

# Neue Wege zur Sicherung der Spermaqualität in der Schweinebesamung

M. Schulze<sup>1</sup>, J. Schäfer<sup>1,2</sup> und D. Waberski<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. Bernau

<sup>2</sup>Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken/Klinik für kleine Klautiere, Stiftung TH Hannover

## 1. Einleitung

Die hohen Ansprüche an die Spermaqualität haben aktuell zu einer Umbruchphase geführt, welche unter anderem durch den Einsatz neuer Technologien und Verfahren gekennzeichnet ist. Neben dem Einsatz neuer Besamungstechniken stehen heute umfangreiche Möglichkeiten zur Zyklus-synchronisation mit terminorientierter Besamung zur Verfügung. Weitere aktuell diskutierte Themen betreffen die Reduktion der Spermienzahl in der Tube, Methoden zur Vermeidung der Übertragung von Pathogenen mit dem Sperma und die Verminderung des Antibiotikaeinsatzes in Verdünnernedien.

In all diesen Bereichen ist es unabdingbar, die spezifischen physiologischen Eigenschaften von Eberspermien zu berücksichtigen. Viele derzeit vorliegende Empfehlungen zur Eberspermaproduktion gründen auf groben Untersuchungsmethoden der 70er Jahre. Mit modernen Verfahren wie der computer-assistierte Spermienanalyse (CASA) und der Durchflusszytometrie lassen sich heute differenzierte Studien zur Funktion und Integrität konservierten Spermien durchführen. Auf der Grundlage dieser neuen Methoden wird die Qualitätssicherung einer zukunftsorientierten Eberspermaproduktion in Besamungsstationen geschaffen.

In Deutschland führten der steigende ökonomische Druck und der allgemeine Strukturwandel bereits 1996 zur Gründung des Fördervereins Biotechnologieforschung, jetzt: Bioökonomieforschung, e.V. (FBF). In Kooperation mit dem Zentralverband der deutschen Schweineproduktion (ZDS) wurde in anerkannten Referenzlaboren der Tierärztlichen Hochschule Hannover und des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. im Jahr 2009 ein Qualitätssicherungsprogramm für

die Mitgliedsorganisationen des FBF aufgebaut. Es ist heute die Grundlage für die Qualitätssicherung in 30 europäischen Stationen, die insgesamt zehn verschiedenen Besamungsorganisationen in Deutschland, Österreich und der Schweiz angehören. Nachfolgend wird eine Auswahl aktueller Qualitätssicherungsprojekte und deren Relevanz für die Besamungspraxis vorgestellt.

## 2. Terminierung der Jungeberselektion anhand spermatologischer Kriterien

Beim Einstellen von Jungebern in Besamungsstationen muss sowohl neuen Kundenwünschen als auch dem züchterischen Fortschritt Rechnung getragen werden. Dies begründet den hohen Aufwand für die Selektion dieser Eber. Als Resultat wird so die Wettbewerbsfähigkeit der Sauenhalter durch höhere tägliche Zunahmen der Ferkel, geringeren Futterverbrauch, bessere Handelsklassen, höhere Aufzuchtleistungen und weniger Ferkelverluste gesichert. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass für die ökonomische Nutzung von Besamungssebern die Fähigkeit, qualitativ hochwertiges Sperma in ausreichender Menge zu produzieren, von entscheidender Bedeutung ist. Daraus ergibt sich die unbedingte Notwendigkeit einer umfassenden spermatologischen Untersuchung neu einzustellender Besamungsseber.

Neben einer betriebsinternen Beurteilung der Spermaqualität ist auch eine Untersuchung in Referenzlaboren möglich. Die Untersuchungen werden nach den Gewächtschaftsbestimmungen des ZDS durchgeführt und bewertet. Grundlage sind die „Anforderungen an Besamungsseber hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz für die KB“, wo bestimmte Mindestanforderungen für folgende Sper-

maqualitätsparameter festgeschrieben sind: Ejakulatvolumen (100 ml), Spermienkonzentration ( $\leq 9$  Monate:  $0,15 \times 10^6$  Spermien/ $\mu$ l;  $> 9$  Monate:  $0,2 \times 10^6$  Spermien/ $\mu$ l), Spermiengesamtzahl ( $\leq 9$  Monate:  $15 \times 10^6$  Spermien je Ejakulat;  $> 9$  Monate:  $20 \times 10^6$  Spermien je Ejakulat), Motilität (nativ: 70%; konserviert nach 72 h Lagerung: 65%) und Morphologie (75% morphologisch intakte Spermien).

Das Selektionsalter von Jungebern und potentielle Rasseinflüsse werden hier in keiner Weise berücksichtigt, wodurch es in der Praxis häufig zu einer verfrühten Selektion kommt. Diese Problematik wurde auf Grundlage eines umfangreichen Datensatzes von über 4.500 Spermaproben von 3.633 Jungebern aufgearbeitet. Neben dem Eberalter wurden auch die Rasse sowie saisonale Unterschiede mittels einer multifaktoriellen Varianzanalyse als potentielle Einflussfaktoren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem das Alter eines Jungebers sowie dessen Rasse (Pietrain, Deutsche Landrasse, Large White, Duroc und Yorkshire) Einfluss auf die Spermaqualität haben, wohingegen saisonale Einflüsse nur marginal wirksam sind. Defizite in der Spermaqualität führten bei etwa 50 % der untersuchten Proben zu einem auffälligen Befund nach ZDS-Gewächtschaftsbestimmungen. Dabei lagen die Mängel meist in der Spermienmorphologie oder Motilität der verdünnten Proben. Insbesondere Eber, die zum Untersuchungszeitpunkt jünger als acht Monate waren, erfüllten häufig die Kriterien nicht. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Beurteilung der Spermaqualität in diesem Alter kaum aussagekräftig ist und somit zu einer falschen Selektion mit entsprechenden ökonomischen Verlusten führen kann. Resultierend hieraus wird ein

Mindestalter von acht Monaten für die spermatologische Erstuntersuchung von Junggebern empfohlen.

### 3. Hygienemonitoring in Besamungsstationen mit besonderer Berücksichtigung der Antibiotikaresistenzproblematik

In der Europäischen Union ist der Zusatz von Antibiotika zu Konservierungsmedien für Besamungsportionen gesetzlich vorgeschrieben (EU-Richtlinie 90/429/EWG Anhang C). Dies ist darin begründet, dass es praktisch unmöglich ist, völlig keimfreie Ejakulate zu gewinnen und dass flüssigkonservierte Besamungsportionen oft bei verhältnismäßig hohen Temperaturen gelagert werden, welche ein Keimwachstum nicht verhindern können. Durch den permanenten Einsatz teilweise auch laut WHO-Liste (2011) als „priorisiert kritisch“ geltender Antibiotika kommt es zu einem starken Selektionsdruck und damit auch zur Förderung der Resistenzbildung. Daraus resultierend zeigt sich eine weltweite Zunahme multiresistenter Keime in flüssigkonserviertem Ebersperma. Diese sind als Erreger auch für den Menschen von Bedeutung.

Eine mögliche Alternative zum Einsatz konventioneller Antibiotika kann in der Verwendung antimikrobieller Peptide (AMP) liegen. Gerade in den letzten Jahren zeigen sich vermehrt Bestrebungen zur Entwicklung eines geeigneten Zusatzes für flüssigkonserviertes Ebersperma. Der praktische Einsatz von AMPs ist derzeit jedoch aufgrund der Spermientoxizität sowie hoher Kosten einiger dieser Zusätze noch nicht realisierbar. Eine gleichzeitige Anwendung der Stoffe mit konventionellen Antibiotika und sich daraus möglicherweise ergebende synergistische Effekte werden weiter untersucht.

Generell ist ein striktes, lückenloses Hygienemanagement als wichtigste Maßnahme zur Kontrolle des Keimwachstums und zur Vermeidung von Resistenzbildungen anzusehen. Dabei ist die gesamte Prozesskette von der Spermagewinnung bis zur Abfüllung der verdünnten Tuben einzubeziehen. Um einem Keimeintrag effektiv entgegenwirken zu können, ist die Kenntnis kritischer Kontrollpunkte

(*Hygienic Critical Control Points* = HCCPs) notwendig. Resistente Bakterien in Produktionslaboren stammen primär aus hygienischen Schwachstellen ebendieser und nicht von der ebereigenen Keimflora. Die Analyse dieser Schwachstellen und die damit verbundene Implementierung der HCCPs in das Hygienemanagement einer Station können zu einer Reduktion der bakteriellen Kontamination und der Entwicklung von Resistenzen beitragen. Wichtiger Bestandteil der Qualitätssicherung sind zudem ein regelmäßiges Hygienemonitoring und eine Schulung des Stationspersonals.

### 4. Einfluss des Temperaturregimes während der Verdünnung auf die Eberspermaqualität

Bei der Konservierung von Ebersperma haben sich in Besamungsstationen zwei Hauptverfahren etabliert: die einphasige und die zweiphasige Verdünnung. Bei der einphasigen Verdünnung wird das Ejakulat in einem Arbeitsschritt isotherm bei 32°C ausverdünnt. Die zweiphasige Verdünnung setzt sich aus einer isothermen Vorverdünnung bei 32°C zur Minimierung von Standzeiten nativer Ejakulate und einer anschließenden Endverdünnung zusammen. Diese Endverdünnung kann sowohl isotherm (32°C) als auch hypotherm (21°C) erfolgen.

Derzeit wird weltweit am häufigsten eine zweiphasig hypotherme Verdünnung angewendet. Fraglich ist, inwiefern der Temperatursprung bei einer zweiphasig hypothermen Verdünnung die Spermaqualität beeinflusst. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss verschiedener Verdünnungsregimes (Abkühlkurven) auf die Spermaqualität unter standardisierten Laborbedingungen mit einem erweiterten Methodenspektrum untersucht. Gleichsam wurden während durchgeführter Stationsaudits die Konservierungsverfahren von 23 Besamungsstationen geprüft. Ziel war es, eindeutige Empfehlungen für die zukünftige Stationsarbeit geben zu können.

Es konnte gezeigt werden, dass die zweiphasig hypotherme Verdünnung im Vergleich zum einphasig isothermen Verfahren eine negative Beeinträchtigung der Mitochondrienaktivi-

tät, Plasmamembranintegrität sowie Motilität der Spermien bewirkt. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmender Lagerungsdauer. Eine einphasig isotherme Verdünnung erhöht zwar aufgrund der größeren zu erwärmenden Verdünnermenge die Produktionskosten, liefert aber eine deutlich bessere Produktqualität (Schulz). Daher wird empfohlen, die einphasig isotherme einer zweiphasig hypothermen Verdünnung vorzuziehen.

### 5. Beeinträchtigung der Eberspermaqualität durch die Rotation von Besamungstuben

Um die Qualität einer Besamungsportion über die derzeit praxisübliche Lagerungsdauer von drei Tagen zu gewährleisten, werden bestimmte Empfehlungen zum Umgang mit den Tuben gegeben. Dazu zählen eine gleichbleibende Temperatur von 15-17°C, Lichtausschluss sowie ein regelmäßiges Wenden. Während der Lagerung kommt es in den Portionen zu einer Sedimentation der Spermien. Diese wird als nachteilig beschrieben, da sich lokal toxische Metaboliten anhäufen und es zudem zu pH-Wert-Verschiebungen kommt. Aufgrund dieser Tatsache werden die Tuben in der Praxis entweder manuell oder über automatische Rotationssysteme täglich gewendet. Eine wissenschaftlich basierte Auswertung der Vorteile des regelmäßigen Wendens steht bisher noch aus.

Ziel der durchgeführten Studie war es daher, den Einfluss einer manuellen und maschinellen Rotation von Besamungstuben im Vergleich zu nicht bewegten Kontrollproben über eine Lagerungsdauer von fünf Tagen aufzuzeigen. Da Eberspermien sehr sensitiv auf pH-Veränderungen reagieren und somit rotationsbedingte Effekte überlagert werden könnten, wurden rotationsbedingte Oszillationen des pH-Wertes experimentell berücksichtigt. Entgegen der erwarteten Ergebnisse wurden nachteilige Effekte des Wendens auf die Spermaqualität nachgewiesen. Somit kann ein tägliches Wenden der Tuben heute nicht mehr empfohlen werden.