

Auswirkungen der Handhabung von Pailletten während der Lagerung auf die Qualität von Stiersamen

F. Janett¹, E. Schilter², F. Weber³, U. Witschi², R. Thun¹

¹Klinik für Fortpflanzungsmedizin, Universität Zürich, ²Swissgenetics, Zollikofen, ³Klinik für Wiederkäuer, Ludwig-Maximilians-Universität, München

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkungen der Handhabung von Samendosen durch die Besamungstechniker auf die Qualität des Tiefgefriersamens zu untersuchen. Dazu wurden insgesamt 10 Ejakulate von 7 Stieren kryokonserviert und die Pailletten während 7 Monaten in den Arbeitsgefässen von je 10 Besamungstechnikern in drei verschiedenen Regionen der Schweiz (A, B und C) sowie im Hauptlager aufbewahrt. Nach der Lagerung erfolgten die Bestimmung der Motilität im aufgetauten Samen mittels Computer-assistierter Spermienanalyse (CASA) und die Beurteilung der Akrosomintaktheit (vitale Spermien mit intaktem Akrosom) mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Zusätzlich wurden für jeden Besamungstechniker die Non-Return-Rate 56 (NRR) berechnet und der Zusammenhang zwischen NRR der einzelnen Besamungstechniker und der Samenqualität überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die regionale Handhabung und das Ejakulat einen signifikanten Einfluss sowohl auf die Motilität wie auch auf die Akrosomintaktheit der aufgetauten Samendosen hatten. Die Motilität war nach Lagerung bei den Besamungstechnikern in der Region B signifikant ($P < 0.05$) tiefer als in der Region C. In der Region B waren der Anteil akrosomintakter Spermien und die NRR signifikant ($P < 0.05$) tiefer als in der Region A. Bei den einzelnen Besamungstechnikern konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Motilität bzw. Akrosomintaktheit der bei ihnen gelagerten Samendosen und der NRR festgestellt werden. Aufgrund unserer Ergebnisse kann gefolgert werden, dass die Qualität des Tiefgefriersamens deutliche Unterschiede zwischen den Besamungstechnikern der 3 Regionen aufwies und einen Einfluss auf die NRR hatte.

Schlüsselwörter: Stier, Samenqualität, Tiefgefriersamen, Lagerung, Non-Return-Rate

Effects of straw handling during storage on semen quality in the bull

The aim of the present study was to investigate the influence of semen handling by different inseminators on quality of frozen-thawed bovine semen. For this study a total of 10 ejaculates were collected from 7 bulls and semen stored frozen for 7 months in vessels of 10 inseminators each, in three different regions of Switzerland (A, B and C). After storage motility and acrosome integrity (live spermatozoa with intact acrosomes) were measured in frozen-thawed semen by computer-assisted sperm analysis (CASA) and flowcytometry, respectively. In addition, the 56 days non-return rate (NRR) was determined for each inseminator and the relation between NRR of single inseminators and semen quality examined. Results demonstrate that motility as well as acrosome integrity of stored frozen semen were significantly influenced by the specific delivery system used in the different regions and by the ejaculate. After storage of straws in region B semen motility was significantly ($P < 0.05$) lower than in region C. In region B the percentage live and acrosome intact spermatozoa as well as the NRR of the inseminators were significantly ($P < 0.05$) lower than in region A. Motility and acrosome integrity of semen stored by single inseminators were significantly correlated with the inseminator's NRR. We conclude that the quality of frozen semen clearly varied between inseminators of the three regions with an impact on NRR.

Keywords: bull, semen quality, frozen semen, storage, non-return rate

Einleitung

In der Schweiz werden zurzeit mehr als 90% der Rinder und Kühe mit tiefgefrorenem Sperma belegt. Entscheidend für den Besamungserfolg ist neben dem optimalen Besamungszeitpunkt und der Geschlechtsundheit der Kuh auch die Qualität des verwendeten Tiefgefriersamens. Diese wird von zahlreichen Faktoren wie der Qualität des Frischsamens, dem verwendeten Verdüner, der Samenkonfektionierung, der Einfrier- und Auftaumethode sowie der Handhabung der Dosen während der Lagerung und Übertragung beeinflusst. Die Lagerung von Tiefgefriersamen im flüssigen Stickstoff bei -196°C gilt als Standard in der Rinderbesamung. Dabei kann die Befruchtungsfähigkeit der tiefgefrorenen Samenzellen während Jahrzehnten erhalten bleiben (Uwland, 1978; Leibo et al., 1994). Eine aktuelle Studie (Haugan et al., 2007) hat jedoch gezeigt, dass die Abkalberate nach der Verwendung von Tiefgefriersamen, der während mehr als 5 Jahren gelagert wurde, signifikant geringer war als nach einer kürzeren Lagerungszeit. Bei der Produktion und Handhabung der Samendosen können verschiedene Ursachen wie, genetische Schäden, Veränderungen der Chromatinstruktur, Entstehung von reaktivem Sauerstoff sowie Verlust von Spermienoberflächenproteinen (Bailey et al., 2000; Lessard et al., 2000; Watson, 2000; Chatterjee und Gagnon, 2001) zu einer Spermienzellschädigung führen und damit die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Eine Schädigung der Spermien entsteht hauptsächlich während des Auftauprozesses und ist vorwiegend auf extrazelluläre Umkristallisationsvorgänge und die damit verbundenen Veränderungen des osmotischen Druckes zurückzuführen (Morris et al., 2007). Auch bei der Entnahme von Samendosen aus dem Container kann es beim Anheben des Kanisters zu Temperaturschwankungen und damit zur Samenzellschädigung kommen (Merkt et al., 1971, Kupferschmid, 1983). Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, die Auswirkungen der Handhabung von Pailletten während der Lagerung auf die Qualität des Tiefgefriersamens genauer abzuklären.

Tiere, Material und Methoden

Tiere, Samengewinnung und -verarbeitung

Für die Untersuchung standen 7 Stiere im Alter von 3 bis 9 Jahren von Swissgenetics zur Verfügung. Die Stiere wurden regelmässig zwei- bis dreimal in der Woche mittels künstlicher Scheide abesamt und insgesamt 10 Ejakulate gewonnen und kryokonserviert. Anschliessend erfolgte die Lagerung der produzierten Samendosen in mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gefüllten Containern auf der Besamungsstation (Hauptlager) sowie im Feld in den Arbeitsgefässen der Besamungstechniker. Sämtliche Ejakulate mussten den Qualitätsanforderungen für

Frischsamen genügen (Motilität $> 70\%$) und speziell für diese Studie eine Gesamtspermienzahl von mindestens 10 Milliarden aufweisen.

Beurteilung der Samenqualität unmittelbar nach der Produktion

Zur Bestimmung der Qualität des Tiefgefriersamens wurde unmittelbar nach der Produktion die Spermienmotilität mittels Computer-assistierter Spermienanalyse (CASA, Hamilton Thorne IVOS, Version 12, Beverly, MA, USA) bestimmt. Für die Messungen fanden die Analyse-Einstellungen für Stiersperma gemäss Vorgabe des Geräteherstellers Anwendung und es wurden standardisierte Messkammern (Standard Count Analysis Chambers SC 20-01-C, Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) verwendet. Der Samen wurde im Wasserbad bei 37°C während 25 Sekunden aufgetaut und der Prozentsatz an progressiv motilen Spermien jeweils nach 10, 30 und 120 Minuten Inkubation bei 37°C bestimmt.

Auslieferung, Handhabung und Rückzug der Samendosen

Die Auslieferung der produzierten Pailletten erfolgte in den Monaten Februar und März an die Besamungstechniker der drei Regionen A, B und C. In jeder Region wurden je 10 Besamungstechniker mit mehr als 2000 Besamungen pro Jahr zufällig ausgewählt und mit je 10 Pailletten von jedem Ejakulat beliefert. Dabei wurden die Dosen jeweils in alle Becher der Arbeitsgefässe verteilt. Je nach Region erfolgte die Auslieferung der Samendosen unterschiedlich. In Region A wurde die Umlagerung der Pailletten ausschliesslich durch den Logistikmitarbeiter vorgenommen. Dazu wurden die Samendosen vom Hauptlager und die Becher der Arbeitsgefässe in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Chromstahlbecken zwischengelagert und die Pailletten anschliessend transferiert. In den Regionen B und C hingegen, wurden die vom Logistikmitarbeiter in einem Becher vorbereiteten Dosen vom Hauptlager in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporbox zwischengelagert. Die Umlagerung der Pailletten in die Arbeitsgefässe erfolgte dann durch die Besamungstechniker selber. Vor dem Auffüllen des Arbeitsgefässes erfolgte eine Messung des Stickstoffspiegels. Der regelmässige Stickstoffnachschub für die Arbeitsgefässe wurde anlässlich der Samenlieferung in 14-tägigen Intervallen jeweils nach (Regionen A und B) oder vor (Region C) dem Bezug der Samendosen durchgeführt. Nach 7-monatiger Lagerung der Samendosen in den Arbeitsgefässen der Besamungstechniker wurden die Pailletten im September eingesammelt. In der Region A erfolgte das Umlagern bei der Rücknahme der Samendosen durch den Logistikmitarbeiter, in den Regionen B und C analog zur Auslieferung durch die Besamungstechniker. Der Stickstoffspiegel im Arbeitsgefäss wurde wiederum gemessen und protokolliert.

Beurteilung der Samenqualität nach Lagerung bei den Besamungstechnikern

Spermienmotilität

Die Messung des Prozentsatzes an progressiv motilen Spermien erfolgte mittels CASA wie weiter oben beschrieben.

Bestimmung der Akrosomintaktheit

Zur Bestimmung des akrosomalen Status wurde eine FITC-PNA / SYTO® 17 / PI-Färbung angewandt (Garner et al., 1999; Krienke, 2003) und die Spermien in einem Flowzytometer (FACScan™, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Der Farbstoff FITC-PNA besteht aus *Arachis hypogaea* Lectin (PNA), das an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist. FITC-PNA bindet selektiv an die äussere Akrosommembran (Silva und Gadella, 2006) und sendet nach Laseranregung grünes Licht aus. Der Farbstoff SYTO® 17 färbt die DNA aller Spermien und emittiert nach Laseranregung Licht im orangen Bereich. Der Farbstoff PI dient der Unterscheidung von toten und lebenden Spermien. Bei vitalen Spermien ist die Plasmamembran nur für SYTO® 17 nicht aber für FITC-PNA und PI permeabel. Spermien mit intakter Plasmamembran und intakter Akrosommembran färben sich somit nur mit SYTO® 17 an und fluoreszieren orange. Kommt es bei vitalen Spermien im Rahmen der Akrosomreaktion zur Vesikulation, bindet sich FITC-PNA an die äussere Akrosommembran. Zur orangen Kernfärbung zeigen diese Spermien auch eine grün fluoreszierende Kopfkappe. Spermien mit geschädigter Plasmamembran, die aber noch Teile der äusseren Akrosommembran besitzen, zeigen durch PI eine rote Kernfärbung und durch FITC-PNA eine grüne Fluoreszenz im Bereich der Kopfkappe. Spermien deren Plasmamembran geschädigt ist und deren Akrosom völlig degeneriert oder verloren ist, färben sich nur mit PI an. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die Pailletten bei 37° C während 25 Sekunden aufgetaut und anschliessend bei 5 % CO₂ und 37°C während 165 Minuten inkubiert. Für die Färbung wurde das Tiefgefriersperma nach Verdünnung mit Tyrode-Medium auf eine Endkonzentration von 5 Millionen Spermien/ml gebracht. Um die Akrosomintegrität zu untersuchen wurden 500 µl dieser Samenprobe mit 2 µl SYTO® 17 (0.5 mM, Katalog-Nr. S-7579, MoBitec GmbH, Göttingen) und 5 µl FITC-PNA (100 µg/ml Aqua dest., Katalog-Nr. L-7381, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) gemischt und 10 Minuten später 3 µl PI (PI 2.99 mM, Katalog-Nr. P-4170, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugegeben. Die Proben wurden im abgedunkelten Raum während insgesamt 15 Minuten bei 37°C in einem Wärmebad (Thermostat, Typ 5320, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschliessend wurden sie im Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von 150 bis 300 Spermien pro Sekunden gemessen. Für die Auswertung wurden nur akrosomintakte Spermien mit intakter Plasma-

und Akrosommembran (SYTO® 17 positiv, PI und FITC-PNA neg.) berücksichtigt.

Beurteilung der Besamungstechniker im Feld

Bei jedem Besamungstechniker wurde an einem beliebigen Tag die Handhabung der Samendosen beurteilt. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei der Arbeitsweise und -geschwindigkeit, ob zum Beispiel zur Entnahme der Pailletten eine Pinzette verwendet wurde und wie hoch die Becher in den Containerhals angehoben wurden. Als Parameter für den Besamungserfolg der Besamungstechniker wurde die Non-Return-Rate 56 (NRR) herangezogen und mit den folgenden Einflussfaktoren korrigiert (Schaeffer, 1993; Van Doormaal 1993, 1998): Non-Return-Code der Erstbesamung, fixer Einfluss des Besamungsmonats, Rind oder Kuh, Samenpreis, Rasse des Stieres, Rasse des angepaarten Tieres, Einfluss des Betriebes, Einfluss des Stieres, Wechselwirkung zwischen der Rasse des Stieres und der Rasse des angepaarten Tieres. Die Auswertung der NRR jedes einzelnen Besamungstechnikers erfolgt bei Swissgenetics monatlich wobei jeweils alle Erstbesamungen der vergangenen 12 Monate berücksichtigt werden. In unsere Studie wurde die NRR vom 1. September bis zum 31. August des Versuchsjahres ausgewertet und dabei die Abweichung der NRR vom Durchschnitt aller Techniker verwendet.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, Dübendorf, Schweiz). Der Einfluss der regionalen Handhabung der Pailletten (Region) und vom Ejakulat auf die Motilität und Akrosomintaktheit wurde mit einer multivariaten Varianzanalyse geprüft. Zur Berechnung von Unterschieden zwischen den einzelnen Regionen wurden die Ergebnisse dem Bonferroni/Dunn post-hoc Test unterzogen. Die Überprüfung des Zusammenhangs der NRR der einzelnen Besamungstechniker und der Samenqualitätsparameter erfolgte mittels linearer Regression. Die Signifikanzschwelle wurde bei $P < 0.05$ festgelegt.

Ergebnisse

Einfluss von regionaler Handhabung und Ejakulat

Die Ergebnisse zur Überprüfung des Einflusses der regionalen Handhabung (Region) der Samendosen und des Ejakulates auf Motilität und Akrosomintaktheit sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Daraus ist klar ersichtlich, dass die Region und das Ejakulat einen signifikanten ($P < 0.05$) Einfluss sowohl auf die Motilität wie auch auf die Akrosomintaktheit der aufgetauten Spermien hatten.

594 Originalarbeiten

Tabelle 1: Einfluss der regionalen Handhabung und des Ejakulates auf die Motilität und Akrosomintaktheit im aufgetauten Samen.

Parameter	Region <i>P</i>	Ejakulat <i>P</i>	Interaktion <i>P</i>
Motilität	< 0.0001*	< 0.0001*	0.1448
Akrosomintaktheit	0.0007*	< 0.0001*	0.0770

*signifikant (*P* < 0.05)

Samenqualität nach Lagerung in den verschiedenen Regionen

Progressive Motilität

Die durchschnittlichen Motilitätswerte im aufgetauten Samen nach einer Inkubationszeit von 10, 30 und 120 Minuten bei 37°C sind in Abbildung 1 dargestellt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten betragen die Mittelwerte im Hauptlager unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) 25.3%, 24.2% bzw. 14.3% und 7 Monate später (Lager-7) 23.1%, 23.0% bzw. 13.8%. Die entsprechenden Ergebnisse für die in den Regionen A, B und C gelagerten Dosen betragen 21.4%, 21.0% bzw. 13.6% sowie 20.5%, 19.9% bzw. 12.4% und 21.7%, 21.6% bzw. 14.2%. Signifikante Unterschiede waren zwischen der Region A und Lager-0 sowie zwischen der Region B und Lager-0, Lager-7, Region A und auch Region C vorhanden.

Akrosomintaktheit

Das Ergebnis der Akrosomintaktheit (vital und akrosomintakte Spermien) der in den einzelnen Regionen und im Hauptlager gelagerten Spermien ist in Abbildung 2 dargestellt. Die durchschnittlichen Werte nach Lagerung der Dosen während 7 Monaten im Hauptlager (Lager-7) und in den Regionen A, B und C betragen 32.8%, 32.0%, 28.1%, bzw. 30.5%. In der Region A konnten signifikant höhere Werte als in Region B beobachtet werden.

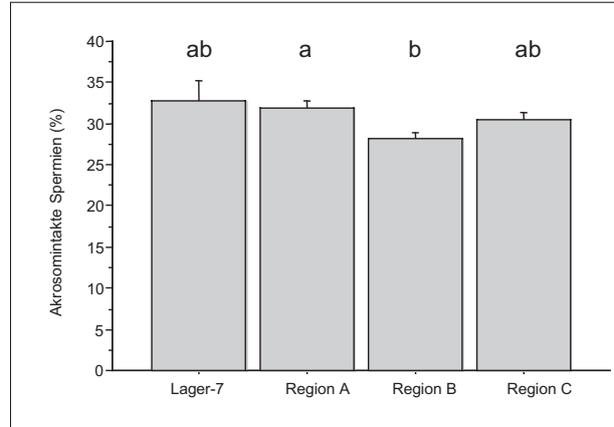


Abbildung 2: Akrosomintakte ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) Spermien nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen. ^{a,b}Säulen mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant (*P* < 0.05) verschieden.

Fruchtbarkeit im Feld

Die in Abbildung 3 dargestellten Boxplots zeigen, dass der Medianwert der prozentualen Abweichung der durchschnittlichen NRR aller Besamungstechniker in der Region A 0.4, B -1.9 und C -0.7 betrug. Signifikante Unterschiede waren zwischen den Regionen A und B vorhanden.

Zur Beschreibung des Zusammenhangs von NRR und der Samenqualitätsparameter wurde eine lineare Regression durchgeführt. Für jeden Besamungstechniker wurde dafür die Abweichung der korrigierten NRR von der durchschnittlichen NRR aller Besamungstechniker mit den Abweichungen der einzelnen Samenqualitätsparameter vom Mittelwert verglichen. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, hatten die progressive Motilität des aufgetauten Samens nach einer Inkubationszeit von 30 und 120 Minuten sowie die Akrosomintaktheit einen günstigen Effekt auf die NRR.

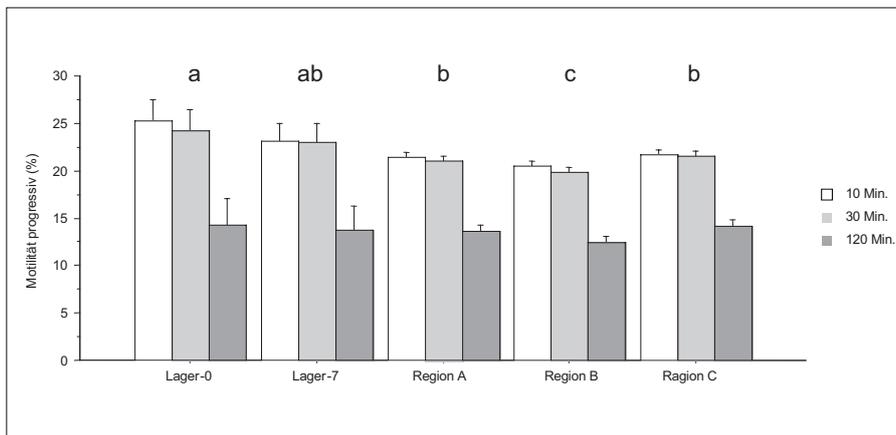


Abbildung 1: Durchschnittliche ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) progressive Motilität von Spermien nach verschiedenen Inkubationszeiten unmittelbar nach der Produktion (Lager-0) sowie nach Lagerung im Hauptlager (Lager-7) und in den einzelnen Regionen während 7 Monaten. ^{a,b,c}Lager und Regionen mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant (*P* < 0.05) verschieden.

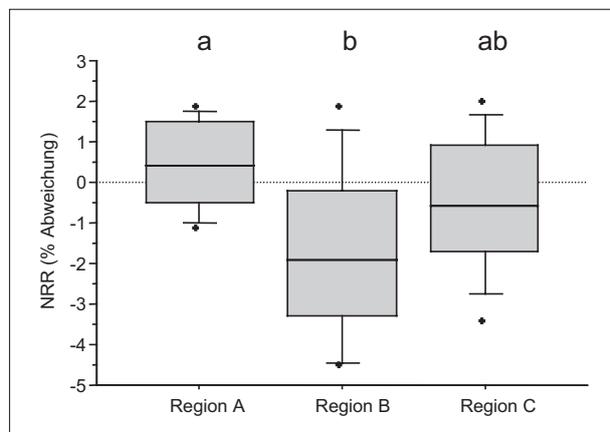


Abbildung 3: Boxplot-Darstellung der prozentualen Abweichung der Non-Return-Raten (NRR) aller Besamungstechniker der Regionen A, B und C vom Mittelwert sämtlicher Besamungstechniker. ^{ab}Boxplots mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant ($P < 0.05$) verschieden.

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen NRR und Samenqualitätsparameter.

Parameter	r-Wert	P-Wert
Motilität progressiv		
- 10 Min.	0.272	0.1459
- 30 Min.	0.378	0.0396*
- 120 Min.	0.506	0.0044*
Akrosomintaktheit	0.482	0.0070*

*signifikant ($P < 0.05$)

Diskussion

Unsere Untersuchungen über den Einfluss einer 7-monatigen Lagerung identischer Samendosen im Arbeitsgefäss von 30 Besamungstechnikern in 3 verschiedenen Regionen A, B und C auf die Samenqualität haben gezeigt, dass die regionale Handhabung der Pailletten die Samenqualität deutlich beeinflusst hat. So wies die Region B im Vergleich zu den Regionen A und C bezüglich Motilität und Akrosomintaktheit signifikant schlechtere Werte auf. Als Referenzwerte dienten die Ergebnisse der im Hauptlager gelagerten Dosen. Die dort ermittelten Motilitätswerte waren nach 7-monatiger Lagerung nur tendenziell geringer als unmittelbar nach der Produktion. Als mögliche Ursachen für die regionalen Unterschiede kommen der nicht einheitliche Umgang mit den Samendosen sowie die unterschiedliche Handhabung der Arbeitsgefässe in Frage. In den Regionen B und C wurden die Dosen mit Hilfe von stickstoffgefüllten Styroporboxen durch den Besamungstechniker in die Arbeitsgefässe umgelagert, während dies in der Region A stets der Logistikmitarbeiter vornahm. Das Auffüllen der Arbeitsgefässe mit flüssigem Stickstoff erfolgte in der Region C vor dem Umlagern der Pailletten, in den Regionen A und B jedoch

erst nach dem Umlagern der Samendosen. Einige Besamungstechniker wie auch Logistikmitarbeiter benutzten dabei keine Pinzette und lagerten die Pailletten mit der Hand um.

Die Paillette mit ihrem grossen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen erleichtert den Wärmeaustausch zwischen dem Samen und der Umgebung. In Pailletten abgefüllter Tiefgefriersamen ist daher sehr empfindlich auf Temperaturschwankungen. Werden die Samendosen auf Temperaturen über minus 130° erwärmt und wieder abgekühlt kommt es zu Umkristallisationsvorgängen und damit verbundenen osmotischen Veränderungen des Milieus die zu Membranschäden führen (Leibo et al., 1994; Morris et al., 2007). Das Ausmass der Schädigungen der Spermien hängt vom Grad, der Dauer und der Häufigkeit der Erwärmung ab. Kupferschmid (1983) konnte zeigen, dass der Anteil der vorwärtsbeweglichen Spermien in 0.25 ml Pailletten nach 1 bis 10-maligem Aussetzen während 10 Sekunden an die Raumtemperatur sich deutlich verringerte. Bereits nach einmaligem Aussetzen war der Anteil um etwa 25% herabgesetzt und bei 10-maligem Herausnehmen während 10 Sekunden blieben weniger als 20% motile Spermien übrig.

Die Befruchtungsfähigkeit von Tiefgefriersamen kann während Jahrzehnten erhalten bleiben. So hat Umland (1978) nach einer Samenlagerung von mehr als 6 Jahren und nach Auswertung von 190'000 Erstbesamungen mit 158 verschiedenen Stieren NRR von 69.1-75.9 % gefunden. Eine aktuelle Studie (Haugan et al., 2007), bei der mehr als eine Million Erstbesamungen berücksichtigt wurden zeigt jedoch, dass nach Lagerung von 0.25 ml Pailletten während mehr als 5½ Jahren auf der Besamungsstation die Abkalberate um etwa 1% geringer war als nach einer kürzeren Lagerungszeit. Diese Ergebnisse beweisen, dass eine messbare Spermenschädigung selbst unter optimalen Lagerungsbedingungen auftreten kann. Beim Vergleich der NRR der Besamungstechniker in unserer Studie wurde aufgrund der schlechteren Samenqualität in der Region B auch die geringste Fruchtbarkeit gefunden. Es muss daher angenommen werden, dass die Handhabung der Dosen doch einen erheblichen Einfluss auf Samenqualität und Fruchtbarkeit haben kann. Eine Optimierung und Standardisierung der Paillettenhandhabung ist für die Qualitätssicherung von grösster Wichtigkeit. Dies bedeutet, dass das Umlagern der Dosen in ein vollständig mit flüssigem Stickstoff gefülltes Arbeitsgefäss vorzugsweise vom Logistikmitarbeiter und mit Hilfe einer Pinzette erfolgen sollte. Der Stickstoffspiegel im Container muss häufig kontrolliert werden, damit eine optimale Lagerung der Pailletten im flüssigen Stickstoff bei -196°C gewährleistet ist. Bei der Entnahme von Pailletten aus dem Container dürfen die Samendosen auf keinem Fall Temperaturen über minus 130°C ausgesetzt werden. Das kann vermieden werden, indem die Pailletten in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Bechern gelagert und die Kanister bei der Entnahme nicht über die Frostlinie im Containerhals angehoben werden.

Schlussfolgerung

Zur Sicherung einer optimalen Fruchtbarkeit beim Einsatz von Tiefgefriersamen müssen Temperaturschwankungen während der Lagerung der Pailletten vermieden und der Samen zum richtigen Zeitpunkt, korrekt aufgetaut und rasch am richtigen Ort in der Kuh deponiert werden.

Effets de la manipulation des paillettes durant le stockage sur la qualité de la semence de taureaux

Le but de la présente étude était d'étudier les effets de la manipulation des paillettes par le technicien-inséminateur sur la qualité de la semence congelée. Pour cela, on a congelé au total 10 éjaculats de 7 taureaux. Les paillettes réalisées ont été conservées durant 7 mois dans les cuves de travail de 10 techniciens-inséminateurs dans 3 régions de Suisse (A, B et C) ainsi que dans le stock principal. Après cette période de stockage, on a déterminé la motilité de la semence décongelée au moyen d'une analyse de sperme assistée par ordinateur (CASA) et jugé de l'intégrité des acrosomes (spermatozoïdes vivants avec un acrosome intact) par cytométrie. En outre, on a calculé pour chaque technicien le taux de non-retour 56 (NRR) et testé la relation entre le NRR de chacun et la qualité de la semence. Les résultats montrent que la manipulation régionale et l'éjaculat ont une influence significative aussi bien sur la motilité que sur l'intégrité des acrosomes de la semence décongelée. La motilité après stockage était significativement plus basse chez les techniciens de la région B que chez ceux de la région C ($P < 0.05$). Dans la région B, la proportion de spermatozoïdes avec un acrosome intact et le NRR étaient significativement plus bas que dans la région A ($P < 0.05$). Chez les techniciens pris individuellement, une relation statistiquement significative pouvait être faite entre la motilité et l'intégrité des acrosomes dans la semence stockée chez eux d'une part et le NRR d'autre part. Sur la base de nos résultats, on peut conclure que la qualité de la semence congelée présente des différences claires entre les divers techniciens-inséminateurs des 3 régions et que cela a une influence sur la taux de non retour.

Dank

An dieser Stellen möchten wir Swissgenetics und den Besamungstechnikern für die Unterstützung bei der Durchführung des Versuches ganz herzlich danken.

Effetto della manipolazione delle pagliette durante la conservazione sulla qualità dello sperma di toro

Scopo dello studio era di esaminare gli effetti sulla qualità dello sperma congelato della manipolazione di dosi di sperma da parte dei tecnici inseminatori. A questo scopo sono stati crioconservati in totale 10 eiaculati di 7 tori e sono state conservate le pagliette durante 7 mesi nei contenitori da lavoro di 10 tecnici inseminatori per ognuna delle tre diverse regioni svizzere (A, B e C) come pure nel magazzino centrale. Dopo questo periodo di conservazione la motilità dello sperma scongelato è stata determinata tramite analisi dello sperma assistita dal computer (CASA) e tramite valutazione dell'integrità acrosomica (spermatozoi vivi con acrosoma intatto) con l'aiuto della citometria a flusso. Contemporaneamente sono state calcolate per ogni tecnico inseminatori le quote Non-Return 56 (NRR) e la correlazione tra la NRR dei singoli tecnici e la qualità dello sperma. I risultati mostrano che l'influenza regionale sulla manipolazione come pure l'eiaculato stesso influiscono in modo significativo sia sulla motilità che sull'integrità acrosomica delle dosi di sperma scongelate. La motilità dal momento della conservazione presso i tecnici della regione B era decisamente inferiore ($P < 0.05$) a quella della regione C. Nella regione B la percentuale di sperma con acrosoma integro e la NRR erano marcatamente inferiori che nella regione A ($P < 0.05$). Si è potuto stabilire che per certi tecnici inseminatori vi è una relazione significativa tra la motilità risp. l'integrità acrosomica delle dosi di sperma conservate presso di loro e la NRR. Sulla base dei nostri risultati si giunge alla conclusione che la qualità dello sperma congelato differisce marcatamente tra i tecnici inseminatori delle 3 differenti regioni con un'influenza netta sulla NRR.

Literatur

Bailey J. L., Bilodeau J-F., Cormier N.: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 2000, 21: 1–7.

Chatterjee S., Gangnon C.: Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol. Reprod.* 2001, 70: 708–717.

Garner D. L., Thomas C. A., Gravance C. G.: The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 1999, 34: 399–404.

Haugan T., Gröhn Y. T., Kommisrud E., Ropstad E., Reksen O.: Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 97: 1–11.

Krienke M.: Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstperma. Dissertation, Universität München, 2003.

Kupferschmied H.: Technische Weisungen zur Samenübertragung beim Rind Schweizerischer Verband für künstliche Besamung, 1983.

Leibo S. P., Semple M. E., Kroetsch T. G.: In vitro fertilization of oocytes by 37-year-old cryopreserved bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1994, 42: 1257–1262.

Lessard C., Parent S., Leclerc P., Bailey J., Sullivan R.: Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J. Androl.* 2000, 21: 700–707.

Merkt H. J., Hannig H., Bader J., Weitze K. F.: Verhalten von Bullenspermien bei der Tiefgefrierkonservierung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 1971, 78: 127–129.

Morris G. J., Faszler K., Green J. E., Draper D., Grout B.W.W., Fonseca F.: Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology* 2007, 68: 804–812.

Schaeffer L. R.: Evaluation of bulls for nonreturn rates within artificial insemination organizations. *J. Dairy Sci.* 1993, 76: 837–842.

Silva P. F. N., Gadella M. M.: Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006, 65: 958–978.

Uwland J.: Effect of storage time on the fertility of bull semen frozen in straws. *Tijdschr. Diergeneesk.* 1978, 103: 763–768.

Van Doormaal B.: Linear model evaluations of non-return rates for dairy and beef bulls in Canadian A.I. *Can. J. Anim. Sci.* 1993, 73: 795–804.

Van Doormaal B. Review of the Canadian non-return rate system. *Proc. 17th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction* 1998, 14–17.

Watson P. F.: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61: 481–492.

Korrespondenz

Fredi Janett
Klinik für Fortpflanzungsmedizin
Winterthurerstrasse 260
CH-8057 Zürich
E-Mail: fjanett@vetclinics.uzh.ch
Tel: +41 44 635 82 18
Fax: +41 44 635 89 42

Manuskripteingang: 15. Mai 2008
Angenommen: 26. Juni 2008