. Spermagewinnung außerhalb der eigentlichen Besamungsstation ist in der „NEU“- Gruppe am wenigsten und in der „ANZ“- Gruppe am weitesten verbreitet.

Tabelle 37: Samengewinnungen außerhalb der Besamungsstation (%)

	n	Absamungen auch in anderen Betrieben	Absamungen auch in den Isolationsställen
Gesamt	60	21,7	23,3
D	19	26,3	15,8
EU	22	22,7	22,7
NEU	6	0	16,7 (1/6)
NA	8	12,5 (1/8)	25 (2/8)
ANZ	5	40 (2/5)	60 (3/5)

23 Betriebe, die Sperma in den Isolationsställen und/oder in anderen Betrieben gewinnen, machten Angaben dazu, ob dieses im selben Labor beurteilt und verarbeitet wird, wie innerhalb der Station gesammeltes. In 12 der 23 Betriebe (52,2%) findet die Beurteilung und Verarbeitung im selben Labor statt, die übrigen 11 Stationen verfügen über getrennte Laboreinrichtungen.

Tabelle 38: Anteil der Besamungsstationen, die außerhalb und innerhalb der Station gewonnenes Sperma im selben Labor beurteilen und verarbeiten (%)

	n	Beurteilung und Verarbeitung im selben Labor
Gesamt	23	52,2 (12/23)
D	6	33,3 (2/6)
EU	9	55,6 (5/9)
NEU	1	0
NA	3	33,3 (1/3)
ANZ	4	100 (4/4)

4.4. Spermabeurteilung und –verarbeitung

4.4.1. Beurteilung von Frischsperma

Das **Volumen** der gesammelten Ejakulate wird in allen befragten Besamungszentren in betriebseigenen Laboratorien bestimmt. In 74,6% der Unternehmen geschieht dies durch Ablesen des graduierten Sperma-Auffangglases. Die übrigen Betriebe errechnen das Volumen über das Gewicht. Dabei setzen einige Labore Ejakulat-Gewicht und –Volumen einander gleich. Andere Stationen multiplizieren den Gewichts-Wert mit einem bestimmten Faktor, der im jeweiligen Labor auf alle Ejakulate angewendet wird. So verwenden die beiden französischen und ein Schweizer Betrieb den Faktor „0,952“ , ein englischer Betrieb „0,96“ und ein dänischer „0,935“. Ein niederländischer Betrieb multipliziert das Gewicht mit „1,02“ und ein amerikanischer mit „1,1“.

Tabelle 39: Methodik der Bestimmung des Ejakulat-Volumens in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Gewicht	Graduiertes Sperma-Auffangglas
Gesamt	59	25,4	74,6
D	19	10,5	89,5
EU	22	27,3	72,7
NEU	6	33,3 (2/6)	66,7 (4/6)
NA	7	42,9 (3/7)	57,1 (4/7)
ANZ	5	40,0 (2/5)	60,0 (3/5)

45 Besamungszentren gaben Auskünfte über die Mindestanforderungen, welche an das Volumen eines Ejakulates gestellt werden. Die von den einzelnen Stationen angegebenen Grenzwerte liegen zwischen 0,5ml und 3 ml je gesammeltem Ejakulat.

Tabelle 40: Durchschnittswerte für Mindestanforderungen, die in den jeweiligen Besamungsstationen an die Größe des Ejakulat-Volumens (ml) gestellt werden (M±SD)

	n	Volumen
Gesamt	45	1,6 ± 0,7
D	16	1,7 ± 0,8
EU	16	1,6 ± 0,5
NEU	6	2,0 ± 0,6
NA	4	0,6 ± 0,3
ANZ	3	1,5 ± 0,9

Auch die Spermien-**Konzentration** wird in allen Laboren bestimmt. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle geschieht dies mit der Hilfe von Photometern (85,7%) oder Partikelzählgeräten (Cell Counter) (12,5%). Daneben werden auch andere Bestimmungsmethoden angewendet. Ein dänisches Labor benutzt ein Durchflusszytometer (Flow Cytometer) und eine neuseeländische Station eine Zählkammer. In einem australischen Betrieb wird die Konzentration ausschließlich durch visuelle Schätzung bestimmt.

Tabelle 41: Methoden zur Bestimmung der Spermienkonzentration in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	PM	CC	ZK	FC	VS
Gesamt	56	85,7	12,5	1,8	1,8	1,8
D	18	83,3	33,3	0,0	0,0	0,0
EU	21	81,0	4,8	0,0	4,8	0,0
NEU	6	100,0 (6/6)	0,0	0,0	0,0	0,0
NA	7	100,0 (7/7)	0,0	0,0	0,0	0,0
ANZ	5	60,0 (3/5)	0,0	20,0 (1/5)	0,0	20,0 (1/5)

PM: Photometer

CC: Partikelzählgeräte (Cell Counter)

ZK: Zählkammer

FC: Durchflusszytometer (Flow Cytometer)

VS: Visuelle Schätzung

Bezüglich der Spermienkonzentration, die für verwertbare Portionen benötigt werden, wurden von 39 europäischen Stationen Mindestwerte angegeben, die zwischen 300 und 800 Millionen Spermien je ml Ejakulat liegen. Betriebe der „NA“- und der „ANZ“-

Gruppe machten keine auswertbaren Angaben. In Tabelle 42 sind die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der europäischen Stationen dargestellt.

Tabelle 42: Mindestanforderungen, die in den jeweiligen Besamungsstationen an die Spermienkonzentration ($\times 10^6/\text{ml}$) gestellt werden (M \pm SD)

	n	Konzentration
Gesamt	39	544 \pm 155,3
D	18	562 \pm 162,8
EU	16	500 \pm 189,7
NEU	5	540 \pm 89,4

Als „**Massenbewegung**“ wird die unter dem Mikroskop sichtbare wellenförmige Bewegung der Gesamtheit der Spermien in einem Tropfen unverdünnten Spermas bezeichnet, wobei die Untersuchung ohne die Verwendung eines Deckglases durchgeführt wird.

Während die meisten deutschen Rinderzuchtstationen (63,2%; 12/19) und die Mehrzahl der Betriebe der „EU“- (77,3%; 17/22) und der „NEU“-Gruppe (66,7%; 4/6) die Massenbewegung bestimmen, geschieht dies nur in 42,9% bzw. 40% der Betriebe der „NA“- und „ANZ“- Gruppe.

Tabelle 43: Besamungsstationen, in denen die Massenbewegung der Spermien eines Ejakulates bestimmt wird (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	59	64,4	35,6
D	19	63,2	36,8
EU	22	77,3	22,7
NEU	6	66,7 (4/6)	33,3 (2/6)
NA	7	42,9 (3/7)	57,1 (4/7)
ANZ	5	40,0 (2/5)	60,0 (3/5)

Um die an die Intensität der Massenbewegung gestellten Mindestanforderungen erheben zu können, wurde ermittelt ab welchem Wert einer sechsstufigen Skala (0-5) ein untersuchtes Ejakulat als verarbeitungswürdig akzeptiert wird.

In der vorgegebenen Skala entspricht die Bewertung „0“ dem Fehlen jeglicher Wellenbewegung. Mit steigendem Wert liegen zunehmend lebhaftere

Massenbewegungen vor. Der Maximalwert „5“ beschreibt eine sehr intensive Wellen- und Wirbelbewegung. Die Grenzwerte liegen in der Regel um die Bewertungsstufe „3“, allerdings akzeptieren 3 europäische Stationen bereits Sperma in der Stufe „1“. In 3 anderen europäischen, sowie in einer neuseeländischen Station hingegen, wird nur Sperma der Bewertungsstufe „4“ oder besser verarbeitet.

Tabelle 44: Durchschnittswerte für Mindestanforderungen, die in den jeweiligen Besamungsstationen an die Massenbewegung der Spermien eines Ejakulates gestellt werden (M±SD)

	n	Massenbewegung
Gesamt	30	3,0 ± 0,7
D	9	2,9 ± 0,7
EU	16	3,3 ± 0,6
NEU	2	2,5 ± 0,7
NA	1	3
ANZ	2	3,5 ± 0,7

Bewertungsskala: Stufe 0: Fehlen jeglicher Massenbewegung
 Stufe 1: langsame Wellenbewegung
 Stufe 2: langsame bis lebhafte Wellenbewegung
 Stufe 3: lebhafte Wellenbewegung
 Stufe 4: lebhafte bis intensive Wellenbewegung
 Stufe 5: intensive Wellen- und Wirbelbewegung

In 94,9% aller Besamungsstationen wird die **Vorwärtsbeweglichkeit** oder **Motilität** bestimmt, d.h. der Prozentsatz der Spermien, der sich aktiv vorwärts bewegt, wobei an Ort und Stelle bewegliche Spermien und solche mit kreisförmigen Bewegungen nicht in die Schätzung einbezogen werden.

Tabelle 45: Besamungsstationen, in denen die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien eines Ejakulates bestimmt wird (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	59,0	94,9	5,1
D	19	94,7	5,3
EU	22	90,9	9,1
NEU	6	100,0 (6/6)	0,0
NA	7	100,0 (7/7)	0,0
ANZ	5	100,0 (5/5)	0,0

In deutschen Besamungsstationen muss Sperma eine Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 50 – 80% aufweisen. International werden die höchsten Anforderungen in je einem Betrieb in Frankreich (85%), Portugal (80%) und Neuseeland (85%) gestellt. Niedrigere Anforderungen weisen zwei englische (50%), eine österreichische (50%) und eine kanadische Station (45%) auf. Ein weiterer französischer Betrieb verarbeitet auch Sperma mit nur 25% Motilität.

Tabelle 46 zeigt die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD), die für die entsprechenden Mindestanforderungen erhoben werden konnten.

Tabelle 46: Mindestanforderungen, die in den jeweiligen Besamungsstationen an die Mindestanforderungen (%) gestellt werden (M±SD)

	n	Vorwärtsbeweglichkeit (%)
Gesamt	55	64,7 ± 10,0
D	18	65,6 ± 7,6
EU	20	62,5 ± 12,8
NEU	5	70,0 ± 0
NA	6	60,0 ± 8,9
ANZ	6	70,0 ± 9,4

Zur **Spermienmorphologie** gaben zwei Besamungszentren keine Auskunft. 51 der übrigen 58 Zentren (87,9%) führen morphologische Untersuchungen durch. Dabei wird in 13 der Laboratorien (22,4%) Sperma vor der Beurteilung lediglich fixiert. In 17 Labors (29,3%) werden Färbungen angefertigt. 21 Betriebe (36,2%) machen keine Angaben zur Untersuchungsmethode oder geben an, morphologische Untersuchungen in Fremdlabors durchführen zu lassen. Zur Flüssigfixation werden in der Regel Formaldehyd-Lösungen (z.B. nach Hancock) verwendet. Ein neuseeländischer Betrieb benutzt Glutaraldehyd. Eingesetzte Färbungen umfassen die Methoden nach Farelly, Giemsa, Karras, sowie Färbungen mit Fuchsin oder Eosin (allein oder in Kombination mit Nigrosin oder Anilin Blau). Dabei werden Eosin-Nigrosin-, sowie Farelly-Färbungen am häufigsten angewendet.

Tabelle 47: Besamungsstationen, in denen die Spermienmorphologie bestimmt wird (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	58	87,9	12,1
D	18	77,8	22,2
EU	22	90,9	9,1
NEU	6	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)
NA	7	100,0 (7/7)	0,0
ANZ	5	100,0 (5/5)	0,0

Tabelle 48: Besamungsstationen, in denen die Spermienmorphologie an fixierten/ungefärbten bzw. an gefärbten Präparaten bestimmt wird (%)

	n	Fixation	Färbung	Sonstiges
Gesamt	51	25,5	33,3	41,2
D	14	14,3	35,7	50,0
EU	20	20,0	35,0	45,0
NEU	5	20,0 (1/5)	40,0 (2/5)	40,0 (2/5)
NA	7	42,9 (3/7)	42,9 (3/7)	14,3 (1/7)
ANZ	5	60,0 (3/5)	0,0	40,0 (2/5)

Sonstige: keine Angaben zur Untersuchungsmethode bzw. Untersuchung in Fremdlabors

Tabelle 49: In internationalen Besamungsstationen verwendete Färbungen zur Beurteilung der Spermienmorphologie (%)

	n	Farely	Giemsa	Karras	Eosin	Fuchsin
Gesamt	17	23,5	11,8	5,9	52,9	5,9
D	5	60,0	20,0	20,0	0,0	0,0
EU	7	0,0	14,3 (1/7)	0,0	85,7 (6/7)	0,0
NEU	2	50,0 (1/2)	0,0	0,0	50,0 (1/2)	0,0
NA	3	0,0	0,0	0,0	66,6 (2/3)	33,3 (1/3)

Die Grenzwerte bezüglich des Anteils an morphologisch unveränderten Samenzellen sind in Tabelle 50 dargestellt. Alle deutschen Besamungsstationen weisen Mindestanforderungen zwischen 70 und 80% auf. Die höchsten Anforderung stellen ein neuseeländischer und ein österreichischer Betrieb, in denen nur Sperma mit mindestens 88% bzw. 85% morphologisch intakte Spermien verarbeitet wird. Die niedrigsten Anforderungen gelten mit 60% in einer kanadischen und mit 35% in einer australischen Station.

Tabelle 50: Mindestanforderungen, die in den jeweiligen Besamungsstationen an den Anteil unveränderter Spermien (%) gestellt werden (M±SD)

	n	Morphologisch intakte Spermien
Gesamt	43	75,1 ± 8,7
D	12	78,8 ± 3,1
EU	15	76,5 ± 5,8
NEU	4	79,0 ± 2,7
NA	7	70 ± 5
ANZ	5	67,6 ± 19,7

Lebend-Tot-Färbungen (Supravitalfärbungen) unter Verwendung des Farbstoffes **Eosin** werden in 22,8% aller Besamungsstationen durchgeführt. Eosin färbt tote oder absterbende Zellen intensiv rot. Zellen, die zum Zeitpunkt der Vermischung leben, bleiben ungefärbt. Zur besseren Kontrastierung setzten eine französische Station Anilinblau, drei britische, eine österreichische und eine irische Station Nigrosin zu. Stationen der „NA“- und der „ANZ“-Gruppe wenden keine Eosinfärbungen an. Als Mindestanteil lebender (=ungefärbter) Spermien werden von den deutschen Stationen 60% bzw. 80% genannt. Von den zehn Betrieben der „EU“- Gruppe, die Eosinfärbungen benutzen, geben fünf entsprechende Grenzwerte zwischen 50% (in einer österreichischen) und 80% (in einer portugiesischen Station) an. Die „NEU“-Station macht keine Angaben bezüglich geltender Mindestanforderungen.

Tabelle 51: Durchführung von Eosin-Färbungen in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Ja	Nein
Gesamt	57	22,8 (13/57)	77,2 (44/57)
D	17	11,8 (2/17)	88,2 (15/17)
EU	22	45,5 (10/22)	54,5 (12/22)
NEU	6	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)
NA	7	0,0	100,0 (7/7)
ANZ	5	0,0	100,0 (5/5)

Fluoreszenzmarker dienen der Untersuchung der **Lebensfähigkeit** von Samenzellen, indem sie Aufschluss über die **Membranintegrität** geben und je nach verwendetem Farbstoff die Differenzierung lebender, toter und/oder absterbender Zellen ermöglichen. Als „lebensfähig“ werden Zellen bezeichnet, die über eine intakte

Zellmembran verfügen und sich nur von entsprechenden selektiven Farbstoffen anfärben lassen (siehe Kapitel 2.6.4.2.).

Ein europäisches Besamungszentrum beurteilt mit Fluoreszenzmarkern gefärbte Spermien in Fluoreszenz-Mikroskopen und verwendet dabei die Bis-Benzimidazol Färbung Hoechst 33258, die geschädigte Zellmembranen penetriert und sich an die DNS bindet (siehe Kapitel 2.6.4.2.). In dieser Station beträgt der geforderte Mindestanteil lebensfähiger Samenzellen 50%.

Drei weitere europäische Betriebe analysieren die Lebensfähigkeit der Spermien mit Hilfe von Durchflusszytometern („Flow Cytometer“). Dabei verwendet eine Station ebenfalls eine Bis-Benzimidazol Färbung von Hoechst, die anderen beiden Stationen benutzen eine Kombinationsfärbung der Fluoreszenzmarker Propidium Jodid (PI) und SYBR-14. PI färbt die DNS toter oder membrangeschädigter Zellen fluoreszierend rot; SYBR-14 die Zellkerne lebender DNS fluoreszierend grün (siehe auch Kapitel 2.6.4.2.).

Die angegebenen Minimalanteile lebensfähiger Samenzellen betragen 60%, 40% und 60%.

Osmotische Resistenztests (ORTs) bieten eine weitere Möglichkeit, die Funktionstüchtigkeit der Zellmembranen von Spermien zu untersuchen, werden jedoch von keiner der befragten Besamungsstationen zur Beurteilung von Frischsperma eingesetzt.

Eine englische Station führt einen **Termoresistenztest** (TRT) bis zum Erlöschen aller Bewegungsäußerungen durch. Die Inkubationstemperatur beträgt dabei 32°C. Die Proben werden im Abstand von 30min kontrolliert.

Eine kanadische Station führt einen 2-stündigen Stresstest aus, bei dem die Endmotilität der Samenzellen einer untersuchten Probe mindestens 30% betragen soll. Nähere Angaben zum Versuchsaufbau liegen nicht vor.

4.4.2. Spermaverarbeitung

4.4.2.1. Herstellung flüssigkonservierter Besamungsportionen

Insgesamt bieten nur 10 (17,5%; 10/57) der befragten Rinderzuchtstationen neben tiefgefrorenen auch flüssigkonservierte Besamungsportionen an.

In den vier deutschen Betrieben, die flüssigkonservierte Besamungsportionen vertreiben, liegen die Anteile des Frischsperma-Handels am Gesamthandel mit Besamungsportionen zwischen 2% und 10,4%, in der „EU“-Gruppe zwischen 10% und 40% sowie in Betrieben der „ANZ“-Gruppe zwischen 15% und 82%. Stationen der „NEU“- und „NA“-Gruppe betreiben keinen Frischsperma-Handel.

Tabelle 52: Rinderzuchtstationen, die mit tiefgefrorenen Besamungsdosen (TGS) und portioniertem Frischsperma (FS) handeln (%)

	n	Ausschließlich TGS	TGS und FS
Gesamt	57	82,5	17,5
D	19	78,9	21,1
EU	21	85,7	14,3
NEU	6	100,0 (6/6)	0
NA	6	100,0 (6/6)	0
ANZ	5	40,0 (2/5)	60 (3/5)

TGS: Tiefgefriersperma

FS: Frischsperma

Die Zeitspanne zwischen Gewinnung der Ejakulate und Konfektionierung der Besamungsportionen beträgt in deutschen Stationen und Betrieben der „EU“-Gruppe zwischen 13 min und 20 min. Im Unterschied hierzu finden sich in der „ANZ“-Gruppe deutlich längere Zeitspannen. Während Besamungsportionen in einem „ANZ“-Betrieb nach 35 min abgefüllt werden, erfolgt die Verdünnung des Ejakulates in den beiden anderen „ANZ“-Stationen zwar ebenfalls im direkten Anschluss an die Gewinnung, die Portionierung allerdings erst 20h später.

Lagerungstemperatur und maximale Lagerungsdauer flüssigkonservierter Besamungsportionen liegen insgesamt zwischen 4°C und 20°C bzw. 24h und 96h.

Eine deutsche Station machte keine diesbezüglichen Angaben, die Werte der übrigen neun Betriebe sind in Tabelle 53 wieder gegeben.

Tabelle 53: Lagertemperatur (°C) und maximale Lagerdauer (h) von flüssigkonservierten Besamungsportionen

	Lagertemperatur	max. Lagerdauer
D 07	15	72
D 12	16	96
D 13	16,5	72
EU 03	8	24
EU 13	5	72
EU 18	20 (Raumtemp.)	56
ANZ 4	20 (Raumtemp.)	72
ANZ 5	20 (Raumtemp.)	72
ANZ 6	15	72

Da der ursprüngliche Fragebogen keine Fragen in Bezug auf Volumen, Konzentration und Verdünnungsmedium von Frischsperma-Besamungsdosen beinhaltete, wurden die zehn Stationen erneut angesprochen. Allerdings gaben daraufhin nur drei Betriebe weitere Auskünfte. Die Volumen der Besamungsdosen werden zwischen 0,230 ml und 0,250 ml angegeben; die Anzahl Samenzellen pro Portion liegt zwischen 3×10^6 und 5×10^6 . Zwei Stationen verwenden das kommerzielle Verdünnungsmedium Caprogen®, eine Station stellt das Verdünnungsmedium selbst her.

4.4.2.2. Herstellung tiefgefrorener Besamungsportionen

Zur Herstellung tiefgefrorener Besamungsportionen stellen 67,2% aller Besamungsstationen ihre **Spermaverdünner** aus kommerziellen Fertigmischungen her, denen vor Verwendung destilliertes Wasser und teilweise auch Eigelb zugesetzt wird. Allerdings finden sich zwischen den einzelnen geographischen Gruppen große Unterschiede. Während in den untersuchten europäischen Stationen (Gruppen „D“, „EU“ und „NEU“) die Verwendung von Fertigprodukten überwiegt, stellen Stationen der „NA“- und „ANZ“- Gruppe ihre Verdünner überwiegend selbst her.

**Tabelle 54: In internationalen Besamungsstationen verwendete Sperma-
verdünner: Anteil kommerzieller Vormischungen und Eigenherstellung (%)**

	n	Kommerzielle Vormischung	Eigenherstellung
Gesamt	58	67,2	32,8
D	19	78,9	21,1
EU	22	81,8	18,2
NEU	6	83,3 (5/6)	16,7 (1/6)
NA	6	16,7 (1/6)	83,3 (5/6)
ANZ	5	0,0	100,0 (5/5)

Kommerzielle Vormischungen beziehen die europäischen Stationen von den Firmen Minitüb GmbH & Co. KG (Landshut, Deutschland), IMV Technologies (l'Aigle Cedex, Frankreich) und Biovet Inc. (Kanada). In Deutschland (14/15), sowie in anderen deutschsprachigen Ländern, wie Österreich (3/5) und der Schweiz (2/2) werden vor allem Minitüb-Produkte verwendet. IMV-Produkte überwiegen dagegen in England (4/5) und Irland (2/3). Biovet-Produkte werden von den finnischen Stationen (2/2), sowie einer französischen (1/2) und einer tschechischen (1/2) Station eingesetzt. Aus Betrieben der „NA“- und „ANZ“-Gruppe lagen keine Informationen vor.

**Tabelle 55: In europäischen Besamungsstationen verwendete kommerzielle
Spermaverdünner (%)***

	n	IMV Technologies	Minitüb GmbH	Biovet Inc.
Gesamt	38	31,6 (12/38)	76,3 (29/38)	10,5 (4/38)
D	15	13,3 (2/15)	93,3 (14/15)	0,0
EU	18	44,4 (8/18)	38,9 (7/18)	16,7 (3/18)
NEU	5	40,0 (2/5)	60,0 (3/5)	20,0 (1/5)

*Mehrfachnennungen möglich

Insgesamt stellen 19 Betriebe ihre Spermaverdünner selbst her. Dabei werden am häufigsten sog. Tris-Verdünner, d.h. Verdünner auf der Basis von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, verwendet. Je ein englischer, ein amerikanischer, sowie ein australischer Betrieb stellen auch Verdünner auf Milchbasis her und 2 neuseeländische Stationen benutzen Natrium-Citrat-Medien.

Tabelle 56: In internationalen Besamungsstationen selbst hergestellte Spermaverdünner (%)

	n	Tris-Medium	Natrium-Citrat-Medium	Milch-Medium
Gesamt	19	73,7 (14/19)	10,5 (2/19)	15,8 (3/19)
D	4	100,0 (4/4)	0,0	0,0
EU	4	75,0 (3/4)	0,0	25,0 (1/4)
NEU	1	100,0 (1/1)	0,0	0,0
NA	4	75,0 (3/4)	0,0	25,0 (1/4)
ANZ	6	50,0 (3/6)	33,3 (2/6)	16,7 (1/6)

Alle Laboratorien, die Spermaverdünner selbst herstellen, setzen als Gefrierschutzmittel **Glycerol** in unterschiedlichen Konzentrationen ein. Die höchsten Konzentrationen im fertig hergestellten Verdünner finden sich in den Tris-Medien zweier deutscher (13% bzw. 15%) und einer kanadischen Station (14%). Auch die Natriumcitrat-Medien neuseeländischer Betriebe enthalten 14% bzw. 15% Glycerol. Mit einem Glycerol-Gehalt von nur 5% weisen dagegen zwei andere neuseeländische Betriebe die niedrigste Konzentration auf.

Tabelle 57 zeigt die erhobenen Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD).

Tabelle 57: Glycerolkonzentration (%) in selbst hergestellten Spermaverdünnern, die in internationalen Besamungsstationen verwendet werden (M±SD)

	n	Tris-Medium	Natriumcitrat-Medium	Milch-Medium
Gesamt	19	7,5 ± 2,9	14,5 ± 0,7	7,7 ± 1,2
D	4	10,2 ± 4,5	/	/
EU	3	6,4 ± 0,6	/	7,0
NEU	1	6,0	/	/
NA	5	6,75 ± 0,5	/	7,0
ANZ	6	6,3 ± 2,3	14,5 ± 0,7	9,0

In den befragten Betriebe werden Glasampullen oder Pellets zur Portionierung und **Konfektionierung von Tiefgefriersperma** nicht mehr eingesetzt. Methode der Wahl ist in allen Besamungsstationen die Verwendung von Plastikröhrchen. Je nach Größe und Hersteller fasst jedes Plastikröhrchen zwischen 0,21 und 0,5ml verdünntes Sperma.

Der **Verdünnungsprozess** wird in einer oder zwei Stufen durchgeführt. Während beim einstufigen Verfahren der Einheitsverdünner bereits Glycerol als Gefrierschutzmittel enthält, wird dieses beim zweistufigen Verfahren in der Regel erst mit der zweiten Verdünnerfraktion zugegeben.

In Betrieben der „NA“- und „ANZ“-Gruppe wird überwiegend das zweistufige Verfahren angewendet. Dagegen folgen fast alle deutschen und die meisten europäischen Besamungsstationen dem Einschnitt-Prinzip. Allerdings gibt es einige länderspezifischen Ausnahmen. So verfahren alle irischen und drei von fünf britischen Stationen nach dem Zweischritt-Prinzip.

Da eine deutsche und eine kanadische Station beide Verfahren anwenden, ist die Summe der in Tabelle 58 gezeigten prozentualen Anteile in der „D“-, sowie in der „NA“- Gruppe und folglich auch in der „Gesamt“- Gruppe größer als 100.

Fünf Betriebe lieferten keine oder nur unvollständige Informationen und wurden deshalb nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 58: Verbreitung von Einschnitt- bzw. Zweischrittverdünnungsverfahren bei der Spermaverarbeitung in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	Einschnitt	Zweischritt
Gesamt	55	60,0	43,6
D	19	94,7	10,5
EU	20	50,0	50,0
NEU	5	60,0 (3/5)	40,0 (2/5)
NA	7	28,6 (2/7)	85,7 (6/7)
ANZ	4	0	100,0 (4/4)

Für 33 Besamungsstationen, die das **einstufige System** anwenden, ist in Tabelle 59 die zeitliche Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte und der Temperaturverlauf von der Ejakulatgewinnung bis zum Tiefgefrieren, dargestellt. Sofern die Antworten Zeit- oder Temperaturspannen enthielten, ist der jeweilige Mittelwert angegeben.

Es fällt auf, dass sich die Zeit- und Temperaturabläufe aller Stationen teilweise erheblich voneinander unterscheiden und jeder einzelne Parameter große Variationen aufweist.

**Tabelle 59: Zeitabstände (min) und Temperaturverhältnisse (°C) des
Einschrittverdünnungsverfahrens bei 33 internationalen Besamungsstationen**

Station	Z1	T1	Z 2	T2	Z3	T3	Z ges.
D 01	7,5	38	7,5	20	210	8	225
D 02	3	33	20	23	180	5	203
D 03	1	30	10	25	240	4	251
D 04	7,5	20	20	20	240	6	267,5
D 05	10	30	20	25	240	4	270
D 06	30	28	30	20	240	5	300
D 07	8	20	180	5	10	5	198
D 08	15	32	10	25	240	4	265
D 09	6,5	32	7,5	22	240	5	254
D 10	20	21	35	21	210	5	265
D 11	7,5	5,5	15	21	210	5	232,5
D 12	5	32	10	25	220	4	235
D 14	25	20	60	4	60	4	145
D 15	20	18	1	18	180	4	201
D 16	10	23	30	20	180	5	220
D 17	5	28	75	20	180	5	260
D 18	5	35	120	5	1	5	126
D 19	12,5	30	1	20	160	4	173,5
EU 01	3	30	15	20	300	5	318
EU 04	2,5	30	70	20	240	4	312,5
EU 11	10	32	150	4	180	4	340
EU 13	10	32	15	21	150	4	175
EU 14	60	20	300	4	120	4	480
EU 15	10	30	120	5	120	5	250
EU 16	1	37	120	5	90	5	211
EU 17	5	32	30	20	300	4	335
EU 19	1	30	75	4	160	4	236
EU 20	1	20	1	20	60	4	62
NEU 01	1	32	10	20	45	4	56
NEU 04	10	27	10	22	200	4	220
NEU 07	10	32	15	20	240	4	265
NA 06	4	4	60	4	120	4	184
NA 08	6	34	120	4	120	4	246

Z 1: Zeit zwischen der Gewinnung und dem Verdünnen des Ejakulates (min)

T 1: Verdünnungstemperatur (°C)

Z 2: Zeit zwischen dem Verdünnen des Ejakulates und dem Abfüllen der Besamungsportionen (min)

T 2: Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Besamungsportionen (°C)

Z 3: Zeit zwischen dem Abfüllen und dem Einfrieren der Besamungsportionen (min)

T 3: Temperatur vor Beginn des Einfriervorganges (°C)

Z ges.: Gesamtdauer des Verdünnungsverfahrens: Z ges. = Z1 + Z2 + Z3 (min)

Die Verdünnung der Ejakulate erfolgt in der Mehrzahl der Besamungsstationen (78,8%; 26/33) innerhalb von 15 min nach der Gewinnung. In einem deutschen Betrieb, drei EU-Stationen und einer NEU-Station wird Sperma bereits in der ersten Minute verdünnt. Dagegen beträgt die Zeitspanne zwischen Gewinnung und Verdünnen des Ejakulates in einer anderen europäischen Station 60 min.

Die Temperatur des Verdünnermediums (**T1**) liegt bei 45,5% (15/33) aller Stationen zwischen 20°C und 30°C. Die mit 38°C höchste Verdünnungstemperatur weist ein deutscher Betrieb auf (D01), die niedrigsten eine andere deutsche Station (D11: 5,5°C), sowie eine Station der NA-Gruppe (NA06: 4°C).

Die Zeitspanne zwischen Verdünnung und Konfektionierung des Spermas (**Z2**) liegt zwischen einer und 300 min, wobei das Abfüllen der Besamungsdosen in 54,5% (18/33) der Stationen 10 bis 60 min nach dem Verdünnen erfolgt.

In Bezug auf die **Konfektionierungstemperatur**, d.h. die Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Besamungsportionen (**T2**), können die befragten Besamungszentren in zwei Gruppen eingeteilt werden: 30,3% (10/33) aller Besamungsstationen senken vor der Spermaportionierung die Temperatur auf 4 bis 5°C, dagegen füllen 69,7% (23/33) die Besamungsdosen bei Raumtemperatur (18-25°C) ab.

Auch die „**Z3**“-Werte liegen zwischen einer und 300 min. Dabei besitzen Stationen, die einen kleineren „**Z2**“-Wert aufweisen, nicht notwendigerweise einen größeren „**Z3**“- Wert und umgekehrt. 54,5% (18/33) der Betriebe beginnen mit dem Gefrieren der Besamungsportionen 180 bis 240 min nach dem Konfektionieren.

Die Temperatur vor Durchführung des Gefriervorganges (**T3**) beträgt in 93,9% (31/33) aller Betriebe 4 bis 5°C. Nur zwei deutsche Unternehmen (D 01, D 04) lagern die Besamungsdosen bei 6°C bzw. 8°C. In beiden Betrieben beträgt die Konfektionierungstemperatur (**T2**) 20°C.

Da die Zeiträume zwischen den einzelnen Arbeitsschritten sehr unterschiedlich sind, weisen auch die Werte für die Gesamtdauer des Verdünnungsvorganges („**Z ges.** =

Z1+Z2+Z3“) eine große Streuung auf. Zwei Betriebe beginnen bereits ca. 60 min nach der Samengewinnung mit dem Einfrieren der Spermaportionen (EU20: 62 min; NEU01: 56 min), eine andere EU-Station (EU14) hingegen erst nach 480 min. In 60,6% (20/33) aller Besamungsstationen sowie in 82,4% (14/17) der deutschen Betriebe beträgt „Z ges.“ zwischen 200 und 300 min.

Auch Besamungsstationen, die ein **Zweischrittverdünnungsverfahren** anwenden, wurden nach der zeitlichen Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte, sowie dem Temperaturverlauf gefragt. In Tabelle 60 sind die Angaben von 24 Besamungsstationen dargestellt.

Tabelle 60: Zeitabstände (min) und Temperaturverhältnisse (°C) des Zweischrittverdünnungsverfahrens bei 24 internationalen Besamungsstationen

Station	Z 1a	T1a	Z1b	T1b	Z 2	T2	Z3	T3	Z ges.
D 13	15	20	1,5	20	120	5	120	5	256,5
D 14	10	27	5	20	60	4	60	4	135
EU 02	5	37	5	30	10	28	195	5	215
EU 05	1,5	33	12,5	22	15	22	150	5	179
EU 06	0,75	30	45	25	1,5	22	180	5	227,25
EU 07	5	37	20	37	120	4	105	4	250
EU 08	1	20	12,5	20	12,5	20	300	4	326
EU 10	3,5	30	240	4	55	4	5	4	303,5
EU 12	1	32	90	20	150	4	120	4	361
EU 18	10	35	15	35	120	4	300	4	445
EU 21	25	34	10	34	180	4	1	4	216
EU 22	2,5	32	10	32	15	20	90	4	117,5
NEU 05	10	21	5	21	15	21	240	4,5	270
NEU 06	5	36	10	36	10	25	270	6	295
NA 02	6	37	90	5	15	5	180	5	291
NA 04	4	35	120	4	120	4	150	4	394
NA 05	25	38	210	2,5	60	2	10	2	305
NA 07	5	34,5	90	5	90	5	90	5	275
NA 08	6	34	120	4	1	4	120	4	247
NA 09	8	35	120	5	65	5	10	5	203
ANZ 03	10	35	210	4,5	120	4,5	60	4,5	400
ANZ 04	3,5	32	165	5	3,5	5	5	5	177
ANZ 05	3,5	32	165	5	3,5	5	5	5	177
ANZ 06	5	37	60	4	20	4	60	4	145

Z 1a	Zeit zwischen der Gewinnung und dem ersten Verdünnungsschritt des Ejakulates (min)
T 1a:	Temperatur zum Zeitpunkt des ersten Verdünnungsschrittes (°C)
Z 1b:	Zeit zwischen den beiden Verdünnungsschritten (min)
T 1b:	Temperatur zum Zeitpunkt des zweiten Verdünnungsschrittes (°C)
Z 2:	Zeit zwischen dem zweiten Verdünnungsschritt und dem Abfüllen der Besamungsdosen (min)
T 2:	Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Besamungsdosen (°C)
Z 3:	Zeit zwischen dem Abfüllen und dem Einfrieren der Besamungsportionen (min)
T 3:	Temperatur vor Beginn des Einfriervorganges (°C)
Z ges.:	Gesamtdauer des Verdünnungsverfahrens (min): Z _{ges.} =Z _{1a} +Z _{2a} +Z ₃ +Z ₄

In 91,7% (22/24) der Besamungszentren, die ein zweistufiges Verdünnungsverfahren durchführen, erfolgt der erste Verdünnungsschritt innerhalb von 15 min nach der Samengewinnung. In 70,8% (17/24) innerhalb von 5 min.

Im Unterschied zu Betrieben mit einstufigen Verfahren liegt die Temperatur der ersten Verdünnungsstufe (**T1a**) bei der Mehrzahl der Stationen (75%, 18/24), in denen eine zweistufige Verdünnungsverfahren angewendet wird, über 30°C.

Der zeitliche Abstand zwischen dem ersten und dem zweiten Verdünnungsschritt (**Z1b**) beträgt zwischen 1,5 und 240 min.

Die Temperatur des zweiten Verdünnungsschrittes (**T1b**) liegt bei 90% (9/10) der Besamungsstationen der EU-Gruppe, sowie bei beiden deutschen „zweistufigen“ Unternehmen und einer NEU-Station zwischen 20 und 37°C. Dagegen verwenden alle Betriebe der „ANZ“- und 5 von 6 Stationen der „NA“-Gruppe Verdünnungsmedien mit einer Temperatur von 4 bis 5°C. Die mit 2,5°C kältesten Medien setzt eine Station der NA-Gruppe ein (NA05).

Die Werte für „**Z2**“, d.h. für den Zeitraum zwischen dem zweiten Verdünnungsschritt und dem Abfüllen der Besamungsportionen liegen zwischen 1,5 und 180 min. 45,8% (11/24) der Betriebe konfektionieren ihre Spermadosen 10 bis 60 min nach dem Abfüllen.

Die **Konfektionierungstemperatur (T2)** beträgt in 66,7% (16/24) der „zweistufigen“ Stationen 4 bis 5°C (gegenüber 30,3% bei Betrieben mit einem einstufigen System).

In einer Station (NA05) beträgt „T2“ nur 2°C. In sieben anderen (29,2%; 7/24) liegt „T2“ zwischen 20 und 28°C.

Die Zeitspanne zwischen der Konfektionierung und dem Gefrierprozess (**Z3**) beträgt auch bei Besamungsstationen mit zweistufigen Verfahren zwischen einer und 300 min. Dabei besitzen Stationen, die einen kleineren „Z2“-Wert aufweisen, nicht notwendigerweise einen größeren „Z3“- Wert und umgekehrt.

Die **Temperatur vor Beginn des Gefriervorganges (T3)** liegt bei fast allen Stationen zwischen 4 °C und 5°C. Einzige Ausnahme bildet ein Betrieb der „NEU“-Gruppe (NEU06), wo „T3“ 6°C beträgt.

In „zweistufigen“ Besamungsstationen beträgt die Gesamtdauer des Verdünnungsvorganges zwischen 117,5 und 445 min. Dabei liegt „**Z ges.**“ bei 25% (6/24) der Stationen unter 200 min, bei 45,8% (11/24) zwischen 200 und 300min sowie bei 29,2% (7/24) über 300min.

Im Durchschnitt dauert der **gesamte Verdünnungsvorgang** bei Betrieben, die ein zweistufiges Verfahren anwenden, länger als bei Betrieben mit einem einstufigen Verfahren. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind $258,8 \pm 86,2$ min (zweistufiges System) und $235,8 \pm 79,3$ min (einstufiges System, siehe auch Tabelle 63). Allerdings gilt dies nicht für alle geographischen Gruppen. Zwar benötigen Besamungsstationen der „NEU“- und der „NA“- Gruppe, die ein einstufiges System anwenden, weniger Zeit als solche mit einem zweistufigen System. In der „D“- und der „EU“-Gruppe allerdings sind die „Z ges.“- Werte in Betrieben mit einstufigem System größer, als in Betrieben mit zweistufigem System. Hier verwenden Betriebe mit einem einstufigen System also mehr Zeit auf den Verdünnungs- und Konfektionierungsvorgang, als Betriebe mit einem zweistufigen.

Tabelle 61 gibt die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) der einzelnen Gruppen wieder.

Tabelle 61: Gesamtdauer des Verdünnungsvorganges (min) in internationalen Besamungsstationen mit ein- oder zweistufigem Verdünnungsverfahren (M±SD)

	einstufiges Verdünnungsverfahren	zweistufiges Verdünnungsverfahren
Gesamt	235,8 ± 79,3	258,8 ± 86,2
D	227,3 ± 46,1	195,8 ± 85,9
EU	272,0 ± 112,9	264,0 ± 95,8
NEU	180,3 ± 110,0	282,5 ± 17,7
NA	215,0 ± 43,8	285,8 ± 64,2
ANZ	-	224,8 ± 117,8

Die abgefüllten **Besamungsportionen** beinhalten durchschnittlich 18,8±4,8 Millionen Spermien, dabei betragen die Werte deutscher Betriebe zwischen 15 und 25 Millionen. Die Angaben der verschiedenen europäischen Besamungszentren weisen eine erheblich größere Schwankungsbreite auf. Sie liegen zwischen durchschnittlich 5 und 30 Millionen Spermien je Besamungsdosis. In der „NA“-Gruppe liegen sie zwischen 10 und 25 Millionen. Deutliche Unterschiede bestehen auch zwischen den neuseeländischen Betrieben. Während 2 neuseeländische Betriebe teilweise 12,5 Millionen Spermien pro Spermadosis verwenden, setzt eine andere Station bis zu 40 Millionen Spermien ein.

Tabelle 62: Durchschnittliche Anzahl Spermien pro Besamungsportion (x 10⁶) in internationalen Besamungszentren (M±SD)

	n	Spermien pro Besamungsportion
Gesamt	58	18,8 ± 4,8
D	19	18,8 ± 2,5
EU	21	18,3 ± 4,0
NEU	6	17,5 ± 7,6
NA	7	18,4 ± 2,6
ANZ	5	24,1 ± 11,2

Mit Ausnahme einer neuseeländischen Station, in der Besamungsportionen manuell abgefüllt werden, benutzen alle Betriebe automatische Abfüllmaschinen.

Das Einfrieren der Besamungsportionen wird in vier Betrieben der „ANZ“- Gruppe (80%; 4/5), sowie in 5 deutschen (26,3%; 5/19), einer irischen (33,3%; 1/3) und drei

britischen Stationen (60%; 3/5) per Hand im Stickstoffdampf in entsprechenden Behältnissen durchgeführt. Alle übrigen Besamungszentren besitzen programmierbare Tiefgefriergeräte.

4.4.2.3. Beurteilung aufgetauter Besamungsportionen

Informationen über Qualitätskontrollen aufgetauter Spermadosen konnten von 59 der 60 befragten Besamungszentren erhalten werden. In den Tabellen 63 und 64 sind die angewandten Auftautemperaturen und –zeiten wieder gegeben.

Die durchschnittliche Auftautemperatur aller untersuchten Besamungszentren beträgt $36,1 \pm 3,2$ °C. Dabei werden in keiner Gruppe so verschiedene Auftautemperaturen festgestellt, wie in den deutschen Betrieben. Hier verwenden drei Stationen 40°C, eine andere Station dagegen nur 25°C, um gefrorene Spermadosen aufzutauen.

Tabelle 63: Beurteilung aufgetauter Tiefgefrierspermaportionen in internationalen Besamungsstationen: Durchschnittliche Auftautemperaturen (°C) (M \pm SD, Maximal- und Minimalwerte)

	n	Auftautemperatur	Maximalwert	Minimalwert
Gesamt	59	36,1 \pm 3,2	40	25
D	19	36,8 \pm 4,3	40	25
EU	22	35,3 \pm 2,6	38	30
NEU	6	35,5 \pm 4,0	39	28
NA	7	36,6 \pm 1,1	38	35
ANZ	5	36,4 \pm 1,3	38	35

Die Zeitspanne, für die eine Tiefgefrierportion im Wasserbad oder im Heizblock belassen wird, weist zwischen den einzelnen Besamungszentren häufig große Unterschiede auf. In der Mehrzahl der europäischen Stationen wird aufgetautes Sperma nach 10 bis 20 Sekunden beurteilt. Während 22,0% aller Stationen eine Beurteilung bereits nach 10 Sekunden durchführen, belassen zwei neuseeländische Betriebe Spermadosen durchschnittlich 450 Sekunden in der Auftauvorrichtung.

Tabelle 64: Beurteilung aufgetauter Tiefgefrierspermaportionen in internationalen Besamungsstationen: Auftaudauer (sec), prozentuale Zuordnung (%)

	n	10 – 20 sec	21 – 30 sec	31 - 60 sec	120 sec	300 – 450 sec
Gesamt	59	49,2	30,5	10,2	3,4	6,8
D	19	63,2	26,3	5,3	0,0	5,3
EU	22	54,5	36,4	0,0	4,5	4,5
NEU	6	66,7 (4/6)	33,3 (2/6)	0,0	0,0	0,0
NA	7	0,0	28,6 (2/7)	57,1 (4/7)	14,3 (1/7)	0,0
ANZ	5	20,0 (1/5)	20,0 (1/5)	20,0 (1/5)	0,0	40,0 (2/5)

In 54,2% aller Zentren wird die **Spermienzahl** aufgetauter Besamungsportionen routinemäßig oder stichprobenartig überprüft. Dabei werden in den meisten Fällen Zählkammern verwendet. Andere Stationen setzen Partikelzählgeräte oder Durchflusszytometer ein oder senden tiefgefrorene Besamungsportionen zur Untersuchung in Fremdlaboratorien.

Tabelle 65: Beurteilung aufgetauter Tiefgefrierspermaportionen in internationalen Besamungsstationen: Betriebe, in denen die Spermienzahl je Besamungsportion bestimmt wird (%)

	n	Ja	Nein(%)
Gesamt	59	54,2	45,8
D	19	52,6	47,4
EU	22	40,9	59,1
NEU	6	66,7 (4/6)	33,3 (2/6)
NA	7	71,4 (5/7)	28,6 (2/7)
ANZ	5	80,0 (4/5)	20,0 (1/5)

Tabelle 66: Methoden zur Bestimmung der Spermienzahl in aufgetauten Besamungsportionen in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	ZK	FL	FC	CC	MP
Gesamt	28	64,3 (18/28)	7,1 (2/28)	7,1 (2/28)	14,3 (4/28)	7,1 (2/28)
D	9	88,9 (8/9)	11,1 (1/9)	0,0	0,0	0,0
EU	6	33,3 (2/6)	0,0	33,3 (2/6)	33,3 (2/6)	0,0
NEU	4	75,0 (3/4)	25,0 (1/4)	0,0	0,0	0,0
NA	5	40,0 (2/5)	0,0	0,0	40,0 (2/5)	20,0 (1/5)
ANZ	4	75,0 (3/4)	0,0	0,0	0,0	25,0 (1/4)

ZK: Zählkammer
 FL: Fremdlabor
 FC: Durchflusszytometer (Flow Cytometer)
 CC: Partikelzählgerät (Cell Counter)
 MP: Mikrophotographie

Die aufgetauten Spermadosen werden in 59 Betrieben auf den Anteil **vorwärts beweglicher Spermien** untersucht (Motilität). Eine Station machte keine Angaben. Ortsbewegliche Spermien und solche mit Kreisbewegungen werden nicht einbezogen. Die für die Motilität geltenden Mindestanforderungen schwanken je nach Betrieb zwischen 20% und 80%. Tabelle 67 gibt die Werte bezogen auf die geographischen Gruppen wieder.

Tabelle 67: In internationalen Besamungsstationen geltende Mindestanforderungen an den Anteil vorwärts beweglicher Spermien (%) in aufgetauten Tiefgefrierspermaportionen (M±SD, Maximal- und Minimalwerte)

	n	Motilität	Maximum	Minimum
Gesamt	59	45,2 ± 9,6	80	20
D	19	48,7 ± 3,7	55	40
EU	22	43,9 ± 13,7	80	20
NEU	6	43,3 ± 8,2	50	30
NA	7	43,9 ± 5,7	50	35
ANZ	5	42,0 ± 8,4	50	30

Aus den Mindestanteilen aktiv vorwärts beweglicher Spermien, sowie der in einer Dosis durchschnittlich enthaltenen Anzahl von Samenzellen (siehe Tabelle 62) kann die Anzahl der vorwärts beweglichen Spermien je aufgetauter Besamungsdosis berechnet werden. Tabelle 68 zeigt die errechneten Werte. Die Zahl vorwärts beweglicher Spermien je Besamungsportion liegt zwischen 3,5 und 24 Millionen Spermien.

Tabelle 68: Motile Spermien in aufgetauten Besamungsportionen internationaler Besamungsstationen ($\times 10^6$), ($M \pm SD$, Maximal- und Minimalwerte)

	n	motile Spermien	Maximalwert	Minimalwert
Gesamt	59	8,2 \pm 3,5	24,0	3,5
D	19	9,1 \pm 1,5	12,5	6,0
EU	22	7,9 \pm 4,7	24,0	3,5
NEU	6	7,4 \pm 2,8	10,0	4,0
NA	7	7,1 \pm 3,3	10,7	5,6
ANZ	5	8,9 \pm 4,0	16,0	6,8

Die **Spermienmorphologie** und insbesondere der Zustand der Akrosomenkappe aufgetauter Spermien werden in zwei Betriebe der „NA“-Gruppe an fixierten, ungefärbten Präparaten untersucht. Mindestanforderungen werden nicht genannt.

Zur Differenzierung lebender und toter Zellen verwendet eine Station der „EU“-Gruppe die Farbstoffe **Eosin** und **Anilin-Blau**. Eine Station der „NA“-Gruppe trennt lebende und tote Spermien mit Hilfe von **Sephadex-Filtern** und bestimmt die Fraktion lebender Zellen durch anschließende Partikelzählgerät-Messungen.

Beide Stationen machen keine Angaben zu geltenden Grenzwerten.

Drei europäische und ein amerikanisches Unternehmen benutzen **Fluoreszenzmarker** zur Untersuchung aufgetauter Samenzellen. Dabei verwendet eine Station eine Hoechst-Färbung, zwei eine Kombinationsfärbung mit Propidium Jodid (PI) und SYBR-14 und eine nur SYBR-14 (siehe auch Kapitel 2.6.4.2.). Die Mindestanforderungen an den Anteil lebensfähiger Spermien betragen zwischen 40 und 60%. Die Analysen werden in allen vier Betrieben mit Hilfe von Durchflusszytometern („Flow Cytometer“) durchgeführt.

Eine britische Station wendet **Osmotische Resistenztests** an, die auf dem von REVELL und MRODE (1994) entwickelten Versuchsaufbau beruhen. Die Mindestanforderungen sind abhängig von der Anzahl Spermien je Besamungsportionen und sollen 6 Millionen lebensfähige Samenzellen pro aufgetauter Portion gewährleisten, d.h. für Portionen mit 20 Millionen Spermien gilt

ein Grenzwert von 30%, für Portionen mit 15 Millionen Spermien ein Grenzwert von 40%.

Darüber hinaus werden in drei deutschen Stationen sowie zwei Betrieben der „EU“-Gruppe, einer Station der „NA“-Gruppe und drei Betrieben der „ANZ“-Gruppe verschiedene **Thermoresistenztests** durchgeführt, bei denen aufgetaute Proben bei unterschiedlichen Temperaturen verschieden lange inkubiert werden. Verwertbare Informationen zum Versuchsablauf und den gestellten Mindestanforderungen liefern lediglich die Betriebe der „ANZ“-Gruppe. Zwei Stationen verfahren dabei nach demselben Testregime: Die zu untersuchenden Proben werden bei 37°C inkubiert und müssen nach einer Inkubationsdauer von 5 bis 10 min mindestens 50% lebende Spermien aufweisen, nach 16 stündiger Inkubation noch mindestens 10%.

Eine weitere Station der „ANZ“-Gruppe inkubiert aufgetaute Spermproben bei 35°C. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Stunden muss der Anteil lebender Samenzellen noch mindestens 30% betragen und die Vorwärtsbeweglichkeit auf einer fünfstufigen Skala wenigstens mit „3“ beurteilt werden.

4.4.2.4. Quarantäne von Tiefgefriersperma

Gemäß der Europäischen Richtlinie 88/407/EEC muss Tiefgefriersperma 30 Tage in Quarantäneeinrichtungen gelagert werden, bevor es in den gemeinschaftlichen Handel gebracht werden kann. Für den Handel in den einzelnen Herstellungsländern gelten die jeweiligen nationalen Bestimmungen.

Drei der befragten Stationen geben keine Auskunft zur Quarantänedauer der produzierten Besamungsportionen. Drei weitere Stationen der „ANZ“-Gruppe, sowie zwei Betriebe der „NA“-Gruppe gestalten ihre Quarantänebedingungen in Abhängigkeit von den Bestimmungen des jeweilige Exportlandes. Bei 80,8% der verbliebenen 52 Stationen beträgt die Quarantänedauer 30 Tage. 28 Tage dauert die Quarantäne in je einem deutschen, österreichischen und polnischen Betrieb. Eine finnische Station gibt an, keine Quarantäne durchzuführen. Längere

Quarantänezeiträume werden von einem deutschen Betrieb (44 Tage), vier Stationen der „EU“-Gruppe (31 – 42 Tage) und einem amerikanischen Unternehmen (45 Tage) eingehalten.

Tabelle 69: Quarantänedauer (d) für Tiefgefriersperma in internationalen Besamungsstationen (%)

	n	< 30d	30d	> 30d
Gesamt	52	7,7	80,8	11,5
D	19	5,3	89,5	5,3
EU	21	9,5	71,4	19,0
NEU	5	20,0 (1/5)	80,0 (4/5)	0,0
NA	5	0,0	80,0 (4/5)	20,0 (1/5)
ANZ	2	0,0	100,0 (2/2)	0,0

5. DISKUSSION

Die optimale Nutzung genetisch überlegener Vatertiere ist von zentraler Bedeutung in der Rinderzucht. Haltung und Pflege der wertvollen Besamungsbullen sowie die Erstellung der größtmöglichen Zahl befruchtungsfähiger Spermaportionen pro Zeiteinheit spielen für den züchterischen Fortschritt eine entscheidende Rolle.

Rinderzüchtende Organisationen auf der ganzen Welt bemühen sich daher um die fortlaufende Verbesserung der Rahmenbedingungen der Bullenhaltung sowie der einzelnen Arbeitsschritte in der Spermagewinnung und –verarbeitung. Da dies häufig voneinander unabhängig und empirisch geschieht, hat sich eine Vielfalt von Organisations- und Arbeitsstrukturen in Besamungsstationen entwickelt, zu der es, außer einer von FÜHRER (2001) durchgeführten kleineren Studie, bisher keine vergleichenden Untersuchungen gibt.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, detaillierte Informationen über gegenwärtige Standards in internationalen Besamungsstationen zu sammeln, diese zu analysieren und in Bezug zu relevanten Veröffentlichungen in der internationalen Literatur zu setzen. In Anbetracht der großen Zahl wissenschaftlicher Publikationen in der Gesamtliteratur bestand dabei jedoch nicht der Anspruch, eine vollständige Literaturübersicht wieder zu geben.

Die Daten wurden in einer Fragebogenaktion erhoben, in fünf geographische Gruppen eingeteilt und analysiert. Die Gruppeneinteilung sicherte einerseits die Anonymität einzelner Stationen und ermöglichte andererseits innerhalb der Betriebe einer bestimmten Region Gemeinsamkeiten herauszustellen und Unterschiede zwischen Besamungsstationen verschiedener Regionen zu beschreiben. Für die Mehrzahl der einzelnen Merkmale wurden Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Bei starker Streuung der Werte wurden zusätzlich Maximal- und Minimalwerte angegeben. Da nicht alle befragten Zuchtstationen zu jedem Punkt Auskunft gaben, beziehen sich die genannten Prozentwerte jeweils auf die Anzahl auswertbarer Angaben (n) pro Kriterium.

Die Arbeit hat rein beschreibenden Charakter und soll die Bandbreite der gegenwärtigen Arbeits- und Organisationsstrukturen in internationalen Rinderzuchtstationen vermitteln. Angaben über erreichte Befruchtungswerte (Non-Return-Ergebnisse) der 60 ausgewerteten Besamungsbetriebe lagen nicht vor.

5.1. Historischer Zusammenhang

Die **Gründungsdaten** der befragten Besamungsbetriebe spiegeln die historische Entwicklung in der künstlichen Besamung wieder. Die künstliche Besamung beim Rind erlangte Praxisreife, nachdem in den 30er und 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts auf den Gebieten der Spermagewinnung (ROEMMELE 1927; MILOWANOW 1934), -verdünnung (MILOWANOW 1932) und -konservierung (IWANOW 1930; PHILLIPS u. LARDY 1940) große Fortschritte erzielt worden waren (nach: BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993). Bedingt durch den zweiten Weltkrieg, wurden zunächst jedoch nur wenige Rinderzuchtstationen gegründet.

Nach Kriegsende bestand in vielen europäischen Ländern die Notwendigkeit den Tierbestand wieder aufzubauen und gleichzeitig die Verbreitung von Tierseuchen zu bekämpfen. Es entstanden daher zahlreiche kleinere Besamungsstationen, von denen jede aber, aufgrund der Verwendung von flüssigkonserviertem Sperma, nur ein begrenztes geographisches Gebiet mit Besamungsportionen versorgen konnte.

Dies änderte sich nach einer zweiten Phase technischer Verbesserungen, die etwa von 1950 bis 1964 andauerte und den Einsatz von in Plastikröhrchen konfektionierten, tiefgefrorenen Samenportionen mit sich brachte. Besamungsportionen konnten nun unbefristet in flüssigem Stickstoff gelagert und in geeigneten Behältern über weite Strecken transportiert werden. In der Folge sank der Bedarf an kleinen, regionalen Stationen und ihre Zahl nahm deshalb stark ab.

Später rückte neben der Bekämpfung von Tierseuchen verstärkt das Bestreben nach einem beschleunigten züchterischen Fortschritt in den Vordergrund, was die Durchführung langfristiger Zuchtprogramme erforderlich machte (KUPFERSCHMIED 1993).

Um durch eine zentralisierte Zuchtwertberechnung und einen verbesserten Datenrückfluss über Milchleistung und Fruchtbarkeitsergebnisse eine bessere Selektion der Vatertiere sicher zu stellen, kam es zur Neugründung größerer rinderzuchtender Organisationen oder zum Zusammenschluss bereits existierender Betriebe unter neuen Namen.

Diese Entwicklung spiegelt sich in den Befunden der vorliegenden Studie wieder, die anhand der Gründungsdaten von 57 Besamungszentren beide angesprochenen Phasen der verstärkten Inbetriebnahme aufzeigen kann. Die erste Phase begann nach Ende des zweiten Weltkrieges und dauerte bis in die Siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts. Die zweite Phase begann etwa 1990 und setzt sich bis heute fort. In den Jahren dazwischen wurden kaum neue Stationen gegründet.

5.2. Hygienestatus internationaler Rinderzuchtstationen

Grundsätzlich gelten für alle befragten Rinderzuchtstationen die in internationalen und nationalen Gesetzen, Richtlinien und Verordnungen festgelegten seuchenhygienischen Standards. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, unterscheiden sich die Hygienemaßnahmen der befragten Besamungszentren in einzelnen Aspekten aber deutlich voneinander.

Bei der Belegung der **Isolationsställe** verfahren insgesamt 84,7% (50/59) der Betriebe nach einem „**All in – All out**“ System, bei dem eine Gruppe von Tieren erst dann in die Isolationsstallungen verbracht wird, nachdem alle Tiere der vorhergehenden Gruppe ihren Aufenthalt erfolgreich beendet haben und in die eigentliche Besamungsstation überführt worden sind (KUPFERSCHMIED 1993). Auf diese Weise wird das Risiko einer Infektionsübertragung durch neu ankommende Tiere vermieden.

Alle Besamungsstationen der „NEU“- und „NA“- Gruppe, sowie 94,7% (18/19) der deutschen Betriebe wenden ein „All in – All out“ System an, jedoch verzichten 15,3%

(9/59) aller befragten Besamungszentren und 80% (4/5) der britischen Unternehmen auf diese Vorsichtsmaßnahme.

Stationen, die über kein „All in – All out“ System verfügen, sollten Isolationsställe und Arbeitsorganisation daraufhin überprüfen, ob ein direkter oder indirekter Kontakt zwischen den Tieren möglich ist und subklinische Infektionen „neuer“ Tiere auf bereits eingestellte „alte“ Tiere übertragen werden können. Werden die zuerst eingestellten Tiere in die eigentliche Besamungsstation überführt, bevor sich bei den Neuankommelingen klinische Symptome zeigen bzw. die Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten tierseuchenhygienischen Tests vorliegen, so kann ein Erreger sogar in die eigentliche Besamungsstation eingeschleppt werden.

Innerhalb einer Station stellen alle **Personen**, die in Kontakt zu den Tieren treten, ein besonderes Hygienierisiko dar. Dies gilt gleichermaßen für Betriebsangehörige und Besucher.

Alle befragten Besamungsstationen verfügen über **Besucherregelungen**, die nur einem eingeschränkten Personenkreis Zutritt zu der Station bzw. zu den Tierhaltungen gestatten. Dabei weisen die von den einzelnen Stationen zugelassenen Personengruppen, teilweise beträchtliche Unterschiede auf. Auch die Vorschriften bezüglich von Karenzzeiten, Schutzkleidung und Desinfektionsmaßnahmen weichen erheblich voneinander ab.

Neben Amtstierärzten, die stets Zutritt haben, wird von den jeweilige Betrieben eine sehr heterogene Gruppe weiterer möglicher Besucher genannt. Diese beinhaltet Mitglieder des Vorstandes und der Geschäftsführung, Geschäftspartner, Vertreter von Zuchtverbänden und Körkommissionen, Vertreter der Landesregierung bzw. der Landwirtschaftsbehörde, Angehörige anderer Besamungsstationen, Vertragstierärzte, Wissenschaftler, Studenten, Schüler, Handwerker, Absamungstechniker, Landwirte, Klauenpfleger, Photographen und Handelsvertreter. Während einige Stationen neben den stationseigenen Tierpflegern nur (Amts-) Tierärzten Kontakt zu den Tieren gestatten, führen andere Betriebe bis zu 12 erlaubte Besuchergruppen auf.

Aus der genannten Aufzählung wird ersichtlich, dass der allgemeine Hygienestatus einer Besamungsstation durch die einzelnen Personengruppen unterschiedlich stark gefährdet werden kann. Personen mit häufigen Kontakten zu Tieren, insbesondere zu Klautieren, stellen ein erheblich höheres Risiko dar, als Personen ohne Tierkontakte. Das höchste Gefährdungsmoment besteht beim Besuch externer Vertragstierärzte, die einer kurativen Tätigkeit nachgehen und daher ständig Umgang mit potentiell infektiösen Tieren haben.

In der Aufzählung von Personen, die eine Station und ihre Tierstallungen u.U. betreten, sind Abdecker nicht zu vergessen, die allerdings von keinem der befragten Betriebe aufgezählt wurden. Trotzdem ist davon auszugehen, dass auch in Besamungszentren Tiere versterben und vom Gelände entfernt werden müssen. Sollten hierfür unabhängige, kommerzielle Entsorger verwendet werden, so geht von diesen, bzw. ihren Fahrzeugen und Ausrüstungsgegenständen, ebenfalls eine potentielle Gefährdung durch Keimübertragungen aus.

In mehreren Besamungsstationen sind Besucher nur in bestimmten Bereichen zugelassen. Erwähnt sei das vorbildliche Modell eines Schweizer Betriebes, der in drei Zonen organisiert ist. Dabei umfasst die erste Zone den Bürotrakt, das Sitzungszimmer, die Kantine, die Toiletten und den Besucherraum. Hier sind Besucher mit normalem Seuchenstatus unter Führung erlaubt. Die zweite Zone ist durch ein Schließsystem von der ersten getrennt und besteht aus dem Labor und dem Samenlager. In dieser Zone muss Schutzkleidung getragen werden. Es sind außer dem Laborpersonal nur Handwerker und Fachleute zugelassen. Die dritte und letzte Zone ist ebenfalls getrennt und umfasst den eigentlichen Tierhaltungsbereich. Betreten werden darf dieser Bereich nur von Tierpflegern und dem Stationstierarzt. Besuche sind nur in Schutzkleidung und unter Aufsicht möglich. Die geforderte Karenzzeit beträgt 10 Tage.

Wie durch die vorliegende Arbeit gezeigt wird, existieren in den einzelnen Zuchtstationen sehr unterschiedliche Regelungen bezüglich der einzuhaltenden **Karenzzeit**, d.h. dem kürzesten erlaubten zeitlichen Abstand zwischen dem Besuch

des Besamungsbetriebes und einem vorausgegangenem Klautier-Kontakt. Als maximale Zeitspanne werden 10 Tage genannt (s.o.). Einige Betriebe erlauben Besuche noch am selben Tag und ein Betrieb sogar im Anschluss an einen potentiellen MKS Kontakt, sofern die Besucher zuvor geduscht haben. Dies erscheint insbesondere angesichts des jüngsten MKS-Ausbruchs in Großbritannien als eine völlig unzureichende Schutzmaßnahme. In getrocknetem Zustand verliert das MKS-Virus seine Infektiosität erst nach 1-3min bei 130°C (ROLLE u. MAYR 2002).

Insgesamt 11 Stationen fordern die Einhaltung einer Karenzzeit und machten Angaben über die entsprechenden Zeiträume. Es wurden 1 x 12h, 6 x 24h, 2 x 48h, 1 x 72h und 1 x 10d (s.o.) genannt. Drei weitere Stationen verlangen lediglich von Besuchern aus dem Ausland Karenzzeiten von 48h, 96h bzw. 30d.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass ein Betrieb von der Durchführung eines „Tages der offenen Tür“ mit ca. 700 Besuchern aus verschiedenen landwirtschaftlichen Bereichen berichtete und gleichzeitig eine Karenzzeit von nur 24h fordert.

Massenveranstaltungen, bei denen einer großen Anzahl von Personen Zutritt zu Teilen der Station gestattet wird, mögen unter werbetechnischen Gesichtspunkten ihre Berechtigung haben, erscheinen unter hygienischen Aspekten sehr fraglich.

Große Übereinstimmung herrscht zwischen den befragten internationalen Besamungsstationen in Bezug auf die Verwendung stationseigener **Schutzkleidung**. Ein Betrieb bezeichnet das einfache Tragen sauberer Privatkleidung und -Schuhwerk als ausreichend. Neun Stationen machten keine verwertbaren Angaben. In allen anderen Besamungszentren ist das Tragen betriebseigener Schutzkleidung vorgeschrieben.

Die vorliegende Arbeit ermittelte außerdem den Anteil an Rinderzuchtstationen, deren Tierpfleger einer zusätzlichen Tätigkeit in anderen Betrieben nachgehen und untersuchte Berührungspunkte zwischen Tierpflegern und Laborpersonal.

Es zeigte sich, dass Tierpfleger in 60% (36/60) der internationalen Besamungsstationen keinen Zutritt zu den Laborräumlichkeiten haben und 68,3%

(41/60) der Betriebe über getrennte Sozialräume für Tierpfleger und Laborpersonal verfügen. Allerdings weisen 7 der 36 Betriebe, in denen Tierpfleger die Laborräume nicht betreten dürfen, gleichzeitig gemeinsame Aufenthalts- bzw. Sozialräume für beide Personengruppen auf. Die erste Hygienemaßnahme wird also durch das Fehlen der zweiten in ihrer Wirksamkeit erheblich reduziert.

In 18,3% (11/60) der Stationen sind Tierpfleger neben ihrer Tätigkeit in der Besamungsstation auch in anderen Betrieben, die wahrscheinlich einen niedrigeren Hygienestatus aufweisen, beschäftigt (siehe Tabelle 7). Einer dieser 11 Betriebe fordert eine Karenzzeit von 48h, ein weiterer 24h. In zwei Betrieben müssen Personen, die Klautierkontakt hatten, duschen, bevor sie die Station betreten dürfen. Eine Station besitzt eine Hygieneschranke. Die übrigen sechs Betriebe verfügen über keine entsprechenden Regelungen.

Die durchgeführte Fragebogenaktion erfasste auch den Anteil internationaler Besamungsstationen, deren Beschäftigte Absamungen in anderen Betrieben oder den Isolationsstallungen durchführen und ermittelte, ob die so gewonnenen Ejakulate im selben Labor beurteilt und verarbeitet werden wie Ejakulate, die in der Station selbst gewonnenen wurden.

In 21,7% (13/60) der Besamungsstationen führen Stationsangehörige auch Absamungen in anderen Betrieben und in 23,3% (14/60) in den eigenen Isolationsställen durch (siehe Tabelle 40). Insgesamt werden in 12 Stationen außerhalb und innerhalb der Station gewonnenes Sperma im selben Labor beurteilt und verarbeitet. 11 Betriebe weisen dagegen getrennte Laboreinrichtungen auf.

Die Spermagewinnung außerhalb der Station ist zulässig, sofern die abzusamenden Tiere entsprechend der in EG-Richtlinie 88/407/EWG festgelegten Bedingungen zugelassen sind. Sperma von diesen Bullen darf im selben Labor wie in der Station gewonnenes verarbeitet werden. Allerdings muss die Verarbeitung entweder mit verschiedenen Geräten oder zu einem anderen Zeitpunkt erfolgen. Im zweiten Fall müssen alle Geräte nach Gebrauch gereinigt und sterilisiert werden. Die

hergestellten Besamungsportionen müssen sich eindeutig von solchen Portionen unterscheiden, die Sperma enthalten, das in der Station gewonnen wurde.

Besamungsportionen mit außerhalb der Station gewonnenem Sperma, dürfen ausschließlich im Herstellungsland verwendet werden, d.h. sie können nicht in den innergemeinschaftlichen Verkehr gebracht werden und dürfen zu keinem Zeitpunkt mit Portionen, die für den innergemeinschaftlichen Verkehr bestimmt sind, in Kontakt geraten oder mit diesen zusammen gelagert werden (EG-Richtlinie 88/407/EWG, Anhang A, Kapitel 2).

Die Ergebnisse der Studie zeigen auch bei den für **Tiertransporte** verwendeten Fahrzeugen deutliche Unterschiede zwischen den befragten Besamungsstationen. In 50% (30/60) der Stationen werden Tiertransporte ausschließlich mit betriebseigenen Fahrzeugen durchgeführt (siehe Tabelle 10). In Deutschland verwenden sogar 63,2% (12/19) der Stationen stets eigene Transporter. In einem niederländischer Betrieb sind die Transportfahrzeuge zudem mit bakterien- und virusdichten Luftfiltern ausgestattet. Die Verwendung betriebseigener Fahrzeuge durch betriebseigenes Personal erscheint unter seuchenhygienischen Gesichtspunkten der Verwendung gemieteter Transporter überlegen. Mit Luftfiltern ausgestattete Fahrzeuge minimieren zusätzlich das Risiko einer aerogenen Infektion während des Transportes (WENTINK et al. 2000).

Ein weiterer untersuchter Aspekt der allgemeinen Betriebshygiene bestand in der Ermittlung des Anteils internationaler Besamungsstationen, die neben betriebseigenen auch -fremde Tiere führen (siehe Tabelle 2). Es zeigte sich, dass 47,3% (26/55) aller befragten Betriebe ausschließlich eigene Tiere halten. 52,7% (29/55) weisen daneben auch betriebsfremde Bullen auf, die in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle (93,1% 27/29) in denselben Stallungen wie die eigenen Tiere stehen.

Grundsätzlich unterliegen betriebsfremde und -eigene Zuchtbullen denselben rechtlichen Auflagen und Testregimes, die in EG-Richtlinie 88/407/EWG (Anhang B, Kapitel 1 u. 2) festgelegt sind. Allerdings darf nicht unterschätzt werden, dass die

vorgeschriebenen Routinetests nur wenige, wichtige Erkrankungen erfassen, daneben aber zahlreiche weitere infektiöse oder parasitäre Erreger existieren. Betriebsfremde Tiere, die zuvor in privaten Herden o.ä. gehalten wurden und/oder Zuchtausstellungen besucht haben, bergen ein größeres Risiko solche Erreger zu tragen, als betriebseigene Tiere, die von Geburt an der Kontrolle der Besamungsorganisation unterliegen.

5.3. Bullenhaltung in internationalen Rinderzuchtstationen

In Deutschland und den Betrieben der „NEU“-Gruppe werden Bullen mehrheitlich in Anbindehaltung gehalten. In den Stationen der „EU“- und der „ANZ“-Gruppe überwiegt die Haltung in Boxen oder Freigehegen.

Die Haltungsfläche pro Tier weist zwischen den einzelnen Besamungsstationen zum Teil erhebliche Unterschiede auf. Generell steht in Betrieben der „D“- , „NEU“- und „EU“-Gruppen weniger Platz pro Tier zu Verfügung als in Stationen der „NA“ und „ANZ“-Gruppe, wobei in letzterer die Zuchtbullen überwiegend in Freigehegen gehalten werden.

Die Gründe für die Unterschiede in den Haltungssystemen sind v.a. in lokalen Gegebenheiten, wie Verfügbarkeit von Platz, Seuchenstatus des jeweiligen Landes, Nähe zu (Klauen-)Tieren mit einem niedrigeren Gesundheitsstatus, Arbeitskräfteangebot etc., zu suchen. Daneben spielen individuelle Managemententscheidungen im Spannungsfeld zwischen Arbeitssicherheit und artgerechter Haltung eine Rolle.

Eine permanente Fixation der Zuchtbullen minimiert zwar das Gefährdungsmoment für die Tierpfleger und andere Personen, die mit den Tieren in Kontakt kommen, schränkt aber die Mobilität der Bullen stark ein und macht u.U. zusätzliche Bewegungsmaßnahmen erforderlich. Die Haltung in großflächigen Freigehegen bietet den Tieren weit bessere Möglichkeiten sich aktiv zu bewegen, birgt aber ein größeres Verletzungsrisiko. Lernt ein Bulle bevorstehende unangenehme Maßnahmen, wie Blutabnahmen, Klauenkontrollen, TB-Tests o.ä. zu erkennen, dann

kann es sich als äußerst schwierig erweisen, ihn von einem weitläufigen Gehege in einen Zwangsstand zu verbringen. Dasselbe gilt für Tiere, die in den Freigehegen plötzlich erkranken.

Ein Kompromiss stellt die Haltung in Boxensystemen mit oder ohne Laufketten dar. Grundsätzlich müssen alle Haltungssysteme über stabile Umzäunungen und Fluchtvorrichtungen verfügen (SCHAETZ 1963; BUSCH et al. 1991). Boxen und Gehege sollten so konzipiert sein, dass die Fütterung der Tiere von außen erfolgen kann und Vorrichtungen zum Fangen oder Fixieren der Bullen vorhanden sind (ENSMINGER 1993).

Die Oberfläche der verwendeten Böden darf weder zu glatt (FAULL et al. 1996), noch zu rau (FAULL et al. 1996), weder zu hart (BARGAI u. COHEN 1992), noch zu weich sein (KORDTS 1963; BREUER 1964). Entscheidend ist dabei das Vorhandensein ausreichender Einstreu oder der Einsatz einstreueretzender Methoden, wie z.B. Gummimatten oder Wasserbetten.

Als **Einstreu** wird in allen deutschen Besamungsstationen (19/19), sämtlichen Betrieben der „NEU“-Gruppe (6/6) und 77,3% (17/22) der Stationen der „EU“-Gruppe Stroh verwendet. In der „NA“-Gruppe werden die Tiere überwiegend auf Sägespänen bzw. –mehl (87,5%; 7/8) gehalten und in der „ANZ“-Gruppe stehen 80% (4/5) der Zuchtbullen in Freigehegen ohne Einstreu (siehe Abbildung 4). Dabei hängt die Art des gewählten Einstreumaterials v.a. von lokaler und saisonaler Verfügbarkeit, Preis, Flüssigkeits-absorptionsvermögen und Nährstoffgehalt ab (ENSMINGER 1993).

Stroh zeichnet sich im Vergleich zu Sand oder Sägespänen bzw. –mehl durch höheren Nährstoffgehalt, besseres Absorptionsvermögen und leichtere Kompostierbarkeit aus. Dabei ist das Absorptionsvermögen von geschnittenem Stroh etwa 25% größer als das von ungeschnittenem (ENSMINGER 1993).

Um Verschmutzung und Verbrauch der Einstreu zu reduzieren, sollten in Boxen gehaltene Tiere nach Möglichkeit an der den Liegeplätzen abgewandten Boxenseiten gefüttert werden (ENSMINGER 1993).

Gummimatten oder Wasserbetten bieten eine Alternative zu konventionellen Materialien. Mitunter werden sie jedoch von den Tieren erst angenommen, nachdem

zusätzlich etwas Einstreu aufgebracht wurde (ENSMINGER 1993). Auch hier ist besonders auf eine rutschfeste Oberfläche zu achten. Adäquate Einstreumaßnahmen erhöhen nicht nur das Wohlbefinden der Tiere, sondern führen auch zu einem Rückgang der Lahmheitshäufigkeit (FAULL et al. 1996).

Die Befragung erfasste auch die **Ernährung** von Besamungsbullen in internationalen Zuchtbetrieben. Als Grundfutter dient in den meisten befragten Stationen Heu, Stroh und/oder Silage (siehe Tabelle 11), dabei verwenden Betriebe der „NA“- und der „ANZ“-Gruppe kein Stroh. Gras bildet lediglich in neuseeländischen Stationen die Futtergrundlage. Über die Zusammensetzung oder den Energie- und Proteingehalt der verwendeten Kraft- bzw. Konzentratfuttermittel (siehe Tabellen 12 und 13) gaben nur wenige Betriebe Auskunft

Ähnlich wie die Auswahl des Einstreumaterials hängt auch die Entscheidung über die Fütterungsgestaltung von lokaler und saisonaler Verfügbarkeit, Preis und Nährstoffgehalt ab. Daneben spielen Lagerungsfähigkeit und Akzeptanz eine Rolle. Einseitige Futterrationen, mangelhafte Nährstoffversorgung, grobe Verschmutzungen und Beimengungen von toxischen Inhaltsstoffen wie Phytoöstrogenen, Mykotoxinen, Pflanzenschutzmitteln und Schwermetallen sind zu vermeiden (BUSCH et al. 1991). Langfristige Futterplanung, regelmäßige Probewägungen, unabhängige Futtermittelanalysen und seuchenfreie Bezugsquellen können bei der Vermeidung von Fütterungsfehlern helfen (KORDTS 1963; KIRCHGESSNER 1992).

5.4. Samengewinnung und –beurteilung

In Bezug auf die **Samengewinnung** von Zuchtbullen erfasst die vorliegende Arbeit räumliche Gegebenheiten, Absamungsausrüstung und organisatorischen Ablauf. Dabei konnte festgestellt werden, dass der **Sprungplatz** beinahe aller internationaler Besamungszentren (98,3%, 58/59) in einem geschlossenen Raum („Indoor“) liegt. 49,2% (29/59) der Betriebe besitzen zusätzlich einen im Freien gelegenen

Absamungsbereich („Outdoor“). Eine Station besitzt lediglich einen „Outdoor“-Sprungplatz.

„Indoor“-Plätze machen die Samengewinnung unabhängig von äußeren Einflüssen und erlauben einen konstanten, gleichmäßigen Ablauf der gesamten Samengewinnung. Ein zusätzlicher „Outdoor“-Absamungsbereich bietet die Möglichkeit den Sprungplatz zu wechseln. Dadurch kann ohne Störung organisatorischer und zeitlicher Rahmenbedingungen für die Tiere eine neue Reizsituation gestaltet werden. Auf diese Weise kann die Deckbereitschaft von Zuchtbullen über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden (ALMQUIST u. HALE 1956; HALE 1966; LEIDL et al. 1968).

Sämtliche in der Untersuchung erfassten Absamungsbereiche sind größer als die von SCHAETZ (1963) für Absprungflächen geforderten $8,75 \text{ m}^2$ (2,5m x 3,5m). Allerdings sind die Sprungplätze zum Teil erheblich kleiner als die von KUPFERSCHMIED (1993) postulierten $100 - 150 \text{ m}^2$, zum Teil aber auch deutlich größer.

Die meisten Sprungplätze weisen **Fußböden** aus Beton, Bitumen oder Asphalt auf, die häufig in Kombination mit verschiedenen Matten und zusätzlicher Einstreu im Absprungbereich verwendet werden (siehe Tabellen 17 und 18). Damit werden die Forderungen verschiedener Autoren erfüllt, wonach im Absamungsbereich ein rutschfester Bodenbelag besonders wichtig ist (FINCHER et al. 1956; ALMQUIST 1978; SCHAETZ 1963; KUPFERSCHMIED 1993).

Erwartungsgemäß werden in allen befragten Rinderzuchtorganisationen **künstliche Scheiden** zur Samengewinnung eingesetzt. Diese sind in 61,7% (37/60) der Betriebe mit Wasser, in 30% (18/60) mit Wasser und Luft sowie in 8,3% (5/60) ausschließlich mit Luft gefüllt. Wassergefüllte künstliche Vaginen halten die Ausgangstemperatur länger und kühlen langsamer ab. Wenn über ein Ventil zusätzlich Luft eingeblasen wird, kann der Innendruck der künstlichen Scheiden den individuellen Bedürfnissen einzelner Bullen angepasst werden. Dagegen verlieren ausschließlich mit Luft gefüllte künstliche Scheiden schneller an Wärme, so dass die

Samengewinnung in engerem zeitlichen Zusammenhang mit der Entnahme der künstlichen Scheiden aus dem Brutschrank o.ä. erfolgen muss. Andererseits ist bei luftgefüllten künstlichen Scheiden das Risiko einer Wasserkontamination der Ejakulate z.B. durch eine Perforation des Innenschlauches, ausgeschlossen.

Die durchschnittliche Temperatur der künstlichen Scheiden zum Zeitpunkt der Samenentnahmen wurde mit $42,9 \pm 5,1^\circ\text{C}$ (n=60) angegeben. Insgesamt verwenden Besamungsstationen der „NA“- ($49,5 \pm 6,7^\circ\text{C}$; n=8) und der „ANZ“-Gruppe ($46,0 \pm 7,4^\circ\text{C}$; n=5) deutlich höhere Temperaturen als deutsche Betriebe ($40,4 \pm 1,3^\circ\text{C}$; n=19) sowie Stationen der „EU“- ($42,6 \pm 4,3^\circ\text{C}$; n=22) und der „NEU“-Gruppe ($40,7 \pm 3,2^\circ\text{C}$; n=6). Damit entsprechen die meisten Besamungszentren den in der Literatur geforderten Temperaturwerten (siehe Übersicht 4).

Lediglich für die beiden Extremwerte von 36°C in einer Schweizer und 63°C in einer amerikanischen Station konnten keine entsprechenden Empfehlungen gefunden werden. Allerdings berichteten HAFS (1966) und ALMQUIST (1973) von guten Erfahrungen mit Temperaturen von 40°C bis 56°C bzw. 60°C .

Dagegen wies SCHAETZ (1963) darauf hin, dass sich Bullen mitunter schnell an höhere Temperaturen gewöhnen und weitere Steigerungen verlangen können. Wichtiger jedoch ist der mögliche spermaschädigende Effekt von Temperaturen über 42°C .

Absamer, die künstliche Vaginen mit mehr als 42°C verwenden, müssen daher besonders darauf achten, dass sich die Penisspitze bei der gesamten Ejakulation des Bullen in Nähe des Spermaauffanglases befindet. Wird das Ejakulat ganz oder teilweise im Mantelrohr der künstlichen Scheide abgesetzt, kann es beim Abfließen in das Auffangglas durch die hohen Temperaturen im Inneren der künstlichen Vagina zur Hitzedenaturierung kommen.

Den Ergebnissen der Studie zufolge werden **Elektroejakulatoren** nicht in deutschen Stationen und ebenso wenig in der Mehrzahl der „EU“- Stationen (81,8%; 18/22) und der „NEU“-Stationen (83,3%; 3/5) eingesetzt. Dagegen verwenden die meisten Betriebe der „NA“- (75%; 6/8) und der „ANZ“-Gruppe (60%; 3/5) Elektroejakulatoren gelegentlich oder regelmäßig.

Grundsätzlich weisen Ejakulate, die mit Hilfe von Elektroejakulatoren gewonnen wurden (E-Ejakulate), größere Volumen und niedrigere Konzentrationen auf, als solche die mit Hilfe von künstlichen Scheiden gesammelt wurden (kS-Ejakulate). Obwohl in der Gesamtmenge an Spermien pro Ejakulat keine signifikanten Unterschiede bestehen (AUSTIN et al. 1961; FOSTER et al. 1970), sind bei E-Ejakulaten die Voraussetzungen für eine einheitliche Beurteilung nicht gegeben (GÖTZE 1949).

Allerdings bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Non-Return-Raten von E-Ejakulaten und kS-Ejakulaten (DZIUK et al. 1954; HILL et al. 1956).

Die Frage, ob die Elektroejakulation bei Bullen negative Assoziationen oder körperliche Schädigungen bewirken kann, wird in der Literatur unterschiedlich bewertet (DZIUK et al. 1954; MARDEN 1954; AUSTIN et al. 1961; LOGUE u. GREIG 1987; SCHAETZ 1963; CARROLL et al. 1963). In Deutschland wird die Verwendung von Elektroejakulatoren zur Spermagewinnung im Tierschutzgesetz vom 25.05.1998 nicht explizit genannt. Allerdings verbietet §3(1) „einem Tier außer in Notfällen Leistungen abzuverlangen, denen es wegen seines Zustandes offensichtlich nicht gewachsen ist oder die offensichtlich seine Kräfte übersteigen“ und §3(11) untersagt „ein Gerät zu verwenden, das durch direkte Stromeinwendung das artgemäße Verhalten eines Tieres...erheblich einschränkt..“. Elektroejakulatoren dürfen demnach in Deutschland nicht verwendet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass **Phantome** in 49,2% (29/59) der befragten Rinderzuchtstationen als Aufsprungpartner benutzt werden. Allerdings existieren große Unterschiede zwischen den einzelnen geographischen Gruppen. In Deutschland besitzen 83,3% (15/18) der Betriebe Phantome. In der „EU“-Gruppe dagegen nur 54,5% (12/22) und in der „NEU“-Gruppe lediglich 33,3% (2/6). Betriebe der „NA“- und der „ANZ“- Gruppe verwenden keine Phantome.

FÜHRER (2001) vertrat die Ansicht, dass Erfolg oder Misserfolg von Phantomen v.a. von der Einstellung der Personen abhängen, die bei der Samengewinnung beteiligt

sind. Demnach spiegeln die erhobenen Daten eine unterschiedliche Akzeptanz in den einzelnen geographischen Gruppen wieder.

Zusätzlich oder anstelle von Phantomen werden von allen befragten Besamungszentren andere Bullen als **lebende Sprungpartner** eingesetzt. 41,7% (25/60) der internationalen Stationen verwenden zudem Kastraten und 11,7% (7/60) weibliche Rinder. Auch hier finden sich einige länder- bzw. gruppenspezifischen Besonderheiten: Während alle Betriebe der „NA“- (n=8) und der „ANZ“- Gruppe (n=6), sowie allen britischen (n=5) und französischen Stationen (n=2) Kastraten halten, trifft dies nur für eine deutsche Station (5%; n=19) zu.

Weibliche Rinder werden lediglich in 18,2% (4/22) der Besamungszentren der „EU“- Gruppe, aber in 60% (3/5) der Betriebe der „ANZ“-Gruppe und in keiner der anderen Gruppen gehalten.

Nach Einschätzung von SCHAETZ (1963) und PÜSCHEL (1974) sind männliche Aufsprungtiere der Sprungbelastung besser gewachsen als weibliche Tiere. Um bei Bedarf Besamungsbullen zusätzlich durch olfaktorische Reize stimulieren zu können, ist die Haltung einzelner weiblicher Aufsprungtiere durchaus sinnvoll. Allerdings besteht bei der Samengewinnung mit Hilfe von weiblichen Aufsprungtieren die Gefahr einer tatsächlichen Kopulation. Dies kann durch entsprechende Schutzmaßnahmen, wie z.B. Plastikschürzen o.ä., und/oder eine qualifizierte Absamungstechnik vermieden werden.

Bei Aufsprungtieren sollte v.a. auf geeignete Körpergröße und ruhiges Verhalten geachtet werden (KUPFERSCHMIED 1993). Diese Bedingungen werden i.d.R. von Kastraten sehr gut erfüllt. Jungbullen sollten aufgrund der Gefahr von Gelenkschädigungen und degenerativen Erkrankungen nicht als Aufsprungpartner verwendet werden (BARGAI u. COHEN 1992).

Aus Gründen des Tierschutzes sind Aufsprungtiere nach einigen Sprüngen gegen andere Tiere auszutauschen (KUPFERSCHMIED 1993). Ein Wechseln der Sprungpartner kann das sexuelle Interesse der Besamungsbullen erhöhen bzw. über

eine längere Zeit aufrecht erhalten (ALMQUIST u. HALE 1956; HALE 1966; LEIDL et al. 1968; ALMQUIST 1978).

Ejakulate sollen vollständig, unverändert, sauber, ohne Schädigung der Tiere oder beteiligter Personen gewonnen werden. Dabei muss die Identität eines Ejakulates zu jedem Zeitpunkt zweifelsfrei gesichert sein.

Um eine Verwechslung von Tieren oder Ejakulaten zu vermeiden, schlug VAN DEN BERG (2001) vor, einen **Absamungsplan** in Sprungraum und Labor anzubringen, der die Reihenfolge der Samengewinnungen bestimmt. In der Mehrzahl der befragten Rinderzuchtstationen ist zwar ein solcher Absamungsplan vorhanden, allerdings legt dieser nur in knapp der Hälfte der Betriebe auch die tatsächliche Absamungsabfolge fest. Dabei weist Deutschland den größten Anteil an Stationen auf, bei denen die im Plan vorgegebene Reihenfolge stets befolgt wird.

Grundsätzlich steigt bei einem Abweichen von der Vorgabe das Risiko einer Probenverwechslung, allerdings ermöglicht ein flexibleres System eine schnelle Anpassung an sich ändernde Notwendigkeiten, wenn etwa die Libido eines Bullen durch den Wechsel des Aufsprungtieres erhöht werden soll oder die Absamungsabfolge spontan geändert wird, um das sexuelle Interesse eines Tieres, durch längere Beobachtung der Absamung anderer Bullen, zu erhöhen.

Bei der Vermeidung von Zuordnungsfehlern im Ablauf der Samengewinnung ist die eindeutige **Kennzeichnung der Zuchtbullen** von wesentlicher Bedeutung. In der überwiegenden Mehrzahl der untersuchten Besamungsstationen werden die Tiere über Namen, Nummern und Ohrmarken identifiziert. Daneben werden in zwei europäischen Stationen und den Betrieben der „ANZ“-Gruppe (Kalt-)Brände verwendet. Nur drei Besamungszentren setzen elektronische Transponder ein, obwohl diese Methode als sehr sicher gilt. Abgelesene Daten können direkt in den Computer transferiert und mit den Parameterwerten des jeweiligen Ejakulates gekoppelt werden. Der Einsatz elektronischer Transponder und computergestützter Erkennungssysteme ist vermutlich aufgrund der Anschaffungskosten bisher auf wenige Stationen beschränkt geblieben.

Nach übereinstimmender Ansicht mehrerer Autoren müssen Bullen während des gesamten Vorganges der Samengewinnung mit einer am Nasenring befestigten Führstange und einem am Halfter angebrachten Leitstrick gesichert werden (KORDTS 1963; SCHAETZ 1963; BUSCH et al. 1991). Dieser Forderung kommen nicht alle Besamungsstationen in gleichem Maße nach. Zwar verwendet eine Mehrzahl der Betriebe Halfter und/oder Nasenstricke, aber weniger als die Hälfte setzen auch Führstangen ein. Dabei werden diese in 14 der untersuchten 19 deutschen Stationen benutzt, sind aber nur einem Betrieb der „ANZ“-Gruppe zu finden. Unterschiede bestehen auch in Bezug auf die Anzahl verwendeter **Nasenringe**. In der Regel tragen Produktionsbullen ein bis zwei Nasenringe. Lediglich an einer tschechischen Station werden den Tieren mitunter drei Nasenringe eingezogen; an einer australischen Station erhält ein Teil der Bullen keine Nasenringe. In der Einschätzung der Notwendigkeiten der Bullensicherung bestehen zwischen den einzelnen geographischen Gruppen demnach große Differenzen.

LÜBKE (1974) beschreibt den für die Besamungsstation Neunkirchen-Eischeid verantwortlichen Bullenhalter Johannes Schröder als einen „stabilen, furchtlosen Mann und zuverlässig von Natur aus, begabt mit Instinkten, die für den Umgang mit Tieren wesentlich sind“, von dem eine „unsichtbare wirkende Kraft auf die Tiere“ ausging. In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, dass Bullen in allen internationalen Besamungsstationen von ähnlich begabten und erfahrenen **Tierpflegern** geführt werden.

Allerdings besaßen die Samennehmer bzw. „Operateure“ unterschiedliche Qualifikationen. In 88,3% (53/60) aller Betriebe werden Absamungen von Tierpflegern, Technikern bzw. Facharbeitern, in 15% (9/60) auch von Tierärzten, Veterinär- oder Agraringenieuren durchgeführt (siehe Tabelle 28). Als weitere Absamer werden Laborpersonal, Studenten und Betriebsleiter genannt. Nach Einschätzung von TRAUTWEIN et al. (1958) sind Tierärzte, die an Bullen Impfungen, Blutentnahmen, Fremdkörperoperationen oder andere Eingriffe ausführen und bei diesen negative Assoziationen auslösen können, als Samennehmer ungeeignet.

Andererseits ist es jedoch wichtig, dass auch die Stationstierärzte mit den Deckgewohnheiten der einzelnen Bullen vertraut sind, um Störungen physischer und psychischer Art rechtzeitig erkennen, beurteilen und behandeln zu können (SCHAETZ 1963).

Grundsätzlich sind bei der Samengewinnung nur durch gut eingespielte Teamarbeit zufrieden stellende Ergebnisse zu erzielen. Dabei sollte die Samennahme nicht an individuelle Person gebunden sein, damit das Team auch bei Abwesenheit einzelner Mitglieder handlungsfähig bleibt. Der Absamungserfolg beruht wesentlich auf dem richtigen Umgang mit den Tieren. Hier sind hohes Einfühlungsvermögen, besondere Sorgfalt, Geduld und Sachkenntnis erforderlich (ALMQUIST 1978; BUSCH et al. 1991; TROXLER 2001). Bereits TRAUTWEIN et al. (1958) machten falschen Umgang und fehlerhafte Behandlung der Tiere maßgeblich für die Entwicklung einer „Bösartigkeit“ verantwortlich.

Von den Produktionsbullen der befragten Stationen wird durchschnittlich $3,7 \pm 2,1$ ($n=60$) Mal pro Woche Samen gewonnen. Auch hier finden sich zwischen einzelnen Ländern zum Teil erhebliche Unterschiede (siehe Tabellen 31 und 32). Die von einzelnen Stationen angegebenen Werte liegen dabei zwischen 2 und 10 Absamungen pro Woche.

In der Literatur finden sich zahlreiche Empfehlungen bezüglich einer optimalen Absamungsfrequenz. Eine Vielzahl von Autoren berichtete, dass Absamungsfrequenzen von 6 bis 7 Mal pro Woche, keine negativen Folgeerscheinungen für die Zuchtbullen und ihre Ejakulate hatten (HAFS et al. 1959; MARTIG et al. 1966; CUNNINGHAM et al. 1967; MARTIG u. ALMQUIST 1969; ALMQUIST u. AMANN 1976; ALMQUIST 1982). In Anbetracht der empfohlenen Absamungsregimes könnten Besamungszentren mit einer deutlich niedrigeren Frequenz ihre Spermienproduktion u.U. durch eine entsprechende Anpassung steigern.

Der Spermiengehalt eines Ejakulat ist neben Alter und Rasse der Bullen sowie zeitlichem Abstand zwischen einzelnen Samengewinnungen (EVERETT u. BEAN

1982) vor allem vom Grad der **sexuellen Stimulation** vor der Absamung abhängig (SALISBURY u. VAN DENMARK 1961; ALMQUIST 1973, 1978; PFEILSTICKER 1975; JANSEN 1984).

In der vorliegenden Arbeit konnten teilweise große Unterschiede bezüglich Dauer und Durchführung der sexuellen Stimulation (siehe Tabellen 33 bis 36) festgestellt werden. Insgesamt beträgt die **Stimulationszeit** in den befragten Betrieben zwischen 30 Sekunden und 3 Stunden; es werden 0 bis 6 **Blindsprünge** durchgeführt.

Damit weichen einzelne Besamungsbetriebe zum Teil erheblich von den in der Literatur genannten „Rückhalte- bzw. Wartezeiten“ und der Anzahl empfohlener Blindsprünge ab. Betrachtet man aber die durchschnittliche Anreizdauer ($8,3 \pm 4,5$ min; $n=53$) und die durchschnittlich durchgeführte Anzahl an Blindsprüngen ($2,3 \pm 1,0$; $n=59$), so entsprechen diese weitgehend den von einer Vielzahl von Autoren empfohlenen Zeitspannen von 2 min bis 8 min bei ein bis drei Blindsprüngen (COLLINS et al. 1951; BRANTON et al. 1952; SCHÄFER 1961; PÜSCHEL 1974; PFEILSTICKER 1975; AMANN u. ALMQUIST 1976; ALMQUIST 1978, 1982; LORTON et al. 1984).

In Anbetracht der Bedeutung der sexuellen Stimulation für die Gewinnung qualitativ und quantitativ hochwertiger Ejakulate stellt sich die Frage, ob Besamungsstationen, die nur sehr kurze oder keine stimulierenden Maßnahmen durchführen, durch Veränderung des Absamungsregimes mit besserer Stimulierung auch eine bessere Spermienausbeute pro Ejakulation erzielen könnten.

Andererseits kann die Spermienausbeute durch Erhöhung der Anzahl an Blindsprüngen bzw. eine Verlängerung der Stimulationszeit nicht beliebig gesteigert werden. Betriebe, die routinemäßig eine hohe Zahl an Blindsprüngen durchführen, könnten durch eine Reduzierung u.U. dieselbe Menge an Spermien in kürzere Zeit und unter geringerem Arbeitsaufwand gewinnen.

Die **Beurteilung** von **Frischsperma** erfolgt im direkten Anschluss an seine Gewinnung; **Gefrierportionen** müssen zur Untersuchung aufgetaut werden. Dabei

werden von den einzelnen Stationen unterschiedliche Auftauprotokolle befolgt. Die verwendeten Auftautemperaturen liegen zwischen 25°C und 40°C. Die Auftauzeit beträgt in den meisten deutschen Stationen sowie der Mehrheit der „EU“- und der „NEU“-Stationen 10sec bis 20sec. In der „NA“-Gruppe überwiegen Auftauzeiten von 31sec bis 60sec. Zwei neuseeländische Betriebe belassen die Besamungsportionen durchschnittlich sogar 450sec in der Auftauvorrichtung.

Dabei ist zu bedenken, dass die in aufgetautem Sperma untersuchten Parameter und insbesondere die Befunde für Motilität und akrosomale Integrität, entscheidend durch Auftauzeit und -temperatur beeinflusst werden (AAMDAL u. ANDERSEN 1968; ROBBINS et al. 1976; PACE et al. 1981). Das korrekte, standardisierte Auftauen tiefgefrorener Besamungsportionen ist deshalb eine wichtige Voraussetzung für deren Beurteilung (KUPFERSCHMIED 1993). Wenn innerhalb eines Labors bzw. in verschiedenen Zuchtstationen unterschiedliche Auftauregimes angewendet werden, dann sind die erhobenen Befunde nur bedingt vergleichbar.

Von frisch gesammelten Ejakulate werden in allen (59/59) befragten Besamungszentren **Volumen** und **Konzentration** bestimmt. Beide Parameter ermöglichen die Ermittlung der Anzahl Besamungsdosen, die aus einem Ejakulat hergestellt werden kann, und der hierfür benötigten Menge an Verdünnungsmedium (BUSCH et al. 1991).

Eine exakte Bestimmung ist daher notwendig, damit die produzierten Spermadosen auch tatsächlich die gewünschte Anzahl Samenzellen enthalten. Ein Unterschreiten der Spermienzahl pro Dosis kann negative Folgen für die Befruchtungsfähigkeit haben, ein Überschreiten bedeutet einen wirtschaftlichen Verlust, wenn in der Konsequenz weniger Besamungsportionen pro Ejakulat hergestellt werden und das genetische Potential eines Zuchtbullen nicht optimal genutzt wird (CHRISTENSEN et al. 2001).

In den meisten internationalen Rinderzuchtstationen (74,6%; 44/59) wird das **Volumen** eines Ejakulates durch Ablesen des graduierten Spermaauffangglases bestimmt. Die übrigen 25,4% (15/59) ermitteln das Volumen über das Gewicht des

Ejakulates. Sieben dieser 15 Stationen berücksichtigen die Tatsache, dass das spezifische Gewicht von Sperma nicht dem von Wasser entspricht und multiplizieren den Gewichts-Wert mit einem Korrekturfaktor. Bemerkenswerter Weise verwenden 2 Betriebe einen Multiplikations-Faktor, der größer als „1“ ist. Da das spezifische Gewicht von Sperma höher als das von Wasser ist, erscheint dies wenig sinnvoll. Die anderen 5 Stationen benutzen Multiplikationsfaktoren von „0,935“ bis „0,96“ und liegen damit im Bereich des von CHRISTENSEN et al. (2001) empfohlenen Korrekturwertes.

Die Angaben von 45 Besamungszentren bezüglich der Mindestanforderungen an das Volumen eines Ejakulates liegen zwischen 0,5ml und 3ml. Betriebe der „NA“-Gruppe wiesen dabei die niedrigsten Anforderungen ($0,6 \pm 0,3$ ml; n=4) und Betriebe der „NEU“-Gruppe die höchsten Anforderungen ($2,0 \pm 0,6$ ml; n=6) auf. Die Mindestanforderungen der anderen drei Gruppen liegen nahe beieinander (D: $1,7 \pm 0,8$ ml, n=16; EU: $1,6 \pm 0,5$ ml, n=16; ANZ: $1,5 \pm 0,9$ ml, n=3), insgesamt aber unter den in der Literatur geforderten Werten von 2ml (UWLAND 1984; BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993) bis 3ml (LOGUE u. GREIG 1987).

Die Bestimmung der Spermien-**Konzentration** sowohl von unverdünnten Ejakulaten, als auch von fertigen Besamungsportionen, ist für eine Zuchtstation von großer Bedeutung. Erstere liefert die Basis für die weitere Verarbeitung (s.o.), letztere ist Teil der Qualitätskontrolle und hilft eventuelle Herstellungsfehler zu identifizieren.

85,7% (48/56) der befragten Stationen ermitteln die Konzentration in frischen Ejakulaten mit Hilfe von Photometern. Die Messgenauigkeit der verwendeten Geräte sollte regelmäßig anhand von Kontrollbestimmungen z.B. durch Zählkammern überprüft werden. Photometer sind nicht zur Konzentrationsbestimmung von aufgetauten Spermaportionen geeignet, da die Verdünnermedien zur Trübung der Probe beitragen und so die Ergebnisse verfälschen (CHRISTENSEN et al. 2001).

Partikelzählgeräte werden von sieben Stationen zur Konzentrationsbestimmung von frischen Ejakulaten und von vier Stationen zur Konzentrationsbestimmung von

aufgetauten Besamungsportionen eingesetzt. Partikelzählgeräte zeichnen sich durch einfache Handhabung und gute Wiederholbarkeit der Resultate aus. Sie erbringen außerdem wesentlich schnellere Resultate als die Zählkammern. Ihr Nachteil liegt in der fehlenden Differenzierung zwischen Spermien einerseits und somatischen Zellen, Zytoplasmotropfen, Bakterien und anderen Verunreinigungen andererseits.

Zählkammern werden lediglich von einer Station der „ANZ“-Gruppe zur Konzentrationsbestimmung von Frischsperma verwendet. Zur Qualitätskontrolle aufgetauter Tiefgefrierportionen kommen sie dagegen in 18 Besamungszentren zum Einsatz. Um verlässliche Ergebnisse zu erzielen, müssen stets mehrere Untersuchungsdurchgänge pro Ejakulat durchgeführt werden (EVENSON et al., 1993), da bei doppelter Zk-Konzentrationsbestimmung eines Ejakulates durch denselben Untersucher Abweichungen von bis zu 20% auftreten können (FREUND u. CAROL 1964). Aus diesem Grund ist die Ermittlung der Spermakonzentration mit Hilfe von Zählkammern relativ zeitintensiv.

In einem australischen Betrieb wird die Konzentration von Frischsperma subjektiv durch visuelle Schätzung bestimmt. Zwar beschrieb KRAUSE (1990) einen Schlüssel zur grobsinnlichen Dichteschätzung anhand der Konsistenz von Ejakulaten, die Einteilung ist jedoch relativ ungenau und scheint in Anbetracht der Verfügbarkeit überlegener Methoden wenig zeitgemäß.

Durchflusszytometer werden in einer Station zur Konzentrationsbestimmung von frischem Sperma und in zwei Betrieben zur Dichtebestimmung von Besamungsportionen eingesetzt. Da diese Geräte pro Sekunde Tausende von Zellen objektiv analysieren können, sind die Ergebnisse sehr präzise und wiederholbar. Zudem besteht die Möglichkeit die Konzentrationsbestimmung mit einer Untersuchung der Spermien-Lebensfähigkeit zu verbinden (s.u.).

Die Mindestanforderungen an die Spermienkonzentration eines Ejakulates liegen in allen befragten Besamungsstationen zwischen 300 und 800 $\times 10^6$ /ml und entsprechen

damit den in der Literatur geforderten Minimalwerten von $300 \times 10^6/\text{ml}$ (LOGUE u. GREIG 1987) bzw. $600 \times 10^6/\text{ml}$ (UWLAND 1984; KUPFERSCHMIED 1993).

Die Spermiedichte in Besamungsportionen hängt von der enthaltenen Anzahl Spermien und vom Volumen der Portion ab.

Die **Massenbewegung** wird nur in unverdünnten Spermaproben, nicht aber an aufgetauten Besamungsportionen beurteilt. In 70,2% (33/47) aller europäischen Stationen, jedoch nur in 57,1% (4/7) der Betriebe der „NA“-Gruppe und 60% (3/5) der Betrieben der ANZ“-Gruppe wird dieser Parameter bestimmt.

In einer vorgegebenen sechsstufigen Bewertungsskala liegen die Mindestanforderungswerte für die Massenbewegung in frischem Sperma von 30 Stationen mehrheitlich um die Stufe „3“ ($M \pm SD: 3,0 \pm 0,7$), was einer lebhaften Wellenbewegung entspricht. Damit wird die Forderung einer Reihe von Autoren erfüllt, wonach Sperma guter Qualität eine lebhafte Massenbewegung aufweisen soll (LOGUE u. GREIG 1987; WENKOFF 1988; BUSCH et al. 1991; KUPFERSCHMIED 1993). Drei europäische Besamungsbetriebe akzeptieren bereits Sperma der Stufe „1“ (langsame Wellenbewegung). In drei anderen europäischen, sowie einer neuseeländischen Station hingegen, wird nur Sperma der Bewertungsstufe „4“ (lebhafte bis intensive Wellenbewegung) oder besser verarbeitet.

Die vorliegende Studie bestätigt Aussagen von STALHAMMAR et al. (1994) und DEN DAAS (1997), nach denen die **Motilität** von Samenzellen, neben der Bestimmung von Volumen und Konzentration eines Ejakulates, das am häufigsten untersuchte Kriterium der Spermabeurteilung ist.

An **Frischsperma** führen 94,9% (56/59) der befragten Besamungsstationen Untersuchungen zur Spermien-Motilität durch. Die Mindestanforderung an den Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen in frischen Ejakulaten beträgt bei 55 Stationen durchschnittlich $64,7 \pm 10,0\%$ ($M \pm SD$). Allerdings weichen die einzelnen Stationen zum Teil erheblich von den in der Literatur genannten Mindestwerten ab. Hier forderten LOGUE und GREIG (1987) 50%, BUSCH et al. (1991) 60%, ANZAR et al.

(2002) 65 % und KUPFERSCHMIED (1993) 70% motile Samenzellen in frischen Ejakulaten.

Die **Motilität aufgetauter Besamungsportionen** wird in allen befragten Rinderzuchtbetrieben bestimmt. Dabei schwanken die für die Motilität geltenden Mindestanforderungen zwischen 20% und 80% ($M \pm SD$: $45,2 \pm 9,6\%$). Aus den von einzelnen Stationen geforderten Mindestanteilen aktiv vorwärts beweglicher Samenzellen und der in einer Besamungsdosis derselben Betriebe durchschnittlich enthaltenen Spermienzahl, kann auf die Mindestzahl vorwärts beweglicher Spermien je aufgetauter Besamungsdosis geschlossen werden. Die bestimmten Werte liegen insgesamt zwischen 3,5 und 24 Millionen ($M \pm SD$: $8,2 \pm 3,5$).

Obwohl Bullen abhängig von der individuellen Fruchtbarkeit unterschiedlich große Besamungsdosen für gute Befruchtungsergebnisse benötigen, überrascht diese große Spannbreite motiler Spermien in aufgetauteten Besamungsportionen, zumal sich die Angaben der einzelnen Stationen auf alle Bullen des Betriebes, d.h. auf Tiere unterschiedlicher Fertilität, beziehen.

Offensichtlich besteht bei Besamungen mit zu niedrigen Dosen die Gefahr reduzierter Befruchtungserfolge. Andererseits gestatten zu hohe Dosen u.U. nicht die optimale Ausnutzung des genetischen Materials eines Vattertieres (CHRISTENSEN et al. 2001). In diesem Spannungsfeld muss jede rinderzüchtende Organisation den Spermiengehalt pro Besamungsportion für jeden Bullen individuell festlegen. Dies fällt umso leichter, je mehr Informationen über die tatsächliche Fruchtbarkeit eines Zuchtbullen vorhanden sind.

Unabhängig ob Motilitätsbestimmungen an frischen oder aufgetauten Proben vorgenommen werden, muss vor und während der Untersuchung auf eine genaue Temperaturkontrolle geachtet werden, da sowohl der Anteil beweglicher Spermien, als auch die Bewegungsgeschwindigkeit stark temperaturabhängig sind. HAMMERSTEDT und HAY (1980) demonstrierten, dass der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen schon bei einem Temperaturabfall von 37°C auf 32°C um 25% reduziert war. Bei Temperaturen unter 20°C konnten sie nur noch 35%

der ursprünglichen Motilität und Geschwindigkeit beobachten. Es ist daher von größter Wichtigkeit, dass alle mit dem Sperma in Kontakt kommenden Geräte und Materialien auf 37°C vorgewärmt werden und der Mikroskopisch über eine beheizte Objektträgerauflage verfügt.

Selbst unter optimalen Bedingungen bezüglich Temperaturkontrolle, technischer Ausstattung und Verdünnung von Proben, bleibt die visuelle Schätzung der Motilität eine subjektive Untersuchungsmethode, die zudem eine geringe Wiederholbarkeit der Ergebnisse aufweist (DEIBEL et al. 1976; CHRISTENSEN et al. 1999; DUMONT 1999). AMANN (1981) empfahl deshalb Motilitätsbestimmungen von zwei Untersuchern an unterschiedlichen Proben desselben Ejakulates durchführen zu lassen. Nach CHRISTENSEN et al. (1999) lässt die visuelle Motilitätsbestimmung keine zufrieden stellende Vorhersage der Fruchtbarkeit zu. Dagegen vertrat DEN DAAS (1997) die Ansicht, dass es gerade aufgrund der geringen Aussagefähigkeit der Motilitätskriterien über die Fruchtbarkeit eines Ejakulates, gerechtfertigt ist, die Motilität allein durch visuelle Untersuchung zu bestimmen.

Die alternativ zur Verfügung stehenden computergestützten Videoanalysen scheinen sich in internationalen Rinderzuchtstationen bisher nicht durchgesetzt zu haben, da nur eine deutsche Station angab, ein solches System verwenden zu wollen. Allerdings enthielt der Fragebogen keine direkte Frage nach der Methodik der Motilitätsbestimmung.

Morphologische Beurteilungen von Frischsperma werden in 51 Zuchtstationen durchgeführt. Dagegen analysieren nur 2 Stationen die Spermienmorphologie aufgetauter Besamungsportionen.

Für die Beurteilung aufgetauter Besamungsportionen wurden keine Mindestwerte bezüglich des Anteils morphologisch intakter Samenzellen genannt; für Frischsperma liegen die Grenzwerte zwischen 35% und 88%. Insgesamt beträgt die Mindestanforderung an Frischsperma in 43 Betrieben durchschnittlich $75,1 \pm 8,7\%$ ($M \pm SD$). Damit gestattet die Mehrzahl der Stationen einen höheren Anteil morphologisch veränderter Spermien als von den meisten Autoren gefordert (siehe Übersicht 6).

Bei frischen Ejakulaten führen 13 Zuchtstationen eine Differenzierung lebender und toter Samenzellen mit Hilfe von Eosinfärbungen durch. Dabei wird der Farbstoff Eosin v.a. von Betrieben der „EU“-Gruppe angewendet. Die für Frischsperma geforderten Mindestanteile lebender Spermien liegen zwischen 50% und 80%. Sie sind damit z.T. höher, z.T. aber auch niedriger als die von BUSCH et al. (1991) und KUPFERSCHMIED (1993) postulierten 75%. An aufgetauten Besamungsportionen führt lediglich eines der befragten Unternehmen Eosinfärbungen (in Kombination mit Anilin-Blau) durch. Eine weitere Station trennt lebende und tote Spermien mit Hilfe von Sephadex-Filtern und bestimmt die Fraktion lebender Zellen durch anschließende Partikelzählgerät-Messungen. Mindestanforderungen werden nicht genannt.

Fluoreszenzmarker dienen der Untersuchung der **Lebensfähigkeit** von Samenzellen, indem sie Aufschluss über die **Membranintegrität** geben und je nach verwendetem Farbstoff die Differenzierung lebender, toter und/oder absterbender Zellen ermöglichen. Als „lebensfähig“ werden Zellen bezeichnet, die über eine intakte Zellmembran verfügen und sich nur von entsprechenden selektiven Farbstoffen anfärben lassen (siehe Kapitel 2.6.4.2.).

Lediglich 4 Besamungszentren analysieren Frischsperma mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern. Eine Station verwendet zur Untersuchung Fluoreszenzmikroskope, drei andere Stationen setzen Durchflusszytometer („Flow Cytometer“) ein. Dieselben drei Stationen und ein weiterer Betrieb verwenden Durchflusszytometer auch zur Beurteilung aufgetauter Besamungsportionen. Die genannten Mindestanforderungen bezüglich des Anteils lebensfähiger Samenzellen liegen für Frisch- und aufgetautes Sperma zwischen 40% und 60%.

Als Fluoreszenzmarker werden Hoechst 33258, Propidium Jodid (PI) und SYBR-14 verwendet. Mit Hoechst 33258 gefärbte Proben zeichnen sich durch eine sehr geringe Hintergrundfärbung aus (DE LEEUW et al. 1991). Fixierte Präparate erlauben eine gleichzeitige Beurteilung der Spermien-Morphologie (DE LEEUW et al. 1991), unfixierte Präparate ermöglichen die simultane Untersuchung der Spermien-

Motilität (WOELDERS 1991). Die Doppelfärbung mit PI und SYBR-14 ermöglicht eine schnelle und gute Unterscheidung lebender, absterbender und toter Samenzellen in frischen und aufgetauten Proben (GARNER et al. 1994, GARNER u. JOHNSON 1995; CHRISTENSEN et al. 2000a, 2001). Die Vorteile liegen in der schnellen Durchführung (15min), der Anregbarkeit des SYBR-14-Fluoreszenzmarkers durch sichtbares Licht (im Gegensatz zu UV-Licht bei H33258), dem Fehlen von Hintergrundverfärbungen und Artefakten (wie bei R123 und CMFDA) und der Möglichkeit, die Verschiebung einer Spermienpopulation vom Grün – (SYBR-14, lebend) in den Rot- (PI, tot)- Bereich am mikroskopischen Präparat bei gleichzeitiger Motilitätsbeurteilung beobachten zu können. Zudem sind vollautomatische Durchflusszytometer erhältlich, die neben der Lebensfähigkeit auch die Spermienkonzentration bestimmen können (CHRISTENSEN et al. 2000a, 2001). Mit Hilfe der Doppelfärbung mit SYBR-14/PI kann durch die Bestimmung des Anteils lebensfähiger Samenzellen vor und nach dem Gefriervorgang eine Aussage über die Gefrierfähigkeit des Spermas eines Bullen getroffen werden (GARNER et al. 1997). Nach Angaben von GARNER et al. (1997) lässt der SYBR-14/PI-Test keine genaue Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit zu. Dagegen berichteten CHRISTENSEN et al. (2000a) von hohen positiven Korrelationen zwischen den Ergebnissen der SYBR-14/PI-Kombinationsfärbung und den NR-Raten der untersuchten Ejakulate.

Andere Fluoreszenz-Methoden, wie der FITC-AnnexinV/PI-Test (ANZAR et al. (2002), der noch präzisere und verlässlichere Ergebnisse als die SYBR-14/PI-Kombinationsfärbung erbringt, werden bisher nicht in der Praxis der Besamungstationen eingesetzt.

In Anbetracht der Vorteile einer Beurteilung der Spermien mit Hilfe von Durchflusszytometern, erscheint die Zahl der Besamungstationen, die derartige Geräte einsetzen, überraschend klein. Die schlechte Vorhersagbarkeit von Befruchtungserfolgen auf Basis mikroskopischer Untersuchungen wurde vielfach beschrieben (STALHAMMAR et al. 1994; CHRISTENSEN et al. 1999). Obwohl Berichte über hohe positiven Korrelationen zwischen den Ergebnissen von

Durchflusszytometer-Analysen und den NR-Raten der untersuchten Ejakulate vorliegen (CHRISTENSEN et al. 2000a), verlässt sich die überwiegende Mehrzahl der Betriebe bei der Auswahl für die künstliche Besamung geeigneter Ejakulate allein auf die mikroskopische Sperma-Beurteilung.

Es ist zu vermuten, dass hoher Preis und schwierige Bedienung von Durchflusszytometern bisher viele Betriebe von einer entsprechenden Anschaffung abgehalten haben. Mit der Entwicklung automatisierter, kostengünstiger Geräte ist mit einer größeren Verbreitung dieser Technologie zu rechnen.

Osmotische Resistenztests (ORTs) demonstrieren, ob die Plasmamembran eines Spermiums in hypoosmolarem Milieu in der Lage ist, niedrig-molekulare Verbindungen wie Zucker und Salze am Verlassen der Zelle zu hindern. ORTs sind für die Untersuchung von Frischsperma nicht geeignet (REVELL u. MRODE 1994) und werden hierfür auch von keiner der befragten Stationen eingesetzt. Bei aufgetauten Besamungsportionen bestehen dagegen hoch positive Korrelationen zwischen den ORTs-Ergebnissen und den bereinigten NR-Raten derselben Ejakulate (REVELL u. MRODE 1994). Da ORTs lediglich kurze Inkubationszeiten erfordern, liegen die Test-Ergebnisse bereits vor dem Beginn des Konfektionierungsvorganges der Besamungsportionen vor. Von den in der vorliegenden Studie befragten Besamungszentren wendet lediglich eine Station ORTs an, die auf dem von REVELL und MRODE (1994) entwickelten Versuchsaufbau beruhen.

Thermoresistenztests (TRTs) dienen nach Angaben mehrerer Autoren (PICKETT et al. 1961; ROUSSEL et al. 1963; DIMITROPOULOS 1967; KRAUSE 1966; PACE et al. 1981; UWLAND 1984; KUPFERSCHMIED 1993; DEN DAAS 1997) der Erhärtung anderer Befunde, wie z.B. der Vorwärtsbewegung und der Kopfkappenintegrität. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene TRTs von zwei Besamungsstationen zur Beurteilung von Frischsperma sowie von neun Betrieben zur Beurteilung von aufgetauten Besamungsportionen herangezogen. Der Grund für die geringe Verbreitung von TRTs bei der Untersuchung von Frischsperma liegt vermutlich in den langen Inkubationszeiten. Für die routinemäßige

Frischspermabeurteilung sind nur solche Untersuchungsmethoden geeignet, deren Ergebnisse vorliegen, bevor mit der Konservierung der Ejakulate begonnen wird (BUSCH et al. 1991).

5.5. Spermaverarbeitung in internationalen Besamungsstationen

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stellen die Mehrzahl der befragten Besamungsstationen ihre **Verdünnungsmedien** aus kommerziellen Fertigmischungen her. Dabei finden sich zwischen den einzelnen geographischen Gruppen große Unterschiede. Während in den europäischen Stationen die Verwendung von Fertigprodukten überwiegt, stellen die meisten Stationen der „NA“- und „ANZ“- Gruppe ihre Verdünnungsmedien selbst her (siehe Tabelle 52).

Insgesamt stellen 19 Betriebe Verdünnungsmedien selbst her. Dabei werden am häufigsten sog. Tris-Verdüner verwendet. Daneben kommen auch Verdüner auf Milchbasis sowie Natriumcitrat-Medien zum Einsatz (siehe Tabelle 54).

Der **Glycerol**-Gehalt in selbst hergestellten Verdünnungsmedien ist zum Teil erheblich höher als in der Literatur empfohlen: PACE et al. (1981) verwendeten eine Glycerol-Konzentration von 7% in Natriumcitrat-Verdünnern. KUPFERSCHMIED (1993) und ANZAR et al. (2002) 6,4% bzw. 6% in Tris-Verdünnern.

Die durchschnittliche Glycerol-Konzentration in den 19 Besamungsstationen beträgt in Tris-Medien $7,5 \pm 2,9\%$, in Natriumcitrat-Medien $14,5 \pm 0,7\%$ und in Milch-Medien $7,7 \pm 1,2\%$ ($M \pm SD$, siehe Tabelle 55). Zwei deutsche Stationen verwenden in Tris-Verdünnern 13% bzw. 15% Glycerol, eine kanadische Station sogar 14%. Die Natriumcitrat-Medien neuseeländischer Betriebe enthalten 14% bzw. 15% Glycerol. Mit einem Glycerol-Gehalt von nur 5% setzen dagegen zwei andere neuseeländische Betriebe die niedrigste Konzentration ein.

Da Glycerol auf Spermien toxisch wirken kann (HAMMERSTEDT et al. 1990; MCLAUGHLIN et al. 1992), sollten Besamungsstationen, die es in hohen

Konzentrationen im Verdünnungsmedium einsetzen, eine Verminderung des Glycerolgehaltes in Betracht ziehen.

Die vorliegende Studie vergleicht auch Spermaverdünnung und -portionierung in einzelnen Besamungsstationen und erfasst die angewendeten Temperatur- und Zeitverläufe. Dabei zeigt sich, dass 60% (33/55) der befragten Besamungsstationen bei der Spermaverdünnung ein einstufiges, 43,6% (24/55) ein zweistufiges Verfahren anwenden. In Deutschland und den Betrieben der „NEU“-Gruppe überwiegt das **Einschrittverdünnungssystem**; in den Stationen der „NA“- und der „ANZ“-Gruppe das **Zweischrittverdünnungssystem**. In der „EU“-Gruppe verfährt jeweils die Hälfte der Betriebe nach einem der beiden Verfahren (siehe Tabelle 56).

Der durchschnittliche zeitliche Abstand zwischen Gewinnung eines Ejakulates und Beginn des Tiefgefrierprozesses beträgt beim einstufigen System $235,8 \pm 79,3$ min und beim zweistufigen System $258,8 \pm 86,2$ min. Die ermittelten Zeiträume gleichen damit von KUPFERSCHMIED (1993) mit 260min bis 290min angegebenen Zeitraum.

Insgesamt unterscheiden sich Zeit- und Temperaturabläufe aller Stationen teilweise erheblich voneinander. Die Vielfalt der vorgefundenen Abläufe zeigt, dass Spermien offensichtlich in der Lage sind, eine große Bandbreite von Behandlungsverfahren zur Herstellung von Tiefgefrierportionen zu tolerieren.

Da aber einerseits ein zu schnelles Absenken der Temperatur zu Kälteschockschäden führen kann (BUSCH et al. 1991) und andererseits sehr lange Äquilibrierungs- und Abkühlphasen einen hohen Arbeitszeitaufwand erfordern, sollten einzelne Verfahren im Hinblick auf eine mögliche Optimierung des Temperatur- und Zeitablaufes überdacht werden.

Bei der Herstellung von Besamungsportionen ist die Entscheidung über die **Samenzellen pro Dosis** von zentraler Bedeutung. Um das Vererbungspotential eines genetisch überlegenen Bullen optimal zu nutzen, muss jedes Ejakulat in möglichst viele Besamungsportionen aufgeteilt werden. Allerdings müssen die einzelnen Portionen genügend Samenzellen enthalten, um akzeptable Befruchtungsergebnisse zu erzielen.

Die Tiefgefrierportionen der befragten internationalen Rinderzuchtstationen beinhalten durchschnittlich $18,8 \pm 4,8$ Millionen Samenzellen. Dabei liegen die angegebenen Werte zwischen 5 und 40 Millionen Spermien je Besamungsdosis. Auch die in der Literatur empfohlenen Tiefgefrierportionen weisen zum Teil erhebliche Unterschiede auf und reichen von 5 Millionen (STEWART u. BENNETT 1968) bis 25 Millionen KUPFERSCHMIED (1985, 1993). Viele Autoren befürworteten zur Erzielung maximaler Befruchtungsergebnisse eine Minimaldosis von 10 Millionen motilen Spermien pro aufgetaute Besamungsportion (SULLIVAN u. ELLIOT 1968; PACE et al. 1981; SCHENK et al. 1987; AMANN 1989; GERARD u. HUMBLOT 1991). Diese Spermienzahl sollte ausreichen, um den „threshold value“ bei der überwiegenden Mehrzahl der Zuchtbullen zu überschreiten. Allerdings können einzelne Tiere zum Erreichen ihres maximalen Befruchtungsniveaus auch höhere Dosen benötigen oder bereits bei Verwendung weit kleinerer Portionen eine annähernd gleiche Befruchtungsergebnisse erzielen (DEN DAAS 1997, DEN DAAS et al. 1998).

5.6. Zusammenfassende Betrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass die Organisations- und Arbeitsstrukturen internationaler Rinderzuchtstationen teilweise erhebliche Unterschiede aufweisen. Insbesondere in Bezug auf allgemeine Hygienestandards, angewandte Absamungsprotokolle, Samenbeurteilungstests und –kriterien sowie Spermaverarbeitungsabläufe bestehen grundsätzliche Differenzen.

Die **Hygienestandards** der befragten Besamungsstationen unterscheiden sich in vielen Fällen deutlich voneinander. Zum Beispiel belegen einige Stationen ihre Isolationseinheiten nicht nach einem „All in - All out“ System. Daher können sich Tiere mit unterschiedlichem Teststatus gleichzeitig in den Isolationseinheiten befinden und u.U. direkten oder indirekten Kontakt miteinander haben. Findet eine Keimübertragung von subklinisch infizierten, neu ankommenden Tieren auf bereits eingestellte Tiere statt, so kann die Infektion sogar in die eigentliche

Besamungsstation eingeschleppt werden, wenn die zuerst eingestellten Tiere in die Station überführt werden, bevor die Neuankömmlinge klinische Symptome zeigen bzw. die Ergebnisse der routinemäßig durchgeführten tierseuchenhygienischen Tests vorliegen.

Als weitere Risiken für den Hygienestatus einer Rinderzuchtstation kommen die Benutzung kommerzieller Viehtransporter, Nebentätigkeit stationeigener Tierpflegern in anderen Betrieben (mit niedrigerem Gesundheitsstatus), das Fehlen ausreichender Karenzzeiten für Besucher und Abhalten von Massenveranstaltungen („Tage der offenen Tür“) in Betracht.

Sofern Tierpfleger aufgrund betriebseigener Hygieneregeln keinen Zutritt zu den Laborräumlichkeiten haben, sollten für Stall- und Laborpersonal getrennte Sozialräume vorhanden sein. Immerhin weisen sieben der befragten Besamungsstationen, in denen Tierpfleger die Laborräume nicht betreten dürfen, gleichzeitig gemeinsame Aufenthalts- bzw. Sozialräume für beide Personengruppen auf. Die erste Hygienemaßnahme wird also durch das Fehlen der zweiten in ihrer Wirksamkeit weitgehend aufgehoben.

Bei der Einstellung betriebsfremder und –eigener Tiere in denselben Einheiten darf nicht unterschätzt werden, dass die vorgeschriebenen Routinetests nur wenige, wichtige Erkrankungen erfassen, daneben aber weitere infektiöse oder parasitäre Erreger existieren. Betriebsfremde Tiere, die zuvor in privaten Herden o.ä. gehalten wurden und/oder Zuchtausstellungen besucht haben, bergen ein größeres Risiko solche Erreger zu tragen, als betriebseigene Tiere, die von Geburt an der Kontrolle der Besamungsorganisation unterliegen. In diesem Zusammenhang ist auch an Zoonosen, wie z.B. Leptospirose, Rickettsiose (Q-Fieber), Mykosen (Trichophytie, Mikrosporie) und andere übertragbare Krankheitserreger zu denken.

In der vorliegenden Arbeit konnten teilweise große Unterschiede bezüglich durchschnittlicher **Absamungsfrequenz**, Dauer der **Stimulationszeit** und Anzahl an **Blindsprüngen** festgestellt werden. In Anbetracht der in der Literatur empfohlenen Absamungsregime könnten Besamungsstationen, die bislang nur wenige Samengewinnungen pro Woche und Einzeltier sowie lediglich kurze oder keine

stimulierenden Maßnahmen durchführen, durch Veränderung der Absamungsregime mit besserer Stimulierung auch eine höhere Spermienausbeute pro Ejakulation erzielen.

Andererseits kann die Spermienausbeute durch Erhöhung der Anzahl an Absamungen pro Zeiteinheit und Intensivierung der sexuellen Stimulation nicht beliebig gesteigert werden. Betriebe, die routinemäßig eine hohe Zahl an Absamungen pro Zeiteinheit bzw. viele Blindsprünge pro Samengewinnung durchführen, könnten durch eine Reduzierung u.U. dieselbe Menge an Spermien in kürzerer Zeit und unter geringerem Arbeitsaufwand gewinnen.

In den befragten Rinderzuchtstationen werden zur **Beurteilung von Sperma** unterschiedlich aussagefähige Merkmale durch verschieden sensitive Methoden ermittelt. Mindestanforderungen weichen in einigen Fällen erheblich voneinander ab und einzelne Versuchsabläufe, wie z.B. die Auftauregimen für tiefgefrorene Besamungsportionen, weisen deutliche Unterschiede auf. Insgesamt überwiegen subjektive, visuelle Methoden der Spermienbeurteilung. Objektive Methoden, die sich durch bessere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Befunde auszeichnen sowie zu einheitlicheren Besamungsportionen führen (CHRISTENSEN et al. 2001) und eine bessere Aussage über die Gefrierfähigkeit der Ejakulate (GARNER et al. 1997) bzw. deren Befruchtungspotential zulassen (REVELL u. MRODE 1994; CHRISTENSEN et al. 2000a), werden dagegen nur von wenigen Betrieben eingesetzt.

Die Ursache hierfür könnte neben den relativ hohen Kosten und der schwierigen Bedienung einiger Untersuchungsgeräte, auch in der übereinstimmenden Ansicht vieler Autoren liegen, wonach die Aussagefähigkeit von Labortests über die Fruchtbarkeit eines individuellen Bullen oder Ejakulates ohnehin sehr begrenzt ist (MULLER 2000; AMANN u. HAMMERSTEDT 2002).

Da jedoch Feldversuche häufig aufgrund zu geringer Tierzahlen oder zu hoher Besamungsdosen nur geringe Sensitivität aufweisen, sind Labormethoden zur Bestimmung der Qualität des Spermas nach wie vor von großem Wert und bilden neben der klinischen Untersuchungen der Tiere und der Auswertung von

Befruchtungsergebnissen die Grundlage für Entscheidungen über die Auswahl von Besamungsbullen für die Zucht oder ihren Verbleib in der Zucht. Außerdem dienen Spermauntersuchung und -beurteilung als Qualitätskontrolle für Spermahandhabung, -verarbeitung und -lagerung (DEN DAAS 1992) und sollten allein deswegen routinemäßig durchgeführt werden.

Auch wenn es nach Ansicht von HAMMERSTEDT (1996) nie Labortests geben wird, die vorhersagen, ob ein männliches Tier, für das keine Befruchtungsergebnisse vorliegen, im Vergleich zu anderen Tieren desgleichen Typs, eine erhöhte Fruchtbarkeit besitzt, bleibt es Aufgabe der Wissenschaft neue sensitivere Testmethoden zu suchen und zur Praxisreife zu entwickeln.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit würden einige rinderzüchtende Organisationen von einer besseren Ausnutzung bereits existierender Tests und Untersuchungsmethoden und von der verstärkten Verwendung objektiver, wiederholbarer Methoden profitieren.

Beispielsweise erbringen ORTs aufschlussreichere Ergebnisse als Lebend-Tot-Färbungen mit Eosin (CORREA u. ZAVOS 1994) und morphologische Beurteilungen an ungefärbten, fixierten Präparaten mit Phasen-Kontrast- oder Interferenz-Kontrast-Mikroskopen sind solchen an gefärbten Präparaten überlegen (HARASYMOWYCZ et al. 1976; WOELDERS 1991). Von den durch die befragten Besamungsstationen zur Qualitätskontrolle von Sperma herangezogenen Methoden sind derzeit Fluoreszenzmarker-Untersuchungen mit Hilfe von Durchflusszytometern als die besten anzusehen, da diese einzelne Merkmale individueller Samenzellen einzeln oder kombiniert erfassen, schnelle und reproduzierbare Ergebnisse erbringen und durch Analyse ausreichend vieler Zellen statistisch signifikante Schlussfolgerungen zulassen. Mit der Entwicklung automatisierter, kostengünstiger Geräte ist mit einer größeren Verbreitung dieser Technologie zu rechnen.

Ebenso wie in der Spermauntersuchung und -beurteilung, finden sich auch in der **Spermaverarbeitung** der einzelnen Besamungsstationen erhebliche Unterschiede. Die große Vielfalt der angewendeten Arbeitsabläufe und die weite Spanne der in Besamungsportionen durchschnittlich verwendeten Anzahl Spermien überrascht.

Offensichtlich sind Spermien in der Lage, eine große Bandbreite von Verfahren zu tolerieren. In Anbetracht der extremen Schwankungen sollten die Verfahren einzelner Betriebe allerdings kritisch überdacht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit ist erstmals ein Überblick über die international verbreiteten Techniken und Verfahren auf Besamungsstationen für Rinder geschaffen worden. Die vorliegenden Ergebnisse sollen rinderzüchtenden Organisationen ermöglichen individuelle Standards mit internationalen Maßstäben schnell, aktuell und unkompliziert zu vergleichen und allgemein interessierten Personen eine Quelle zusätzlicher Informationen bieten. Die offensichtliche Vielfalt an Arbeits- und Organisationsstrukturen kann zur Optimierung einzelner Aspekte dienen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Alexander Maute

Vergleichende Untersuchung zu Organisations- und Arbeitsstrukturen von Rinderbesamungsstationen in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Informationen über aktuelle Standards in internationalen Rinderbesamungsstationen zu sammeln, zu analysieren und in Bezug zu relevanten Veröffentlichungen zu setzen. Für die Studie wurden Besamungsstationen für Rinder ausgewählt, die entsprechend den Richtlinien der Europäischen Union zum Handel mit bovinem Sperma zugelassen sind. Dabei wurden nur spermaproduzierende Betriebe berücksichtigt und reine Aufzucht- oder Wartebulleneinrichtungen nicht in die Untersuchung einbezogen.

Die Daten von 60 Rinderzuchtstationen wurden von März bis August 2002 in einer Fragebogenaktion erhoben und die befragten Besamungsstationen in fünf „geographische Gruppen“ unterteilt (n= Anzahl an Stationen pro Gruppe):

„D“ – Gruppe:	deutsche Besamungsstationen (n=19)
„EU“ – Gruppe:	Besamungsstationen in Mitgliedsländern der Europäischen Union mit Ausnahme der deutschen Stationen (n=22)
„NEU“ – Gruppe:	Europäische Länder, die nicht Mitglieder der EU sind (n=6)
„NA“ – Gruppe:	USA und Canada (n=8)
„ANZ“ – Gruppe:	Australien und Neuseeland (n=5)

Zur Beurteilung von Arbeits- und Organisationsstruktur der Zuchtstationen befasst sich die durchgeführte Studie mit folgenden Themenkomplexen:

Als **allgemeine Struktur- und Organisationsmerkmale** werden Gründungsdaten, durchschnittliche Anzahl eingestellter Bullen und Rassen, Haltung betriebseigener

und –fremder Tiere, zahlenmäßiges Bullen-Tierpfleger-Verhältnis, Laborpersonal-Tierpfleger-Kontakt, Tierpflegertätigkeit außerhalb der Station, Organisationsprinzipien der Isolationsstallung und allgemeine Hygienemaßnahmen ermittelt und dargestellt.

Die eigentliche **Bullenhaltung** wird durch die Aspekte Transport, Haltungssystem, Fütterung und Pflegemaßnahmen erfasst.

In Bezug auf die **Samengewinnung** von Zuchtbullen erfasst die vorliegende Arbeit sowohl die räumlichen Gegebenheiten (Sprungplatzlage, -größe, Bodenbelag) und die Absamungsausrüstung (künstliche Scheiden, Elektroejakulatoren, Phantome), als auch den organisatorischen Ablauf (Aufsprungtiere, Absamungsplan, Qualifikation der Samennehmer, Bullenidentifikation, Bullensicherung, Absamungshäufigkeit, Art und Dauer der sexuellen Stimulation, Samengewinnungen außerhalb der Besamungsstation).

Die bezüglich der **Spermauntersuchung, -beurteilung und -verarbeitung** erhobenen Parameter und Tests umfassen: Volumen, Konzentration, Massenbewegung, Motilität, morphologische Untersuchungen, Supravitalfärbungen, Fluoreszenzmarker-Untersuchungen, Membranintegritäts- und Stresstests. Daneben werden Zeit- und Temperaturverlauf des Verdünnungsvorganges, verwendete Verdünner, Spermien je Besamungsportion, Auftauregime und Quarantänedauer der Rinderzuchtstationen vergleichend beurteilt.

Für einen Großteil der erfassten Merkmale werden Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) sowie bei starker Streuung zusätzlich Maximal- und Minimalwerte angegeben. Dabei sind bei allen Einzelmerkmalen bzw. -kriterien zum Teil erhebliche Schwankungen zu beobachten. Die erhobenen Werte werden kritisch interpretiert, in Bezug zu relevanten Veröffentlichungen gesetzt und sofern möglich Verbesserungsschritte vorgeschlagen.

Die Arbeit hat rein beschreibenden Charakter. Angaben über die erreichten Befruchtungswerte der 60 Besamungsbetriebe lagen nicht vor.

Es konnten folgende wesentliche Befunde erhoben werden:

Isolationsställe: 15,3% der Stationen belegen ihre Isolationseinheiten nicht nach einem „All in - All out“ System. Tiere mit unterschiedlichem Teststatus können sich daher gleichzeitig in den Isolationseinheiten befinden und u.U. direkten oder indirekten Kontakt miteinander haben.

Besucherregelungen: Die geforderten Karenzzeiten liegen zwischen 0 und 30 Tagen; einige Stationen gestatten nur sehr wenigen Personen unter strengen Auflagen Zutritt, andere veranstalten „Tage der offenen Tür“ mit Hunderten von Besuchern.

Stationspersonal: In 60% (36/60) der internationalen Besamungsstationen haben Tierpfleger keinen Zutritt zu den Laborräumlichkeiten. 68,3% (41/60) der Betriebe verfügen über getrennte Sozialräume für Tierpfleger und Laborpersonal. Allerdings weisen 7 der 36 Betriebe, in denen Tierpfleger die Laborräume nicht betreten dürfen, gleichzeitig gemeinsame Aufenthalts- bzw. Sozialräume für beide Personengruppen auf. Die erste Hygienemaßnahme wird also durch das Fehlen der zweiten in ihrer Wirksamkeit weitgehend aufgehoben.

Die Temperaturen der **künstlichen Scheiden** zum Absamungszeitpunkt liegen teilweise unter der Körpertemperatur (Mindestwert: 36°C), teilweise deutlich im spermaschädigenden Bereich (Maximalwert: 63°C).

Elektroejakulatoren werden nicht in deutschen Stationen und ebenso wenig in der Mehrzahl der „EU“- (81,8%; 18/22) und der „NEU“-Stationen (83,3%; 5/6) eingesetzt. Dagegen verwenden die meisten Betriebe der „NA“- (75%; 6/8) und der „ANZ“-Gruppe (60%; 3/5) Elektroejakulatoren gelegentlich oder regelmäßig.

Phantome werden in 83,3% (15/18) der deutschen Betriebe, 54,5% (12/22) der „EU“-Betriebe und 33,3% (2/6) der „NEU“-Betriebe verwendet. Stationen der „NA“- und der „ANZ“- Gruppe besitzen keine Phantome. Alle befragten Besamungszentren

setzen andere Bullen als **lebende Sprungpartner** ein. 41,7% (25/60) verwenden zudem Kastraten und 11,7% (7/60) weibliche Rinder. Zur **Bullensicherung** werden unterschiedliche Hilfsmittel verwendet. Während 73,7% (14/19) der deutschen Stationen Führstangen benutzen, sind diese nur in einem Unternehmen (12,5%; 1/8) der „NA“-Gruppe und in keinem Betrieb der „ANZ“- Gruppe zu finden. Unterschiede bestehen auch in Bezug auf die Anzahl verwendeter Nasenringe, die zwischen 0 und 3 pro Zuchtbulle liegt. Die angewendeten **Absamungsregime** zeigen deutliche Differenzen. Die genannten Stimulationszeiten betragen zwischen 30 Sekunden und 3 Stunden; es werden 0 bis 6 Blindsprünge durchgeführt.

Zur **Spermabeurteilung** werden unterschiedliche Kriterien verwendet und durch verschiedene Methoden ermittelt. Beispielsweise wird die Konzentration von Frischsperma teilweise allein durch visuelle Schätzung, teilweise aber auch mit Hilfe von Durchflusszytometern bestimmt. Die geforderten Grenzwerte weisen beträchtliche Schwankungsbreiten auf, z.B. betragen die Mindestanforderungen an die Motilität von Frischsperma 35% bis 88%.

Bei der Herstellung von **Tiefgefrierportionen** beträgt der zeitliche Abstand zwischen dem Gewinnen des Ejakulates und dem Beginn des Einfriervorgangs zwischen 56 min und 480 min. Die Temperaturen bei denen einzelne Verarbeitungsschritte durchgeführt werden, unterscheiden sich um bis zu 34°C. Tiefgefrierportionen beinhalten zwischen 5 und 40 Millionen Spermien je Besamungsdosis ($M \pm SD$: $18,8 \pm 4,8$). Die Mindestanforderungen an die Anzahl motiler Spermien in aufgetauten Besamungsportionen liegen insgesamt zwischen 3,5 und 24 Millionen ($M \pm SD$: $8,2 \pm 3,5$).

Die vorliegende Arbeit gibt die Bandbreite der gegenwärtigen Arbeits- und Organisationsstrukturen in internationalen Rinderzuchtstationen wieder und soll rinderzüchtenden Organisationen ermöglichen individuelle Standards mit internationalen Maßstäben schnell, aktuell und unkompliziert zu vergleichen und allgemein interessierten Personen eine Quelle zusätzlicher Informationen bieten.

7. SUMMARY

Alexander Maute

Evaluation of Bovine Artificial Insemination Centres in Europe, North America, Australia and New Zealand

The goal of this work was to collect and analyse information about current operational standards in bovine Artificial Insemination (A. I.) centres and to compare the obtained data with relevant publications.

The evaluation includes international cattle breeding companies running approved and supervised semen collection centres which fulfil the requirements laid down by the European Community applicable to trade of semen of domestic animals of the bovine species. Facilities maintaining waiting bulls and prepuberal bulls were not included.

Between March and August 2002 a questionnaire was prepared and sent to 238 A. I. centres and eventually 60 participated. Information was classed into five geographical regions or groups, listed below ("n" represents the number of A. I. centres per geographical region):

- "D": German A.I. centres (n=19)
- "EU": A.I. centres situated in member states of the European Community (n=22), with the exception of Germany
- "NEU": European A.I. centres situated outside the European Community (n=6)
- "NA": A.I centres in North America (i.e. USA or Canada) (n=8)
- "ANZ": A.I centres in Australia or New Zealand (n=6)

To evaluate both organisation and operational procedures of international semen collection centres the questionnaire covers the following features:

General features: date of foundation; average number of bulls on site; average number of cattle breeds on site; housing of company owned and privately owned (third party) bulls; animal – stockman – ratio; lab personnel – barn personnel – contact; incidence of barn personnel working on other premises of potentially lower health status; implementation of an “all in – all out” system in the isolation units; general health and safety requirements

Animal husbandry: bull transport, housing, nutrition, cleaning and care

Semen collection features: collection area (size, location, flooring); collection equipment (artificial vaginas, electro-ejaculation, phantoms); collection procedures (teaser animals, collection order, qualification of semen collector, identification of bulls, bull handling, collection frequency, sexual preparation), semen collections on farms or other premises of lower health status and evaluation and processing of such semen

Semen evaluation and processing: Evaluation of volume, concentration, wave motion, motility, sperm morphology, live-dead-tests, fluorescence marker tests, other membrane integrity tests and stress tests. Further features are dilution protocols, extenders used, number of sperm per insemination dose, thawing protocols and quarantine periods.

For the majority of features mean values and standard deviations are presented. Subject to extreme observations maximum and minimum values are reported too. The results demonstrate that there are substantial differences between centres in regard to most of the features evaluated. The analysed data is put into context with international publications. Appropriate steps to improve the standard operation procedures are recommended where possible.

The work is purely descriptive as the actual fertility results of the 60 A.I. stations, which kindly participated, were not revealed.

Some of the most interesting results are summarised below:

Isolation units: In 15.3% of A.I. centres no “all in – all out” system is enforced. Therefore the possibility of direct or indirect contact between animals of different health status, housed in the isolation unit at the same time, exists.

Visitor policy: The required time window between accessing the A.I. centre and a preceding contact to cloven hoofed animals (of potentially lower health status) ranges from 0 to 30 days. In some A.I. stations few visitors are permitted under strict observation; in comparison other companies even organise “open days” inviting several hundreds of visitors with agricultural background.

Centre personnel: In 60% (36/60) of A.I. centres barn personnel are not permitted to enter the laboratory area. 68.3% (41/60) of A.I. stations have separate social rooms for lab and barn personnel. Nevertheless, provide 7 out of the 36 centres in which stockmen are not to enter the lab area, shared social rooms. The absence of the second hygienic precaution therefore reduces the effect of the first one.

The temperature of **artificial vaginas** at collection ranges between 36°C (below body temperature) and 63°C (potentially sperm damaging). None of the participating German A.I. centres uses **electro-ejaculation** to collect semen. The same applies to the majority of “EU”-studs (81.8%; 18/22) and “NEU”-studs (83.3%; 5/6). Most of the “NA”-studs (75%; 6/8) and “ANZ”-studs (60% 3/5) on the contrary rely occasionally on electro-ejaculation.

Phantoms are in use in 83.3% (15/18) of German A.I. centres, 54.4% (12/22) of “EU”-studs and 33.3% (2/6) of “NEU”-studs. None of the A.I. companies of the “NA”- nor the “ANZ”-Group have phantoms. All evaluated A.I. centres keep live **teaser** bulls for collection purposes. In addition 41.7% (25/60) use steers and 11.7% (7/60) bovine females. For **bull handling** poles are used as control devices in 73.7% (14/19) of German A.I. centres, but only in one “NA”- stud (12.5%; 1/6) and none of the “ANZ”-studs. The number of nose rings varies between 0 and 3 per bull.

The protocols for sexual preparation preceding the semen collection show considerable differences. **Teasing time** varies between 30 seconds and 3 hours; the number of **false mounts** ranges between 0 and 6.

Semen is evaluated by different methods and procedures. Sperm concentration, for example, is determined in one A.I. centre by visual estimation only, in another centre by flow cytometric analysis. The applied pass-marks vary considerable, e.g. the requirements for motility range between 35% and 88%.

Likewise different protocols are followed for semen dilution, equilibration and processing of insemination doses (straws). At one A.I. centre lab personnel initiate the freezing process on average 56 minutes after collection, whereas at another stud freezing only takes place about 480 minutes after collection. A great deal of differences was also observed in regard to the temperature protocol. The same production steps differ from one stud to the other by up to 34°C.

The total **number of sperm** per frozen straw varies between 5 and 40 million ($M \pm SD$: $18.8 \pm 4,8$), the post thaw number of motile sperm ranges from 3.5 to 24 million ($M \pm SD$: $8.2 \pm 3,5$).

The evaluation provides a survey of the various procedures and protocols which are currently applied in internationally operating A.I. centres. It presents an up-to-date guideline and should provide managers and centre veterinarians with supportive information when reviewing their operation procedures and organisations. In addition the data presented in this work might be of general interest for people working in the cattle breeding industry or involved in related scientific research projects.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AAMDAL, J., u. K. ANDERSEN (1968):

Fast thawing of bull semen frozen in straws.

Zuchthygiene 3, 22

ADLER, H.C. (1961a):

Gewinnung und Konservierung von Samen für die Besamung der Haustiere.

Zuchthyg., Fortpflanzungsstör. und Bes. der Haustiere 5, 199

ADLER, H.C. (1961b):

Freezing of bovine semen in straws with coldgas generator and storage in liquid air.

Proc. 4th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4, 947

AEHNELT, E., J. HAHN u. M. JAKOVAC (1964):

Klinischer Hodenbefund und morphologisches Spermabild als Fruchtbarkeitsindikatoren bei Besamungsbullen.

Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 1, 470-475

AL-MAKHZOUMI, I., H. AL-HASHIMI, F. ISMAIL, E. MÜLLER u. G. BRANDL (1975):

Untersuchungen über den Einfluß des Samenplasmas auf Ergebnisse der Dichtebestimmung von Rindersperma mit dem Medico-Kolorimeter nach Lange.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 12, 442

ALMQUIST, J.O. (1973):

Effects of sexual preparation on sperm output, semen characteristics and sexual activity of beef bulls with a comparison to dairy bulls.

J. Anim. Sci. 36, 331-336

ALMQUIST, J.O. (1978):

Bull semen collection procedures to maximize output of sperm.

Proc. 7th Tech. Conf. Artifi. Insem. Reprod. 1, 33-36

ALMQUIST, J.O. (1982):

Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance.

J. Dairy Sci. 65, 814-823

ALMQUIST, J.O., u. R.P AMANN (1976):

Reproductive capacity of dairy bulls. XI. Puberal characteristics and postpuberal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently.

J. Dairy Sci. 59, 986-991

ALMQUIST, J.O., u. D.C. CUNNINGHAM (1967):

Reproductive capacity of beef bulls. I. Postpuberal change in semen production at different ejaculation frequencies.

J. Anim. Sci. 26, 174-181

ALMQUIST, J.O., u. E.B. HALE (1956):

An approach to the measurement of sexual behavior and semen production of dairy bulls.

Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. 1, 50-59

ALMQUIST, J.O., u. E.W. WICKERSHAM (1962):

Diluents for bovine semen. XII. fertility and motility of spermatozoa in skinmilk with various levels of Glycerol and methods of glycerolization.

J. Dairy Sci. 45, 782-787

AMANN, R.P. (1981):

A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics.

J. Androl. 2, 37-55

AMANN, R.P. (1989):

Can the fertility potential of a semen sample be predicted accurately?

J. Androl. 10, 89-98

AMANN, R.P., u. J.O. ALMQUIST (1976):

Bull management to maximize sperm output.

Proc. 6th Tech. Conf. Artifi. Insem. Reprod. 1, 1

AMANN, R.P., u. R.H. HAMMERSTEDT (1993):

In vitro evaluation of sperm quality: an opinion.

J. Androl. 14, 397-406

AMANN, R.P., u. R.H. HAMMERSTEDT (2002):

Detection of differences in fertility.

J. Androl. 23, 317 – 325

AMANTEA, G. (1914):

Investigations on the spermatic secretions.

Arch.Ital.Biol. 62, 35-46

ANZAR, M., E.F. GRAHAM u. N. IQBAL (1997):

Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a Sephadex ion-exchange column.

Theriogenology 47, 845-856

ANZAR, M., L. HE, M.M. BUHR, T.G. KROETSCH u. P.P. KARL (2002):

Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility.

Biol. Reprod. 66, 354-360

ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER e.V. (2002):

Rinderproduktion in der Bundesrepublik Deutschland 2001.

Zucht, Leistungsprüfungen, Besamungen in der Bundesrepublik Deutschland., 19

AUSTIN, J.W., E.W. HUPP u. R.L. MURPHREE (1961):

Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation.

J. Dairy Sci. 44, 2292-2297

AVERDUNK, G. (1969):

Ergebnisse und Problematik der Eigenleistungs- und Nachkommenprüfung auf Fleischleistung beim Rind.

Züchtungskde. 41, 152-161

AX, R.E., S.E. BOLLIG u. M.E. BELLIN (1988):

How many sperm are in a straw?

Proc. 12th Tech. Conf. Artifi. Insem. Reprod. 1, 32

BALLACHEY, B.E., D.P. EVENSON u. R.G. SAACKE (1988):

The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.

J. Androl. 9, 109

BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN u. D.P. EVENSON (1987):

Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.

Biol. Reprod. 36, 915-925

BALLACHEY, B.E., H.L. MILLER, L.K. JOST u. D.P. EVENSON (1986):

Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol.

J. Anim. Sci. 63, 995-1004

BARGAI, U., u. R. COHEN (1992):

Tarsal lameness of dairy bulls housed at two artificial insemination centers: 24 cases (1975-1987).

JAVMA, 201, 1068-1069

BERGER, T. (1996):

Fertilization in ungulates.

Anim. Reprod. Sci. 42, 351-360

BERNDTSON, W.E., u. R.H. FOOTE (1969):

The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glyzerol.

Cryobiology, 5, 398-402

BERNDTSON, W.E., u. R.H. FOOTE (1972):

Bull sperm survival following freezing in ampules, pellets and straws.

Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1353

BISHOP, M.W.H. (1964):

Paternal contribution to embryonic death.

J. Reprod. Fertil. 7, 383-396

BLAZQUEZ, N.B., J. FRENCH, S.E. LONG, G.C. PERRY u. K. STEVENS (1988):

Bovine oestrous odors: behavioural and histological investigations.

Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 1, 550-552

BLOCKEY, M.A. DE B. (1978):

The influence of serving capacity of bulls on herd fertility.

J. Anim. Sci. 46, 589

BONADONNA, T. (1949):

Das Phantomproblem und einige Hypothesen über die Sexualreflexe der Haustiere.

Wien. Tierärztl. Wochenschr. 36, 418

BOUSSEAU, S., J.P. BRILLARD, B. MARQUANT-LE GUIENNE, B. GUERIN, A. CAMPUS u. M. LECHAT (1998):

Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.

Theriogenology 50, 699-706

BOYD, L.J., u. N. L. VAN DEMARK (1957):

Spermatogenic capacity of the male bovine. I. A. measurement technique.

J. Dairy Sci. 40, 689-697

BRACKETT, B.G. (1983):

A review of bovine fertilization in vitro.

Theriogenology 19,1:1

BRANTON, C., G. D'ARENSBOURG u. J.E. JOHNSTON (1952):

Semen production, fructose content of semen and fertility of dairy bulls as related to sexual excitement.

J. Dairy Sci. 35, 801

BRANTON, C., C.B. JAMES, T.E. PATRICK u. M.H. NEWSOM (1951):

The relationship between certain semen quality tests and fertility and the interrelationship of these tests.

J. Dairy Sci. 34, 310-316

BRATTON, R.W., u. R.H. FOOTE (1954):

Semen production and fertility of dairy bulls ejaculated either once or twice at intervals of either four or eight days.

J. Dairy Sci. 37, 1439

BRATTON, R.W., R.H. FOOTE u. C.R. HENDERSON (1954):

Semen production and fertility of mature dairy bulls ejaculated either once or twice at eight-day intervals.

J. Dairy Sci. 37, 1444

BRATTON, R.W., R.H. FOOTE, C.R. HENDERSON, S.D. MUSGRAVE, R.S. Jr. DUNBAR, H.O. DUNN u. J.P. BEARDSLEY (1956):

The relative usefulness of combinations of laboratory tests for predicting the fertility of bovine semen.

J. Dairy Sci. 39, 1542-1549

BREDDERMAN, P.J., u. R.H. FOOTE (1969):

Volume of stressed bull spermatozoa and protoplasmic droplets and the relationship of cell size to motility and fertility.

J. Anim. Sci. 28, 496-501

BREUER, D. (1964):

Klauenkrankheiten bei Zuchtstieren.

Tierärztl. Umsch. 12, 589

BRYAN, H.D., u. R. AKRUK (1977):

A naphthol yellow S and erythrosin B staining procedure for the use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa.

Stain Technology 52, 47-51

BÜCHLMANN, E. (1950):

Das sexuelle Verhalten des Rindes.

Wien. Tierärztl. Wochenschr. 37, 153-156, 225-230

BUCKNER, P.J., E.L. WILLETT u. N. BAYLEY (1954):

Laboratory tests, singly and in combination, for evaluating fertility of semen and bulls.

J. Dairy Sci. 37, 1050-1060

BUDWORTH, P.R., R.P. AMANN u. P.L. CHAPMAN (1988):

Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility.

J. Androl. 9, 41-54

BUDWORTH, P.R., R.P. AMANN u. R.H. HAMMERSTEDT (1987):

Use of microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm.

J. Dairy Sci. 70, 1927-1936

BUSCH, W., K. LÖHLE u. W. PETER (1991):

Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart

CARROLL, E.J., L. BALL u. J.A. SCOTT (1963):

Breeding soundness in bulls - a summary of 10,940 examinations.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 142, 1105-1112

CASSOU, R. (1964):

The plastic straw method adapted for freezing semen.

Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4, 540-546

CASSOU, R. (1965):

The method of plastic straws and its adaptation to the generalisation of freezing.

Animal Breeding Abstract 33, 224

CASSOU, R. (1967):

Recent advances in artificial insemination in cattle.

Animal Breeding Abstract 35, 607

CASSOU, R. (1968):

La miniturisation des paillettes.

Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1009

CASSOU, R., u. G. PERRET (1971):

Mechanisation in the practice of artificial insemination.

Animal Breeding Abstract 39, 693

CEMBROWICZ, H.J. (1952):

Fertility levels of bulls kept at an artificial insemination centre.

J. Agric. Sci. 42, 323

CHENOWETH, P.J. (1981):

Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review

Theriogenology 16, 155-177

CHENOWETH, P.J. (1983):

Sexual behavior of the bull: a review

J. Dairy Sci. 66, 173

CHRISTENSEN, P., P.B. BROCKHOFF u. H. LEHN-JENSEN (1999):

The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls.

Reprod. Dom. Anim. 34, 503-507

CHRISTENSEN, P., Z. GUO, K.M. PEDERSEN, I.R. KORSGAARD u. J. JENSEN (2000a):

Use of flow cytometry for routine assessment of semen quality in A.I.stations.

Proc. 12th Mtg. Europ. A.I. Vets

CHRISTENSEN, P., J. JENSEN, JP. STENVANG, K.M. PEDERSEN, Z. GUO, W. GODFREY, I.R. KORSGAARD u. H. LEHN-JENSEN (2000b):

The relationship between assessment semen quality by flow cytometry and bull fertility.

Proc. 4th Ann. Conf. Europ. Soc. Dom. Anim. Reprod., 10

CHRISTENSEN, P., C. HANSEN, T. LIBORIUSSEN u. H. LEHN-JENSEN (2001):

Use of the FACSCount AF flow cytometer for quality control in semen.

Proc. 13th Mtg. Europ. A.I. Vets

CHUPIN, D., u. H. SCHUH (1993):

Survey of present status of artificial insemination in developing countries.

Wld. Amin. Rev. 74/75, 26-35

CHUPIN, D., u. M. THIBIER (1995):

Survey of the present status of artificial insemination in developed countries.

Wld. Amin. Rev. 82, 58-68

CLEGG, E.O., u. B.W. PICKETT (1966):

Effect of storage at -196°C on fertility.

A.I. Digest 14,12

COFFIN, D.L. (1945) :

Manual of veterinary clinical pathology.

Comstock Publishing Company Inc., Ithaca, New York, USA, 224

COLLINS, W.J., R.W. BRATTON u. C.R. HENDERSON (1951):

The relationship of semen production to sexual excitement of dairy bulls.

J. Dairy Sci. 34, 224

CORREA, J.R., u. P.M. ZAVOS (1994):

The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane.

Theriogenology 42, 351-360

CRANZ, W. (1969):

Ergebnisse der Bulleneigenleistungs- und Nachkommenprüfung auf Fleischleistung beim Rind in Baden-Württemberg.

Züchtungskde. 41, 162-164

CROMBACH, J.J.M.L. (1961):

Some aspects of the behaviour of dairy bulls.

Z. Tierzüchtung und Züchtungsbiologie 75, 331-392

CROSS N.L., u. S. MEIZEL (1989):

Methode of evaluating the acrosomal status of mammalian sperm.

Biol. Reprod. 41, 635

CROSS, N.L., P.M. MORALES, J.W. OVERSTREET u. F.W. HANSON (1986):

Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm.

Gam. Res. 15, 213-226

CUMMING, I.R. (1995):

Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificale insemination.

Vet. Rec. 136, 289-291

CUNNINGHAM, D.C., J.O. ALMQUIST, R.E. PEARSON u. R.C. MARTIG (1967):

Reproductive capacity of beef bulls. II. Postpuberal relations among ejaculation frequency, sperm freezability and breeding potential.

J. Anim. Sci. 26, 182

DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS u. M.R. MELAMED (1975):

Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry.

Exp. Cell. Res. 90, 411

DAWSON, J.R. (1938):

The breeding efficiency of proved (aged) sires.

J. Dairy Sci. 21, 725

DE LEEUW, A.M., J.H.G. DEN DAAS u. H. WOELDERS (1991):

The fix vital stain method, simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa.

J. Androl. 12, 112-118

DEIBEL, F.C. Jr., E.F. GRAHAM u. B.K. EVENSON (1978):

Technique and application of electronic counting and sizing of spermatozoa.

Proc. 7th Tech. Conf. Arti. Insem. Reprod. 1, 45-52

DEIBEL, F.C. Jr., J.E. DMITH, B.G. CRABO u. E.F. GRAHAM (1976):

Evaluation of six assays of sperm quality by means of their accuracy, precision and sensitivity in separating known induced levels of damage.

Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4, 888-891

DEN DAAS, J.H.G. (1997):

Prediction of bovine male fertility.

The Netherlands, University of Wageningen, Thesis

DEN DAAS, J.H.G., G. DE JONG, L.M.T.E. LANSBERGEN u. A.M. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW (1998):

The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls.

J. Dairy Sci. 81, 1714-1723

DEN DAAS, N. (1992):

Laboratory assessment of semen characteristics.

Anim. Reprod. Sci. 28, 87-94

DIDION, B.A., J.R. DOBRINSKY, J.R. GILES u. C.N. GRAVES (1989):

Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.

Gam. Res. 22, 52-57

DIMITROPOULOS, E. (1967):

La signification du test de la thermoresistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperm congelé.

Ann. Med. Vet. 111, 215

DREVIUS, L.O., u. H. ERIKSSON (1966):

Osmotic swelling of mammalian spermatozoa.

Exp. Cell. Res. 42, 1966

DUMONT, P. (1999):

Ring samples to monitor evaluation of bull semen quality by different European A.I. centres.

Proc. 11th Mtg. Europ. A.I. Vets

DZIUK, P., J.F. GRAHAM u. W.E. PETERSEN (1954):

The technique of electro-ejaculation and its use in dairy bulls.

J. Dairy Sci. 37, 1035

EIBL, K. (1959):

Lehrbuch der Rinderbesamung

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

ELLIOTT, F.I. (1978) :

Significance of semen quality.

in: G.W. SALISBURY, N.L. DENMARK (Hrsg.): Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. W.H. Freeman & Co, San Francisco., 400, 428-441

ELLIOTT, F.I., J.K. SHERMAN, E.J. ELLIOT u. J.J. SULLIVAN (1973):

A photographic method of measuring percentage of progressive motile sperm cells using darkfield microscopy.

Proc. 8th Int. Symp. Zootechnology., 160-168

ENSMINGER, M.E. (1993):

Dairy cattle science.

Interstate Publishers Inc., Danville, Illinois, 322-324

ERICSSON, S.A., D.L. GARNER, D. REDELMAN u. K. AHMAD (1989):

Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two flow cytometric systems.

Gam. Res. 22, 355-368

ERICSSON, S.A., D.L. GARNER, C.A. THOMAS, T.W. DOWNING u. C.E. MARSHALL (1993):

Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.

Theriogenology 39, 1009-1024

EVENSON, D.P., u. B.E. BALLACHEY (1988):

Flow cytometry evaluation of bull sperm chromatin structure.

Proc. 12th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod., 45

EVENSON, D.P., u. M.R. MELAMED (1983):

Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry.

J. Histochem. Cytochem. 31, 248

EVENSON, D.P., Z. DARZYNKIEWICZ u. M.R. MELAMED (1980):

Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.

Science (Washington DC) 240, 1131

EVENSON, D.P., Z. DARZYNKIEWICZ u. M.R. MELAMED (1982):

Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility.

J. Histochem. Cytochem. 30, 279-280

EVENSON, D.P., P.H. HIGGINS, D. GRUENEBERG u. B.E. BALLACHEY (1985):
Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea.

Cytometry 6, 238-253

EVENSON, D.P., J.E. PARKS, M.T. KAPROTH u. L.K. JOST (1993):
Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry.

J. Dairy Sci. 76, 86-94

EVERETT, R. W., u. B. BEAN (1982):
Environmental influences on semen output.

J. Dairy Sci. 65, 1303-1310

EVERETT, R.W., B. BEAN u. H. FOOTE (1978):
Sources of variation of semen output.

J. Dairy Sci. 61, 90

FARIN, P.W., J.E. PEXTON, P.J. CHENOWETH u. R. MATEOS (1978):
Libido, service capacity and mating performance of bulls breeding synchronized heifers.

70th Annu. Mtg. Am. Soc. Anim. Sci., Abstr. No. 359

FAULL, W.B., J.W. HUGES, M.J. CLARKSON, D.Y. DOWNHAM, F.J. MANSON, J.B. MERRITT, R.D. MURRAY, W.B. RUSSELL, J.E. SUTHERST u. W.R. WARD (1996):
Epidemiology of lameness in dairy cattle: the influence of cubicles and indoor and outdoor walking surfaces.

Vet Rec. 139, 130-136

FEARON, J.M., u. P.T. WEGENER (2000):
Relationship between fertility in cattle and the number of inseminated spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 119, 293-308

FINCHER, M.G., W.J. GIBBONS, K. MAYER u. S.E. PARK (1956):

Diseases of cattle.

American Veterinary Publications, Inc., Evanston, Illinois, 399-416

FISCHERLEITNER, F. (1993):

Künstliche Besamung beim Rind.

R. HAHN, H. U. KUPFERSCHMIED, F. FISCHERLEITNER (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart

FISCHERLEITNER, F., C. STANEK u. I. STUR (1987):

Untersuchung über genetische Aspekte orthopädischer Erkrankungen in der Rinderbesamung.

35. Internationale Fachtagung, Wels; 1987

FOOTE, R.H. (1970):

Influence of extender, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen.

J. Dairy. Sci. 53,1478-1482

FOOTE, R.H. (1972):

How to measure sperm cell concentration by turbidity (optical density).

Proc. 4th Tech. Conf. Nat. Ass. Anim. Breed., 57-61

FOOTE, R.H. (1978):

Extenders and extension of unfrozen semen.

in: SALISBURY G.W., VAN DENMARK N.L. und LODGE J.R. (Hrsg.): Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle, W.H. Freeman & Co, San Francisco, 442-477

FOOTE, R.H., u. M.T. KAPROTH (1997):

Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited.

J. Dairy Sci. 80, 3072-3076

FOOTE, R.H., G.A. PRESICCE u. C.C. BROCKETT (1993):

A new approach to overcoming a yearling holstein bull's complete lack of motivation to mounting.

Appl. Anim. Behav. Sci. 37, 75-80

FOSTER, J., J.O. ALMQUIST u. R.C. MARTIG (1970):

Reproductive capacity of beef bulls. IV. Changes in sexual behavior and semen characteristics among successive ejaculations.

J. Anim. Sci. 33, 245

FOWLER, G.R., u. B.W. KINGREY (1956):

The locomotion system in diseases of cattle.

GOLETA, CALIF(Hrsg.), American Veterinary Publications, Inc., 399-416

FREUND, M., u. B. CAROL (1964):

Factors affecting hemacytometer counts of sperm concentration in human semen.

J. Reprod. Fertil. 8, 149

FÜHRER, F. (2001):

Bull handling for collection; results of a survey conducted by the QUALIVET GROUP.

Proc. 13th Mtg. Europ. A.I. Vets

GARCIA, M.C., S.M. MC DONNELL, R.M. KENNEY u. H.G. OSBORNE (1986):

Bull sexual behavior tests: stimulus cow affects performance.

Appl. Anim. Behav. Sci. 16, 1-10

GARNER, D.L., u. L.A. JOHNSON (1995):

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide.

Biol. Reprod. 53, 276-284

GARNER, D.L., L.A. JOHNSON u. C.H. ALLEN (1988):

Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk.

Theriogenology 30, 369-378

GARNER, D.L., D. PINKEL, L.A. JOHNSON u. M.M. PACE (1986):

Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses.

Biol. Reprod. 34, 127-138

GARNER, D.L., L.A. JOHNSON, S.T. YUE, B.L. ROTH u. R.P. HAUGLAND (1994):

Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.

J. Androl. 15, 620-629

GARNER, D.L., C.A. THOMAS, C.H. ALLAN, P.L. SENGER u. R.G. SASSER (1997):

Effect of cryopreservation on bovine sperm viability as determined by dual DNA staining.

Reprod. Dom. Anim. 32, 279-283

GEARY, T.W., u. J.J. REEVES (1992):

Relative importance of vision and olfaction for detection of estrus by bulls.

J. Anim. Sci. 70, 2726

GEARY, T.W., D.M. DE AVILA, H.H. WESTBERG, P.L. SENGER u. J.J. REEVES (1991):

Bulls show no preference for a heifer in estrus in preference tests.

J. Anim. Sci. 69, 3999

GERARD, O., u. P. HUMBLLOT (1991):

Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on non-return rate estimates of fertility for individual Holstein bulls.

Theriogenology 36, 727-736

GIL J. (1999):

Post-thaw sperm characteristics and fertility in dairy A.I. bulls, influence of extenders with components of animal or vegetal origin.

Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, International Master of Science Programme

GÖTZE, R. (1939):

Spermagewinnung, Spermaprüfung und künstliche Besamung beim Haustier.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr., 194

GÖTZE R. (1949):

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.

Verlag M. u. H. Schaper, Hannover

GÖTZE R. (1954):

Naturwissenschaft und Rinderbesamung.

Tierzüchter 6, 317-322

GRAHAM, J.K. (1994):

In vitro assays of bull fertility.

Proc. 15th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod., 74-81

GRAHAM, J.K., E. KUNZE u. R.H. HAMMERSTEDT (1990):

Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry.

Biol. Reprod. 43, 55-64

GRAVANCE, C.G., R. VISHWANATH, C. PITT, D.L. GARNER, P.J. CASEY (1998):

Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry.

J. Andro. 19, 704-709

HAAS, U. (1988):

Physik für Pharmazeuten und Mediziner.

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 159

HAFEZ, E.S.E. (1960):

Analysis of ejaculatory reflexes and sex-drive in the bull.

Cornell Vet. 50, 384

HAFS, H.D., R.S. HOYT u. R.W. BRATTON (1959):

Libido, sperm characteristics, sperm output and fertility of mature dairy bulls ejaculated daily or weekly for thirty-two weeks.

J. Dairy Sci. 42, 626

HAFS, H.D., R.C. KNISELY u. C. DESJARDINS (1962):

Sperm output of dairy bulls with varying degrees of sexual preparation.

J. Dairy Sci. 45, 788

HAFS, K.D. (1966):

Diskussionsbeitrag zum Vortrag Halle.

J. Anim. Sci., Suppl. 25, 44-47

HALE, E.B. (1966):

Visual stimuli and reproductive behavior in bulls.

J. Anim. Sci., Suppl. 25, 36-44

HALE, E.B., u. J.O. ALMQUIST (1960):

Relation of sexual behavior to germ cell output in farm animals.

J. Dairy Sci. 43, Suppl. 1, 145-169

HALLMANN, L. (1955):

Klinische Chemie und Mikroskopie. Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das medizinisch-chemische Laboratorium.

Verlag Thieme, Stuttgart.

HAMMERSTEDT, R.H. (1996):

Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action.

Anim. Reprod. Sci. 42, 77-87

HAMMERSTEDT, R.H., u. HAY S.R. (1980):

Effect of incubation temperature on motility and cAMP content of bovine sperm.

Arch. Biochem. Biophys. 199, 427-437

HAMMERSTEDT, R.H., J.K. GRAHAM u. J.P. NOLAN (1990):

Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive.

J. Androl. 11, 73-88

HANCOCK, J.L. (1956):

The morphology of boar spermatozoa.

J. R. Microsc. Soc. 76, 84-97

HANCOCK, J.L. (1959):

The morphological characteristics of spermatozoa and fertility.

Int. J. Fertil. 4, 347-359

HARASYMOWYCZ, J., L. BALL u. G.E. SEIDEL Jr. (1976):

Evaluation of bovine spermatozoa morphologic features after staining or fixation.

Am. J. Vet. Res. 37, 1053-1057

HART, G.H., S.W. MEAD u. W.M. REGAN (1946):

Stimulating the sex drive of bovine males in artificial insemination.

Endocrinology 39, 221-223

HELLSTRÖM, P. (1947):

Bulls which appear too eager should be checked.

Anim. Breed. Abstr. 15, 177

HILL, H., F. SCOTT, N. HOMAN u. X. GRASSNER (1956):

Electroejaculation in the bull.

J. Am. Vet. Med. Ass. 128, 375

HINSCH, E., K.-D. HINSCH, J.G. BÖHM, W.-B. SCHILL u. F. MÜLLER-SCHLÖSSER (1997):

Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders.

Reprod. Dom. Anim. 32, 143-149

HOUP, K.A., W. RIVERA u. L. GLICKSTEIN (1989):

The flemen response of bulls and cows.

Theriogenology 32, 343

HURTADO, M. (1998)

Kryokonservierung von Rindersamenzellen mit Biociphos-Plus®: Untersuchungen nach Konfektionierung bei 4°C und Raumtemperatur.

Zürich, Universität Zürich, Veterinärmedizinische Fakultät, Diss.

HURTADO, M., F. JANETT, R. THUN, A. FLÜKIGER u. F.J. SCHAWALDER (1997):

Cryopreservation of bovine spermatozoa with Biociphos-Plus®: investigations after packing at 4°C and room temperature.

Proc. 9th Mtg. Europ. A.I. Vets

HUNTER, W.K. (1968):

Glycerolisation and freezing techniques with bull semen.

Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1053

IAHC (2002):

Int. Anim. Health Code 10th edition, Part 3, Section 3.2., App. 3.2.1

INEICHEN, B. (1948):

Über Untersuchungsmethoden von Stiersperma.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde 15, 57

IWANOW, I.I. (1912):

Die künstliche Befruchtung der Haustiere.

M. u. H. Schaper, Hannover

JAHNEL, J. (1960):

Woran erkranken Besamungsstiere?

Wien. Tierärztl. Mschr. 47, 578

JANSEN, H.B. (1984):

The efficiency of bull semen production on 10 AI Centres in the Netherlands.
in: M. COUROT (Hrsg.): The male in farm animal reproduction,
Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Bosten. S. 264-268

JANSEN, H.B., u. J. UWLAND (1988):

Optimal use in AI of high ranking Holstein bulls.
Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. Arti. Insem. 3, 259

JEROCH, H., W. DROCHNER u. O. SIMON (1999):

Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere.
Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 463-464

JOHNSON, L., W.E. BERNDTSON u. B.W. PICKETT (1976):

An improved method for evaluating acrosomes of bovine spermatozoa.
J. Anim. Sci. 42, 951-954

JONDET, R. (1964):

Congelation rapide du sperme de taureau conditionne en paillettes.
Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4, 463

JONDET, R. (1965):

A simplified method of freezing bull semen conditioned in plastic straws.
Anim. Breed. Abstr. 33, 227

JONES, R.C., u. D.L. STEWARD (1979):

The effect of cooling to 5° and freezing on the ultrastructure of bull spermatozoa.
J. Reprod. Fert. 56, 233-238

JUONALA, T., S. LINTUKANGAS, T. NURTTILA u. M. ANDERSSON (1998):
Relationship between semen quality and fertility in 106 AI-Boars.
Reprod. Dom. Anim. 33, 155-158

JUONALA, T., E. SALONEN, T. NURTTILA u. M. ANDERSSON (1999):
Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability.
Reprod. Dom. Anim. 34, 83-87

KARABINUS, D.S, D.P. EVENSON u. M.T. KAPROTH (1991):
Effects of egg yolk-citrate and milk on extenders on chromatin structure and viability
of cryopreserved bull.
J. Dairy Sci. 74, 3836-3848

KARRAS, W. (1950):
1.Mitt. Eine Methode zur färberischen Darstellung der Kopfkappen und des
Kolloidüberzuges der Spermien.
Monatshefte prakt. Tierheilkunde 2, 162-167

KARRAS, W. (1954):
3. Mitt. über eine Methode zur differenzierten Darstellung der Formelemente des
Spermienschwanzes.
Monatshefte prakt. Tierheilkunde 6, 192-197

KEELER, K.D., N.M. MAC KENZIE u. D.W. DRESSER (1983):
Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342.
J. Reprod. Fert. 68, 205

KIRCHGESSNER, M. (1992):
Tierernährung
DLG-Verlag, Frankfurt (M), 366-370

KNEZEVIC, P. (1962):

Einfluss der Klauenpflege auf die Samenproduktion von Stieren.

Wien. Tierärztl. Mschr. 3, 305

KNUDSEN, D.B., P. CHRISTENSEN, M.T. MADSEN, H. WACHMANN u. H. LEHN-
JENSEN (2001):

Relationship between flow cytometric assessment of boar sperm viability and fertility.

Proc. 6th Int. Conf. Pig Reprod., 132

KÖRDEL, J. (1959):

Untersuchungen über die Morphologie der Bullenspermien bei Anwendung der
Kopfkappenfärbemethode nach Karras.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Diss.

KORDTS, E. (1954):

Untersuchungen über die Spermaqualität von Bullen als Indikator für die Beurteilung
von Fütterungs- und Haltungseinflüssen.

III. Mitt. Kieler Milchw. Forschungsber. 6, 75

KORDTS, E. (1963):

Fütterung, Haltung und Pflege der Besamungsbullen.

in: F. SCHAETZ (Hrsg.): Die künstliche Besamung bei den Haustieren.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S.142-163

KORIATH, G., H. STRASSBURG u. K. SCHMIDT (1955):

Beziehungen zwischen bestimmten Spermaeigenschaften und der Fruchtbarkeit
beim Rind.

Tierzucht 9, 335-339

KRAUSE, D. (1966):

Untersuchung am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde.

Hannover, Tierärztl. Hochschule, Habilitationsschrift

KRAUSE, D. (1990):

Männliche Geschlechtsapparat.

in: G. ROSENBERGER (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, S. 422-470

KRISHAN, A. (1975):

Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodine staining.

J. Cell Biol. 66, 188-193

KUPFERSCHMIED, H. U. (1985):

Anzahl Spermien pro Paillette und Besamungsergebnis beim Rindvieh.

Mitt. Schw. Verbandes für KB u. der Interessengemeinschaft Schw. Besam. 23, 194

KUPFERSCHMIED, H. U. (1993):

Künstliche Besamung beim Rind.

R. HAHN, H. U. KUPFERSCHMIED, F. FISCHERLEITNER (Hrsg.),

Enke Verlag, Stuttgart

LAGERLÖF, N. (1934):

Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener Fertilität.

Acta Path. Microbiol. Scand., Suppl. 19,1-240 (Thesis)

LARSON, L.L. (1970):

Bulls under A.I. study conditions.

Proc. 3rd Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. 1, 65-74

LASLEY, J.F., u. R. BOGART (1943):

Some factors influencing reproductive efficiency of range cattle under artificial and natural breeding conditions.

Missouri Agric. Exper. Station Res.Bull. 376, 1-56

LASLEY, J.F., G.T. EASLEY u. F.F. MC KENZIE (1942):

A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Application to the staining of Ram Spermatozoa.

Anat. Rec. 82, 167

LASZCZKA, A. (1964):

Einfluß von normierter Bewegung von Reproduktionsbullen auf deren Sexualverhalten und Spermaqualität.

Zeszyty Probl. Postepow Nauk. Roln. 196, 129-137

LASZCZKA, A., u. B. ORAMUS-KASPRZYK (1980):

The influence of abrupt changes of feeding rations on the freezability and the electrophoresis of the protein plasma in bull semen.

Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem.

LASZCZKA, A., u. B. ORAMUS-KASPRZYK (1983):

Effect of direct changes of the qualitative composition of feeding rations on bull semen characteristics estimated in routine laboratory tests.

Roczniki Nauk Rolniczych, Seria B 101, 93

LEE, A.J., G.W. SALISBURY, L.J. BOYD u. W. INGALLS (1977):

In vitro ageing of frozen bull semen.

J. Dairy Sci. 60, 89-95

LEIDL, W., H.H. SAMBRAUS u. W. BIEGERT (1968):

Wirkung des Objektwechsels auf die Sexualpotenz von Stieren.

Zuchthygiene 3, 97-106

LEIDL, W., W. SCHEFELS, R. STOLLA u. E. METZGER (1971):

Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.

Dts. Tierärztl. Wochenschr. 78, 129

LIEBENBERG, O. (1953):

Der Einfluß verschiedener Umweltfaktoren auf die Befruchtungsfähigkeit der Vatertiere unter besonderer Berücksichtigung des Spermabildes.

Der Ziegenzüchter 44, 220

LINFORD, E., F.A. GLOVER, C. BISHOP u. D. STEWARD (1976):

The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.

J. Reprod. Fertil. 47, 283-291

LOGUE, D., u. A. GREIG (1987):

Infertility in the bull, ram and boar. Collection and examination of semen.

In Practice 9, 167-170

LORTON, S.P., J.L. WINTER, N.N. PACE u. J.J. SULLIVAN (1984):

Evaluation of two semen collection regimes for mature Holstein bulls.

J. Anim. Sci. 58, 1-5

LÜBKE, P. (1974):

Die Besamungsstation Neunkirchen-Eischeid - Entstehung und Entwicklung.
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

MADER, D.R., u. E.O. PRICE (1984):

The effects of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls.
J. Anim. Sci. 59, 294

MANSON, F.J., u. J.D. LEAVER (1988):

The influence of dietary protein intake and of hoof trimming on lameness in dairy cattle.

Anim. Prod. 47, 191-199

MANSON, F.J., u. J.D. LEAVER (1989):

The effect of concentrate, silage ratio and of hoof-trimming on lameness in dairy cattle.

Anim. Prod. 49, 15-22

MARDEN, W.G.R. (1954):

New advances in the elektro-ejaculation of the bull.

J. Dairy Sci. 37, 556

MARTIG, R.C., u. J.O. ALMQUIST (1969):

Reproductive capacity of beef bulls. III. Postpuberal changes in fertility and sperm morphology at different ejaculation frequencies.

J. Anim. Sci. 28, 375

MARTIG, R.C., J.O. ALMQUIST u. R.P. AMANN (1966):

Bull sperm freezability after varying ejaculation frequencies.

J. Anim. Sci. 25, 927

MARTIN, I., u. C.W. EMMENS (1958):

Factors affecting the fertility and characteristics of deep frozen bull semen.
Endocrinology 17, 449

MATZKE, P., u. G. KOLLER (1971):

Haltungsbedingte Beinschäden beim Rind.
Tierzüchter 23, 505-506

MAZUR, P. (1980):

Fundamental aspects of the freezing of males with emphasis on mammalian ova and embryos.
Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. I, 99

MC LAUGHLIN, E.A., W.C. FORD u. M.G. HULL (1992):

The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation.
J. Reprod. Fertil. 95, 749-754

MEHRENS, H. (1951):

Die Besamungsstation Lindau (Kreis Eckernförde).
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

MEMPEL, S., u. H. RITTER (1954):

Untersuchung über die Fütterungs- und Haltungsverfehlungen als Grundursache von gehäuften Fällen von Unfruchtbarkeit in Rinderbeständen.
Monatshefte Tierheilkunde 6, 211

MERCIER, E., u. G.W. SALISBURY (1946):

The effects of season on the spermatogenetic activity and fertility of dairy bulls.
Cornell Vet. 36, 301-311

MEYER, H., K. BRONSCH u. J. LEIBETSEDER (1989):

Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung.

Verlag M.& H. Schaper, Hannover, 145-146

MILLER, W.J., u. N.L. VAN DENMARK (1953):

Factors affecting survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures.

J. Dairy Sci. 36, 577

MILLER, W.J., u. N.L. VAN DENMARK (1954):

The influence of glycerol level, various temperature aspects and certain other factors on the survival of bull spermatozoa at sub-zero temperatures.

J. Dairy Sci. 37, 45-49

MONESI, V. (1965):

Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse: RNA and protein.

Exp. Cell. Res. 39, 197

MONESI, V. (1971):

Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis.

J. Reprod. Fertil., Suppl. 13, 1-14

MOORE, H.D.M., C.A. SMITH u. T.D. HARTMANN (1987):

Visualization and characterisation of the acrosome reaction of human spermatozoa by immunolocalization with monoclonal antibody.

Gam. Res. 17, 245

MULLER, C.H. (2000):

Rationale interpretation, validation and uses of sperm function tests.

J. Androl. 21, 10-30

MÜLLER, E., u. G. BRANDL (1978):

Untersuchungen über Beurteilung der kolorimetrisch und mit der Zählkammer ermittelten Werte für die Samendichte bei verschiedenen Stieren.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 65, 211

MÜLLER, E., F. RITTMANNBERGER u. J. SZIGALI (1971):

Untersuchungen über Heritabilität, phänotypische und genetische Korrelation von Reproduktionsmerkmalen bei intensiv aufgezogenen Jungbullen.

Wien. Tierärztl. Monatsschr. 58, 167

MÜLLER-SCHLÖSSER, F., E. HINSCH, J. BÖHM, W.-B. SCHILL u. K.-D. HINSCH (1995):

Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma.

Tierärztl. Prax. 23, 363-363

MUNRO, I.B. (1961):

Bovine semen characteristics and fertility.

J. Reprod. Fertil. 2, 513-515

O'DELL, W.T., u. J.O. ALMQUIST (1954):

Techniques for freezing bull spermatozoa in heated milk and preliminary breeding results.

J. Dairy Sci. 37, 652

O'DELL, W.T., u. V. HURST (1956):

The effect of glycerol equilibration time on the freezing of bovine spermatozoa in egg yolk sodium citrate and skin milk semen extenders.

J. Dairy Sci. 39, 1156

PACE, M.M., J.J. SULLIVAN, F.I. ELLIOT, E.F. GRAHAM u. G.H. COULTER (1981):
Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality of
bovine spermatozoa packaged in 0.5 ml French straws.

J. Anim. Sci. 5, 693-701

PATRICK, T.E., C. BRANTON u. M.H. NEWSOM (1949):

The effect of frequency of collection upon semen production and fertility of dairy bulls
used in artificial breeding.

J. Dairy Sci. 32, 723

PAUFLER, S.K., H. BADER, A. BONFERT, R.H. FOOTE, S. SALAMON u. H.W.
VASTERLING (1974):

Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch.

Verlag M. & H. Schaper, Hannover, 80

PFEILSTICKER, A. (1972):

Erfahrungen mit einem mobilen Phantom (Cassou) für die Samengewinnung bei
Bullen.

Zuchthygiene, Fortpflanzung und Besamung der Haustiere 2, 94

PFEILSTICKER, J. (1975):

Erfahrungen mit einem fahrbaren Phantom (Modell Cassou, L'Aigle) für die
Samengewinnung beim Bullen.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 82, 49-96

PHILLIPS, P.H., u. H.A. LARDY (1940):

A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen.

J. Dairy Sci. 23, 399-404

PICKETT, B.W., u. W.E. BERNDTSON (1974):

Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review.

J. Dairy Sci. 57, 1287-1301

PICKETT, B.W., W.A. MAC DONALD, D.G. GOSSLEE u. W.A. COWAN (1961):

Correlation between certain laboratory stress tests and fertility of frozen bovine spermatozoa.

J. Dairy Sci. 44, 1134

POLGE, A.A., U. SMITH u. A.S. PARKES (1949):

Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.

Nature (London) 164, 666

PRESICCE, G.A., C.C. BROCKETT, T. CHENG, R.H. FOOTE, G.F. RIVARD u. W.R. KLEMM (1993):

Behavioral responses of bulls kept under artificial breeding conditions to compounds presented for olfaction, taste or with topical nasal application.

App. Anim. Behav. Sci. 37, 273-284

PRICE E.O. (1987):

Male sexual behavior.

Vet. Clin. North America: Food Animal Practice 3, 405-422

PURSELL, V.G., L.A. JOHNSON u. G.B. RAMPACEK (1972):

Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock.

J. Anim. Sci. 34, 278-283

PÜSCHEL, G. (1974):

Vergleichende Betrachtung über den Einsatz eines mobilen Phantoms (holländisches Modell, Hersteller: J.P. Tasche u. Zoon, Fleringen, Oldenzaalweg 103 / Holland) und von Standbullen bei der Samengewinnung in einer Rinderbesamungsstation.

Zuchthyg. 9, 7-14

RATH, D., K.F. WEITZE, S. ARMBRECHT u. P. BIELFELD (1987):

Einjährige Erfahrungen mit einem Videomikrographiesystem (Cellsoft) zur Spermabeurteilung.

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 94, 501

REVELL, S.G., u. R.A. MRODE (1994):

An osmotic resistance test for bovine semen.

Anim. Reprod. Sci. 36, 77-86

REVELL, S.G., u. P.D.P. WOOD (1978):

A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 54, 123-126

RIEMKE, P., u. W. LEIDL (1985):

Motilitätsbeurteilung der Spermien mit Videomikrographie und Computerauswertung.

Zuchthygiene 20, 106

RIKMENSPOEL, R., u. G. VAN HERPEN (1957):

Photoelectric and cinematographic measurements of the motility of bull sperm cells.

Phys. Med. Biol. Ser I 1, 54-63

RIVARD, G. u. W.R. KLEMM (1990):

Sample contact required for complete bull response to oestrous pheromone in cattle.

in: MC DONALD D.W., MULLER-SCHWARZE D. u. NATYNCZUK S.E. (Hrgs):

Chemical signals in vertebrates. Oxford University Press, Oxford. S. 627-633

ROBBINS, R.K., R.G. SAACKE u. P.T. CHANDLER (1976):

Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws.

J. Anim. Sci., 42, 145-154

ROBBINS, R.K., M.L. O'CONNER, P.T. CHANDLER u. R.G. SAACKE (1973):

Freezing of bovine semen in "French straws".

J. Anim. Sci. 37, 327

ROEMMELE, O. (1927):

Biologische und physiologische Untersuchung am Sperma und am Scheidensekret des Rindes im Hinblick auf die künstliche Besamung.

Zoolog. Jahrb. Abt. f. allg. Zool. u. Phys. 44, 85

ROLLE, M. u. A. MAYR (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. A. MAYR (Hrsg.)

Enke Verlag, Stuttgart, 356

ROLLINSON, D.H.L. (1951):

Studies on the abnormal spermatozoa of bull semen.

British Veterinary Journal 107, 203-214, 258-273, 451-468

ROTHSCHILD (1953):

Mammalian Germ Cells.

Little, Brown & Co., Boston

ROUSSELL, J.D., T.E. PATRICK, H.C. KELLGREN u. J.O. SHELWICK (1963):

Influence of nitrogen and argon gases on post-thawing motility, laboratory stress tests, and fertility of frozen bovine spermatozoa.

J. Dairy Sci. 46, 1278

ROWSON, L.E. u. M.I. MURDOCH (1954):

Electrical ejaculation in the bull.

Vet. Rec. 66, 326

SAACKE, R.G. (1982):

Components of semen quality .

J. Anim. Sci. Suppl. 2, 55, 1-13

SAACKE, R.G., u. C.E. MARSHALL (1968):

Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 16, 511-514

SAACKE, R.G., u. J.M. WHITE (1972):

Semen quality tests and their relationship to fertility.

Proc. 4th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. 1, 22-27

SAACKE, R.G., S. NADIR u. R.L. NEBEL (1994):

Relationships of semen quality to sperm transport, fertilization and embryo quality in ruminants.

Theriogenology 41, 45-50

SAACKE, R.G., C.E. MARSHALL, W.E. VINSON, M.L. O'CONNOR, J.E. CHANDLER, K.J. MULLINS, R.P. AMANN, R.A. WALLACE, W.N. VINCEL u. H.C. KELLGREN (1980):

Semen quality and heterospermic insemination in cattle.

Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 5, 75

SACHS, L. (1984):

Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden

Springer Verlag, Berlin und Heidelberg

SAINSBURY, D. (1986):

Farm Animal Welfare Cattle, Pigs and Poultry.

Collins, 8 Grafton Street, London, 150-152

SALISBURY, G.W., u. N.L. VAN DEMARK (1961):

Physiology of reproductive and artificial insemination of cattle.

W.H.Freeman & Co., San Francisco and London, 361, 601-603

SALISBURY, G.W., G.H. BECK, I. ELLIOTT u. E.L. WILLET (1943):

Rapid methods for estimating the number of spermatozoa in bull semen.

J. Dairy Sci. 26, 69-78

SAMBRAUS, H.H. (1971):

Das Sexualverhalten des Hausrindes speziell des Stieres.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

SAMBRAUS, H.H., u. G.H. WARING (1975):

Der Einfluss des Harns brünstiger Kühe auf die Geschlechtslust von Stieren.

Z. Säugetierkunde 40, 49-54

SASIMOWSKI, E. (1987):

Mangement of breeding males.

in: Developments in animal and veterinary science 19, Anim. Breed. Prod. (An outline)., Elsevier, PWN – Polish Scientific Publishers, Warschau. S. 375-377

SCHAETZ, F. (1963):

Die künstliche Besamung bei den Haustieren

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

SCHÄFER, W. (1961):

Beziehungen zwischen dem Verhalten der Bullen bei der Samenentnahme und der Spermabeschaffenheit.

Fortpflanzung, Zuchthyg. und Haustierbesamung 5, 98-114

SCHENK, J.L., R.P. AMANN u. R.C. ALLEN (1987):

Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm.

J. Dairy Sci. 70, 1458-1464

SCHMIDT, K. (1953):

Der Einfluß der Fütterung mit weißen und roten Möhren auf die Spermaproduktion des Zuchtbullen.

Monatshefte Vet. Med. Leipzig 8, 47

SCHMIDT, K. (1963):

in : F. SCHAETZ (Hrsg.): Die künstliche Besamung bei den Haustieren.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. S. 253-275

SCHWARTZ, D., P.D.M. MAC DONALD u. V. HEUCHEL (1981):

On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception.

Reprod. Nutr. Dev. 21, 979-988

SHANNON, P., u. B. CURSON (1984):

Effect of storage temperature on the viability and fertility of bovine sperm diluted and stored in Caprogen.

NZ J. Agric. Res. 27, 173-177

SHANNON, P., u. R. VISHWANATH (1995):

The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and theoretical model to explain the fertility differences.

Anim. Reprod. Sci. 39, 1-10

SHERMAN, J.K. (1963):

Tiefgefrierung von Sperma. Vortrag am Institut für künstliche Besamung in Schönau.

in: W. BUSCH, K. LÖHLE, W. PETER (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Nutztieren.

Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart. S. 348

SIGNORET, J.P. (1975):

Influence of the sexual receptivity of a teaser ewe on the mating preference in the ram.

Appl. Anim. Ethol. 1, 229

SIMMET, L. (1972):

A fully automatic method of packing bull semen in plastic tubes according to the Landshut method.

Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1357

SKINNER, J.D. (1981):

Nutrition and fertility in pedigree bulls.

in: J.D. SKINNER, D. GILMORE u. B. COOK (Hrsg.): Environmental factors in mammal reproduction Mammal Research Institute. Pretoria University, Pretoria. S.

160-168

SMITH, A.U., u. C. POLGE (1950):

Survival of spermatozoa at low temperature.

Nature 166, 668-669

SMITH, J.E., u. E.F. GRAHAM (1976):

High resolution size distribution of bull spermatozoa.

Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 4, 943-946

SÖDERQUIST, L. L. JANSON, H. LARSSON u. S. EINARSSON (1991):

Sperm morphology and fertility in AI bulls.

J. Vet. Med. A. 38, 534-543

STALHAMMAR, E.M., L. JANSON u. J. PHILIPSSON (1994):

The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls.

Reprod. Nutr. Dev. 34, 37-45

STEWART, D.L., u. G.H. BENNETT (1968):

The minimum number of spermatozoa per frozen semen insemination compatible with normal fertility in cattle.

Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1167

SUAREZ, S.S., D.P. WOLF u. S. Meizel (1986):

Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid.

Gamete Research 14, 107-121

SULLIVAN, J.J., u. F.I. ELLIOT (1968):

Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination.

Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2, 1307-1309

TALBOT, P., u. R.S. CHACON (1980):

A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm.

Gam. Res. 3, 211-216

TALBOT, P., u. R.S. CHACON (1981):

A triple stain for evaluating normal acrosome reactions on human sperm.

J. Exp. Zool. 215, 201-208

THIBAUT, C., M. LAPLAUD u. R. ORTAVANT (1948):

L'Electro-ejaculation chez le taureau. Technique et resultats.

Acad. Sci. 226, 2006

THOMAS, C.A., u. D.L. GARNER (1994):

Post-thaw bovine spermatozoal quality estimated from fresh samples.

J. Androl. 15, 305-340, 489-500

TÖPFER-PETERSEN, E., u. W.B. SCHILL (1983):

Characterization of lectin receptors isolated from the outer acrosomal membrane of boar spermatozoa.

Int. J. Androl. 6, 375

TRAUTWEIN, K. (1954):

Beobachtungen über die Deckgewohnheitender Bullen.

Tierzüchter 20, 510-512

TRAUTWEIN, K. (1959):

Psychosexualität als zeitgemässes Problem der Tierzucht.

Zuchthygiene 3, 193-204

TRAUTWEIN, K., H. BAUER u. F. FLUHR (1958):

Beobachtungen zur Psychologie der Bullen, speziell zum Deckverhalten.

Zuchthygiene 2, 217-234

TROXLER, J. (2001):

Animal welfare in breeding bulls and boars.

13th Mtg. Europ. A.I. Vets

UWLAND, J. (1984):

Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility.

in: M. COUROT (Hrsg.): The male in farm animal reproduction. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston. S. 269-289

VAN DEN BERG, T. (2001):

Critical points in semen identification, notes following a discussion by the CATTLE QUALIVET GROUP.

13th Mtg. Europ. A.I. Vets

VAN DUIJN, C.JR. (1965):

Sperm numbers and fertility: a kinetic approach.

Netherlands J. Agri. Sci. 13, 378-391

VANDEPLASSCHE, M., u. J. SPINCEMAILLE (1967):

Some aspects of normal and abnormal sexual behaviour in farm animals.

Annales d'Endocrinologie 28, 815-820

WAGENER, K. (1956):

Kursus der veterinärmedizinischen Mikrobiologie.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

WALLACH, S.J.R., u. E.O. PRICE (1988):

Bulls fail to show preference for estrous females in serving capacity tests.

J. Anim. Sci. 66, 1174-1178

WALTON, A., J. HAMMOND, J. EDWARDS u. L.E.A. ROWSON (1947):

The artificial insemination in cattle.

W.Heffer & Sons Ltd., Cambridge, 12-16

WATSON, P.F. (1995):

Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thaw function.

Reprod. Fertil. Dev. 7, 871-891

WATSON, P.F., E. KUNZE, P. CRAMER u. R.H. HAMMERSTEDT (1992):

A comparison of critical osmolarity and hydraulic conductivity and ist activation energy in fowl and bull spermatozoa.

J. Androl. 13, 131-138

WEIGT, H. (1975):

Erarbeitung von Richtnormaktivitäten und Modellen einer rationellen Technologie zur Gewinnung, Aufbereitung und Lagerung von gefrierkonserviertem Bullensperma in Pelletform unter Berücksichtigung neuer Verfahren und deren praktischer Anwendung.

Institut für künstliche Besamung in Schönau.

WENKOFF, M.S. (1988):

The evaluation of bulls for breeding soundness.

Canadian Veterinary Medical Assoc.

WENTINK, G.H., J.C. BOSCH, TH. VAN DEN BERG u. J.E.D. VANDEHOEK (2000):

Bull housing by Holland genetics.

Proc.18th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. 1, 23-26

WHEELER , u. G.E. SEIDEL Jr. (1989):

Capacitation of Bovine Spermatozoa by Lysophospholipids and Trypsin.

Gam. Res. 22, 193-204

WHITE, S.L., G.N. ROWLAND u. R.H. WHITLOCK (1984):

Radiographic, macroscopic, and microscopic changes in growth plates of calves raised on hard flooring.

Am. J. Vet. Res. 45, 633-639

WIEDERMANN, J. C. GAILLARD, U. KÜPFER u. H.U. KUPFERSCHMIED (1991):

Erfahrungen mit einem computergestützten Bildanalysestystem bei der Beurteilung von aufgetautem Rindersperma.

Reprod. Dom. Anim. 26, 162

WIERZBOWSKI, S. (1966):

The scheme of sexual behaviour in bulls, rams and stallions.

World Review Anim. Reprod. 1, 66-72

WIGGIN, H.B. (1975):

Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws.

J. Dairy Sci. 58, 416

WILLETT, E.L. (1957):

Effect of transportation on fertility of bulls.

J. Dairy Sci. 40, 1367

WILLETT, E.L., u. G.L. LARSON (1953):

Effect of transportation on fertility of bulls.

J. Dairy Sci. 36, 1186

WILLIAMS, W.W. (1920):

Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls.

Cornell Vet. 10, 87-94

WILLIAMSON, N.B., R.S. MORRIS, D.C. BLOOD, C.M. CANNON u. P.J. WRIGHT (1972):

A study of oestrous behavior and oestrus detection methods in s large commercial dairy herd (oestrus signs and behaviour patterns).

Vet Rec. 91, 50-58

WOELDERS, H. (1991):

Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality.

in: L.A. JOHNSON u. D. RATH (Hrsg.): Reprod. Domest. Anim, Proceedings of the second international Conference on Boar semen Preservation.

Verlag Paul Parey, Berlin, Suppl. 1, 145-164

WOLF, D. (1949):

Besamungsstation Georgsheil in Ostfriesland.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abl.EG	Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft
ANZ	Untersuchungsgruppe mit Stationen der Länder Australien und Neuseeland
AO	Acridin Orange
BBA	Beton, Bitumen, Asphalt
BGBI	Bundesgesetzblatt
BMVEL	Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CC	Cell Counter, Partikelzählgeräte
CFDA	Carboxyfluorescein Diacetat
CH	gesättigte Kohlenwasserstoffverbindungen
cm	Zentimeter
CMFDA	Carboxyl-Dimethyl-Fluorescein-Diacetat
d.h.	das heißt
D	Untersuchungsgruppe mit ausschließlich deutschen Besamungsstationen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E-Ejakulate	mit Hilfe von Elektroejakulatoren gewonnene Ejakulate
ETS	European Treaty Series
EU	Untersuchungsgruppe mit Stationen aus Mitgliedsländern der Europäischen Union mit Ausnahme der deutschen Stationen
FC	Flow Cytometer, Durchflusszytometer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fremdlabor
FS	Frischsperma
g	Gramm
GK	Gummi-, Kunststoffmatten

h	Stunde(n)
H33258	Hoechst 33258
H33342	Hoechst 33342
HK	Haarklippen
i.d.R.	in der Regel
IAHC	International Animal Health Code
KK	Klauenkorrektur
km	Kilometer
kS-Ejakulate	mit Hilfe von künstlichen Scheiden gewonnene Ejakulate
m ²	Quadratmeter
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MP	Mikrophotographie
M	Mittelwert
n	Gesamtzahl an Besamungsstationen je geographischer Gruppe
NA	Untersuchungsgruppe mit Stationen der Länder USA und Canada
NEU	Untersuchungsgruppe mit Stationen aus Europäische Länder, die nicht Mitglieder der EU sind
NR	Nassreinigung
NR-Rate	Non-Return-Rate
o.ä.	oder ähnliche
OIE	Office international des épizooties
ORT	Osmotischer Resistenztest
PG	wasserlösliche Verbindungen auf Propylenglykolbasis
PHK	Präputialhaarkürzung
PI	Propidium Jodid
PM	Photometer
PS	Phosphatidylserin
PSA	Pisum sativum-Agglutinin
R123	Rhodamin 123

SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SD	Standardabweichung
s.o.	siehe oben
sec.	Sekunde(n)
sog.	so genannte
SV	Spermaverdünner
T1	Verdünnungstemperatur (°C)
T1a	Temperatur zum Zeitpunkt des ersten Verdünnungsschrittes (°C)
T1b	Temperatur zum Zeitpunkt des zweiten Verdünnungsschrittes (°C)
T2	Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Besamungsdosen (°C)
T3	Temperatur vor Beginn des Einfriervorganges (°C)
TR	Trockenreinigung
Tris-Verdünner	Verdünner auf Basis von tri-Natriumztrat-Dihydrat, Tris(hydroxymethyl)-amino-methan
TRT	Thermoresistenztest
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
TGS	Tiefgefriersperma
u.a.	unter anderem/n
u.U.	unter Umständen
VS	Visuelle Schätzung
WTO	World Trade Organisation, Welthandelsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZK	Zählkammer
Z1	Zeit zwischen der Gewinnung und dem Verdünnen des Ejakulates (min)
Z1a	Zeit zwischen der Gewinnung und dem ersten Verdünnungsschritt des Ejakulates (min)

Z1b	Zeit zwischen den beiden Verdünnungsschritten (min)
Z2	Zeit zwischen dem zweiten Verdünnungsschritt und dem Abfüllender Besamungsdosen (min)
Z3	Zeit zwischen dem Abfüllen und dem Einfrieren der Besamungsportionen (min)
Z ges.	Gesamtdauer des Verdünnungsverfahrens (min)

10. FRAGEBOGEN

Der für die Datenerhebung verwendete Fragebogen wurde in deutscher, englischer und französischer Sprache verfasst. Die deutsche Version ist in diesem Kapitel wieder gegeben.

Sofern die Internet-Adressen der Rinderzuchtstationen bekannt waren, wurde der Fragebogen als Email-Anhang verschickt. Darüber hinaus, wurde jedem Betrieb ein ausgedrucktes Exemplar sowie eine Diskette, auf welcher der Fragebogen als Word-Dokument abgespeichert war, und ein portofreier Rückumschlag zugesandt.

Um eine zügige Beantwortung zu ermöglichen, waren die meisten Fragen so gestellt, dass sie mit „Ja“ oder „Nein“ beantwortet werden konnten. Die nicht zutreffende Antwort war dabei aus dem Antwortfeld zu streichen bzw. zu löschen. Andere Fragen bedurften einer knappen Antwort, die in das betreffende Antwortfeld geschrieben werden sollte.

1. Allgemeines:

1.1 Allgemeine Merkmale der Besamungsstation:

In Betrieb seit:	
Anzahl an Tierpflegern:	
Anzahl an Laboranten/ Labortechnikern:	
Sonstiges Personal:	
Rinderrassen in der Besamungsstation:	
Alle eingestellten Bullen/Stiere gehören dem Betrieb:	ja/nein
Neben betriebseigenen auch betriebsfremde Bullen in der Station:	ja/nein
Betriebseigene und –fremde Bullen/Stiere in gemeinsamen Einheiten:	ja/nein
Durchschnittliche Anzahl an Bullen in der Besamungsstation:	

Anmerkungen:

1.2 Allgemeine Hygiene Bestimmungen:

Generell keine Besucher erlaubt:	ja/nein
Erlaubte Besucher (z.B. Amtstierärzte, Besitzer privater Bullen...):	
Tierpfleger arbeiten neben der Besamungsstation auch in anderen Einheiten, Gehöften, milchproduzierenden Betrieben etc.	ja/nein
Gemeinsame Aufenthaltsräume für Tierpfleger und Laboranten:	ja/nein
Tierpfleger betreten die Laborräume:	nie/selten/regelmäßig
Vorschriften in Bezug auf die Erlaubnis die Besamungsstation betreten zu dürfen (z.B. kein Kontakt zu Klautieren in den vorausgegangenen 24/48h.....):	
Vorschriften in Bezug auf ein Betreten der Stallungen (z.B. Schutzkleidung, Kleiderwechsel...):	
Vorschriften in Bezug auf die Einführung von externem Gerät/ externer Ausrüstung (z.B. Desinfektion...):	
Vorschriften in Bezug auf die Anlieferung von Futter:	
„All in – all out“ System in den Isolationsställen:	ja/nein
Bullen/Stier Transporte in betriebseigenen oder in betriebsfremden/ angemieteten Transportern:	Eigener Betrieb/Fuhrunternehmen
Absamungen werden auch in anderen Betrieben durchgeführt:	ja/nein
Sperma, das außerhalb der Besamungsstation gewonnen wurde, wird im selben Labor verarbeitet:	ja/nein
Absamungen werden auch in den Isolationsställen durchgeführt:	ja/nein
In den Isolationsställen gewonnenes Sperma wird im selben Labor verarbeitet:	ja/nein

Andere Vorsichtsmaßnahmen/ Anmerkungen:

1.3 Bullen-/Stierstallungen:

Anzahl an Stallungen:	
Anzahl an Boxen pro Stallung:	
Einzel- oder Gruppenhaltung:	Einzelhaltung/Gruppenhaltung
Bodenfläche pro Bulle/Stier (m x m):	
Bullen/Stiere ständig gesichert (Anbindehaltung):	ja/nein
Art der Sicherung (z.B. Nasenring permanent an Laufkette fixiert...):	
Art der Einstreu (z.B. Stroh, Sand, Wasserbett...):	
Ausmistung:	manuell/automatisiert

Anmerkungen:

1.4 Bullen-/Stierfütterung:

Grundfutter (z.B. Stroh, Heu, Silage...):	
Konzentratzusammensetzung:	
Grundfutter pro Tag (kg):	
Konzentrat pro Tag (kg):	
Energiegehalt (Kalorien/kg):	
Proteingehalt (%):	
Mineralienergänzung:	ja/nein
Vitaminergänzung:	ja/nein
Wasser ad lib.:	ja/nein
Sonstiges:	

Anmerkungen:1.5 Allgemeine Bullen-/Stierpflege:

Klauenkontrolle und –korrektur, Bulle/Stier in Zwangsstand fixiert:	ja /nein
Haarklippen:	ja /nein
Trockenreinigung:	ja /nein
Waschungen:	ja /nein
Kürzen der Präputialbehaarung:	ja /nein
Sonstiges:	

Anmerkungen:2. Absamungen:2.1 Beteiligte Personen/ Registrierung von Umgebungsbedingungen:

Anzahl beteiligter Tierpfleger:	
Anzahl beteiligter Absamer:	
Qualifikation der Absamer (z.B. Tierarzt, Tierpfleger...):	

2.2 Absamungsmodus:

Tageszeit an der die Absamungen stattfinden:	
Gesamtzahl an Bullen/Stieren, die an einem normalen Arbeitstag abgesamt werden:	
Anzahl an Absamungen eines einzelnen Bullens pro Woche:	
Anzahl an Absamungen eines einzelnen Bullens pro Absamungstag:	
Bullen/Stiere werden stets in der gleichen Reihenfolge abgesamt:	ja/nein

Anmerkungen:2.3 Absamungsplan:

Plan ist im Absamungsring/-bereich ausgehängt oder anders sichtbar:	ja/nein
Plan ist im Labor ausgehängt oder anders sichtbar:	ja/nein
Der Bullen-/Stierabfolge im Plan wird in aller Regel gefolgt:	ja/nein

Anmerkungen:

2.4 Bullen-/Stieridentifizierung:

Durch Name:	ja/nein
Durch Nummer:	ja/nein
Ohrmarken:	ja/nein
(Kalt-)Brand:	ja/nein
Elektrischer Transponder:	ja/nein
Sonstiges:	

Anmerkungen:

2.5 Bullen-/Stierhandling:

Anzahl an Nasenringen pro Bulle/Stier:	
Anzahl an Tierpflegern, die einen einzelnen Bullen gleichzeitig führen:	
Gebrauch eines Halfters:	ja/nein
Gebrauch eines Nasenstricks:	ja/nein
Gebrauch einer Führstange:	ja/nein
Sonstiges:	

Anmerkungen:

2.6 Absamungsablauf:

Anzahl an „falschen Sprüngen“ pro Bullen/Stier:	
„Teasing“-Dauer (min):	Min: ___/Max: ___/ Durchschnitt: ___
Anzahl an Bullen/Stieren, die zur selben Zeit im Absamungsring sind:	
Andere Libido-steigernde Maßnahmen:	

Anmerkungen:

2.7 Absamungsring/-bereich:

„Outdoor“ Absamungsring:	ja/nein
„Indoor“ Absamungsring:	ja/nein
Fläche des Absamungsringes (m x m):	
Bodenbelag (z.B. Beton, Kunststoffmatten...):	
Zusätzliche Einstreu um ein Ausrutschen zu vermeiden (z.B. Sand, Sägespäne...):	
Entfernung zwischen dem Absamungsring und dem künstlichen Scheiden (AV) Vorbereitungsraum (m):	
Entfernung zwischen dem AV-Raum und dem Labor (m):	
Wie wird das abgesamte Sperma ins Labor verbracht:	

Anmerkungen:

2.8 Verwendung von Aufsprungbullen:

Verwendung von Aufsprungbullen:	ja/nein
Verwendung von anderen Bullen/Stieren als Aufsprungpartner:	ja/nein
Verwendung von Kastraten:	ja/nein
Verwendung von weiblichen Tieren (Färsen o.ä.):	ja/nein
Rasse(n) der Aufsprungbullen:	
Während der Absamung sind die Aufsprungbullen in Zwangsstand:	ja/nein
Herführen der Aufsprungbullen vor den abzusamenden Bullen/Stieren	ja/nein

Anmerkungen:

2.9 Verwendung eines Phantoms:

Phantom Modell/Typ und Hersteller:	
Allgemeine Einstellung der Tierpfleger in Bezug auf die Benützung eines Phantoms:	mangelhaft/befriedigend/gut/s ehr gut
Anmerkungen:	

2.10 Absamungsausrüstung:

Art/Typ der künstlichen Scheide (AV):	
Material des Auffangglases (z.B. Glas, Plastik...):	
Künstliche Scheide gefüllt mit:	Wasser/Luft
Temperatur der künstlichen Scheide zum Absamungszeitpunkt (C°):	
Gebrauch eines Gleitmittels:	ja/nein
Gleitmitteltyp:	
Gebrauch einer isolierenden Schutzhülle um das Auffangglas:	ja/nein
Art/Methode der Reinigung der künstlichen Scheide:	
Einsatz von Elektroejakulation:	nie/gelegentlich/häufig
Weitere Ausrüstung:	

Anmerkungen:3. Labortätigkeit:3.1 Allgemeine Merkmale:

Anzahl an Personen, die an der Sperma Beurteilung und Verarbeitung beteiligt sind:	
------------------------------------------------------------------------------------	--

3.2 Frisch-Sperma-Beurteilung:

Ejakulat Volumen:	ja/nein
Bestimmt über das Gewicht (Gewicht multipliziert mit Faktor: ___ ergibt Volumen):	ja/nein
Bestimmt über visuelles Ablesen eines graduierten Auffangglases:	ja/nein
Mindestanforderungen (ml):	
Spermiendichte/-konzentration (10 ⁶ /ml):	ja/nein
Methode:	
Mindestanforderungen (10 ⁶ /ml):	
Wie oft wird das Messgerät neu kalibriert:	
Massenbewegung:	ja/nein
Mindestanforderungen (Skala 0-5; 0=Min., 5=Max.):	
Progressive Lineare Vorwärtsbeweglichkeit:	ja/nein
Mindestanforderungen (%-satz vorwärtsbeweglicher Spermien):	
Morphologie:	ja/nein
Verwendete Färbung(en):	
Mindestanforderungen (%-satz unveränderter Spermien):	
„Lebend vs. tot“ - Färbung:	ja/nein
Verwendete Färbung(en):	
Mindestanforderungen (%-satz lebender Spermien):	
Viabilität (Lebensfähigkeit):	ja/nein
Verwendete Färbung(en):	
Methode (z.B. Flow Cytometer):	
Mindestanforderungen (%-satz lebensfähiger Spermien):	

Andere Tests/ Anmerkungen:

3.3 Spermaverarbeitung:

Verwendeter Verdünner:	
Verdünner als Fertigprodukt erworben:	ja/nein
Verdünner vor Ort hergestellt:	ja/nein
Detergentien oder andere Zusätze:	
Glyzerol Endkonzentration (%):	
Besamungspailletten – Typ:	
Besamungspailletten – Volumen (ml):	
Modell/Typ der Abfüllmaschine:	
Modell/Typ der Gefriermaschine:	
Absolute Anzahl an Spermien pro Besamungsportion ($\times 10^6$):	
Gefriersperma: %Anteil am gesamten kommerziellen Sperma-Handel:	
Frischsperma: %Anteil am gesamten kommerziellen Sperma-Handel:	

3.4 Gekühltes Frischsperma:

Zeit zw. Gewinnen und Verdünnen des Ejakulates (min):	
Zeit zw. Verdünnen des Ejakulates und Abfüllen der Pailletten (min):	
Temperaturabsenkung vor oder nach dem Abfüllen der Pailletten:	vor/nach
Methode der Temperatur-Absenkung:	
Lagertemperatur (C°):	
Maximale Lagerzeit (h):	

Anmerkungen:

3.5 Gefriersperma: Einschnitt- oder Zweischritt-Verdünnung: (zutreffendes bitte ausfüllen):

<u>Einschnitt-Verdünnung:</u>	ja/nein
Zeit zw. Gewinnen und Verdünnen des Ejakulates (min):	
Zeit zw. Verdünnen des Ejakulates und Abfüllen der Pailletten (min):	
Zeit zwischen Abfüllen und Einfrieren der Pailletten (min):	
Temperaturabsenkung vor oder nach dem Abfüllen der Pailletten:	vor/nach
Methode der Temperaturabsenkung:	
Verdünnungstemperatur (C°):	
Temp. zw. Verdünnen des Ejakulates und Abfüllen der Pailletten (C°):	
Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Pailletten (C°):	
Temperatur zwischen Abfüllen und Einfrieren der Pailletten (C°):	
<u>Zweischritt-Verdünnung:</u>	ja/nein
Zeit zw. Gewinnen und erstem Verdünnen des Ejakulates (min):	
Zeit zwischen dem ersten und dem zweiten Verdünnungsschritt (min):	
Zeit zw. dem 2. Verdünnung. u. dem Abfüllen der Pailletten (min):	
Zeit zwischen dem Abfüllen und dem Einfrieren der Pailletten (min):	
Glyzerol Konzentration nach dem 1. Verdünnungsschritt (%):	
Erster Verdünnungsschritt – Temperatur (C°):	
Temp. zw. dem ersten und dem zweiten Verdünnungsschritt (C°):	
Zweiter Verdünnungsschritt – Temperatur (C°):	
Temp. zw. dem zweiten Verdünnungsschritt und dem Abfüllen (min):	
Temperatur zum Zeitpunkt des Abfüllens der Pailletten (C°):	
Temperatur zwischen Abfüllen und Einfrieren der Pailletten (C°):	
Methode der Temperatur-Absenkung:	

Anmerkungen:

3.6 Beurteilung aufgetauter Besamungsportionen:

Auftauzeit (sec) und –temperatur (C°):	Sec: ___ / C°: ___
Progressive Lineare Vorwärtsbeweglichkeit:	ja/nein
Mindestanforderung (%-satz vorwärtsbeweglicher Spermien):	
Kontrolle der Anzahl an Spermien pro Besamungsportion:	ja/nein
Methode:	
Viabilität (Lebensfähigkeit):	ja/nein
Verwendete Färbung(en):	
Methode (z.B. Flow Cytometer):	
Mindestanforderungen (%-satz lebensfähiger Spermien):	
Andere Tests/ Anmerkungen:	

3.7 Sperma Quarantäne:

Quarantänedauer (Tage):	
-------------------------	--

DANKSAGUNGEN

Mein aufrichtiger Dank gilt Prof. Dr. H. Niemann für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Den Verantwortlichen der befragten Besamungsstationen danke ich herzlich für die Teilnahme an der Untersuchung und hoffe Sie profitieren von der vorliegenden Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Institut sei für die überaus freundliche Aufnahme und die stets gute Zusammenarbeit gedankt.

Insbesondere danke ich Frau Dr. C. Wrenzycki und Frau C. Gebert für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und kritische Stellungnahmen.

Bei der Erstellung der französischen Version des Fragebogens waren Frau C. Gebert und Frau M. Venner von unschätzbbarer Hilfe.

Herrn J.W. Carnwath, Ph.D. und Frau J. Leigh gebührt Dank für ihre Anregungen bei der Erstellung der englisch sprachigen Zusammenfassung.

Herrn Dr. U. Baulain danke ich für seinen Rat in Fragen der Statistik.

Zu schildern wie sehr Carolin mich in den letzten Wochen und Monaten unterstützt und bestärkt hat, würde den Umfang der vorliegenden Arbeit übersteigen.

Besonders danke ich auch meinen Eltern und meiner Schwester für ihre grenzenlose Unterstützung.