

**Sammenligning af Progesterontest, Vaginoskopi og Vaginalcytologi til  
bestemmelse af optimalt parringstidspunkt hos hund.**



**Hovedopgave**

**Fagdyrlæge for sygdomme hos hund og kat**

**Marts 2007**

**Dyrlæge Kathrine Kirchhoff**

**Dyrlægegruppen Frijsenborg A/S**

<b>Indholdsfortegnelse</b>	<b>Side</b>
<b>1. Sammendrag</b>	<b>3</b>
<b>2. Indledning</b>	<b>3</b>
<b>Hundens cyklus</b>	<b>3</b>
<b>Hormonkoncentrationer gennem cyklus</b>	<b>4</b>
<b>Fertilisationsperioden og den fertile periode</b>	<b>5</b>
<b>Fastsættelse af cyklus og ovulationstidspunkt</b>	<b>6</b>
<b>Vaginoskopi</b>	<b>7</b>
<b>Vaginalcytologi</b>	<b>8</b>
<b>Måling af plasma- progesteron</b>	<b>11</b>
<b>3. Materialer og metoder</b>	<b>12</b>
<b>Antal tæver og inklusions/eksklusionkriterier</b>	<b>12</b>
<b>Vaginoskopi</b>	<b>13</b>
<b>Vaginalcytologi</b>	<b>13</b>
<b>Bestemmelse af progesteronkoncentration</b>	<b>14</b>
<b>4. Resultater</b>	<b>15</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>19</b>
<b>6. Konklusion</b>	<b>23</b>
<b>6. Tak</b>	<b>23</b>
<b>7. Litteraturliste</b>	<b>24</b>
<b>8. Bilag 1. Målinger og observationer</b>	<b>26</b>

## Sammendrag

Plasmaprogesteronkoncentrationen, vaginoskopiske og vaginalcytologiske forandringer blev henholdsvis målt og bedømt fra 23 tæver af forskellige racer. Målingerne blev foretaget fra dag 7 efter observeret proøstrus, og indtil en kvantitativ plasma progesteronkoncentration på over 5 ng/ml kunne konstateres. Tæverne blev undersøgt 2-4 gange med 1-3 dages mellemrum. Plasma-progesteronkoncentrationen blev bestemt med henholdsvis to semikvantitative test Target® (Biometallics, Princeton, U.S.A.) og Hormonost® (Biolab, München), og en kvantitativ test Chemiluminescent-immunoassay (CLIA, Immulite, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). Resultater fra undersøgelsen viste at vaginoskopi giver en god korrelation imellem de målte progesteronkoncentrationer ved CLIA og er en god metode til fastsættelse af fertilisationsperiodens begyndelse. Vaginalcytologi viste sig at være anvendelig til fastsættelse af den tidlige præovulatoriske stigning i progesteron når den sammenholdes med vaginoskopiske observationer i samme periode. Når der ved vaginalcytologi konstateres et forhørningsindex på 80% kan metoden kombineres med semikvantitativ eller kvantitativ progesteronmåling og vaginoskopi til fastsættelse af ovulationstidspunkt. Vaginalcytologi alene er for usikker en metode til fastsættelse af ovulationstidspunkt. De semikvantitative test Target® og Hormonost® kunne fastsætte ovulationstidspunkt med en korrelationskoefficient på henholdsvis 0,71 og 1,00. Begge test viste farveomslag svarende til progesteronkoncentrationer under 5ng/ml, hvor den kvantitative test CLIA viste niveauer over 5 ng/ml. Derfor anbefaledes det, at de semikvantitative test anvendtes i kombination med vaginoskopi, til fastsættelse af det optimale parringstidspunkt.

## Indledning

### ***Hundens cyklus***

Tævens østruscyklus beskrives monoøstral, hvilket betyder, at der er en lang anøstral periode imellem to østrusperioder uanset om parring og drægtighed finder sted (1,2,3). Cyklus består af 4 perioder: proøstrus (ca. 7-10 dage), østrus (ca. 7-10 dage), metøstrus (ca. 2 måneder) og anøstrus (ca. 4-5 måneder). Bliver tæven ikke drægtig går der 7-9 måneder før næste parring er mulig, hvilket ikke er optimalt for en opdrætter. Simple kliniske metoder til fastsættelse af optimalt parringstidspunkt vil være af stor værdi for hundeopdrættere (1,3,4,5,6,7).

Proøstrus erkendes klinisk af hævelse af vulva, blodigt serohæmorrhagisk vaginalflåd, som er forårsaget af stigende østrogenniveau produceret af præovulatoriske oocytter (3). Hanhundens

interesse for tæven øges, men tæven tillader normalt ikke parring. I østrus ses aftagende vulva- og vaginalødem samt aftagende vaginalflåd, som enten forsvinder helt eller bliver mere klart (tabel 1). Tæven accepterer nu parring af hanhunden. I metøstrus er vulvødemet næsten forsvundet, og der ses kun lidt strågul flåd eller ingen flåd (tabel 1). Tæven accepterer ikke parring mere. I anøstrus er vulva svundet til normal størrelse, og der ses ikke flåd (tabel 1). Tæven vil på dette tidspunkt ikke acceptere hanhunden (1,3,4,5,6,7). Det anbefales ikke at fastsætte parringstidspunkt udelukkende ud fra østrusadfærd, da denne parameter ofte korrelerer dårligt med de underliggende hormonelle forandringer (2,8,9,10,11).

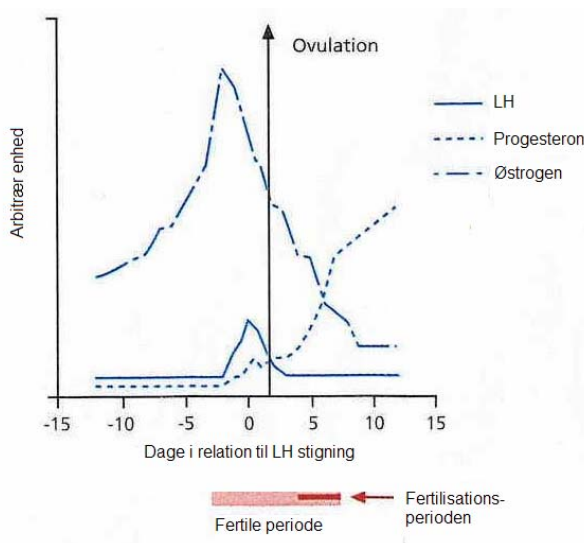
Tabel 1. Ændringer af vaginalcytologien, vulvas konsistens og vaginalflåddet igennem cyklus hos tævehunden (4)

Parameter	Proøstrus	Tidlig østrus	Sen østrus	Metøstrus
Vaginalcytologi, %forhornede celler	30% til 100%	80%-100%	80%-100%	0-80%
Vulva konsistens	Spændt, fast og ødematøs	En smule aftagende ødem	Tydelig aftagende ødem	Vulva er blød, men stadig forstørret
Seroanginøst flåd eller erythrocytter i vaginalflåd	+	+	+/-	+/-

### ***Hormonkoncentrationer gennem cyklus***

Indholdet af hormoner i blodet ændres ligeledes igennem cyklus. I proøstrus ligger østrogenkoncentrationen højt og progesteronkoncentrationen under 1 ng/ml. Omkring 2 dage før østrus falder østrogenindholdet, og progesteronkoncentrationen begynder at stige. En progesteronstigning til 2-2,9 ng/ml inducerer stigningen i det luteiniserende hormon (LH), og sætter tæven i endokrinologisk østrus. Tæven ovulerer når progesteronkoncentrationen ligger på omkring 5 ng/ml, og fortsætter med at stige til 15-90 ng/ml op til 30 dage efter østrus. Herefter vil niveauet igen falde, hvis ikke tæven er blevet drægtig. Ovulationerne opstår 38-44 timer efter LH-stigningen, og foregår over en periode på omkring 2 døgn. Hundens oocytter ovulerer som immature, primære oocytter. Fertilisation kan kun finde sted efter modning af den primære oocyt. Dette sker ved

afslutning af den første meiotiske deling og dannelsen af den sekundære oocyt. Modningsprocessen er først afsluttet minimum 2 døgn efter ovulation er indtrådt eller 4 døgn efter stigningen i LH. Oocytterne er fertile i Salpinx Uteri i 2-3 døgn. Det vil sige 2-5 døgn efter ovulation (figur 1). Herefter når tæven til metøstrus, som karakteriseres ved manglende accept af hanhund og hurtig ændring af vaginalcytologien (1,3,5,8,10).



Figur 1. Grafisk fremstilling af ændringerne i LH, Progesteron og Østrogen i plasma i relation til ovulation og den fertile periode og fertilisationsperioden hos tæven. LH-stigningen ses på dag 0 og ovulation på dag 2 (2).

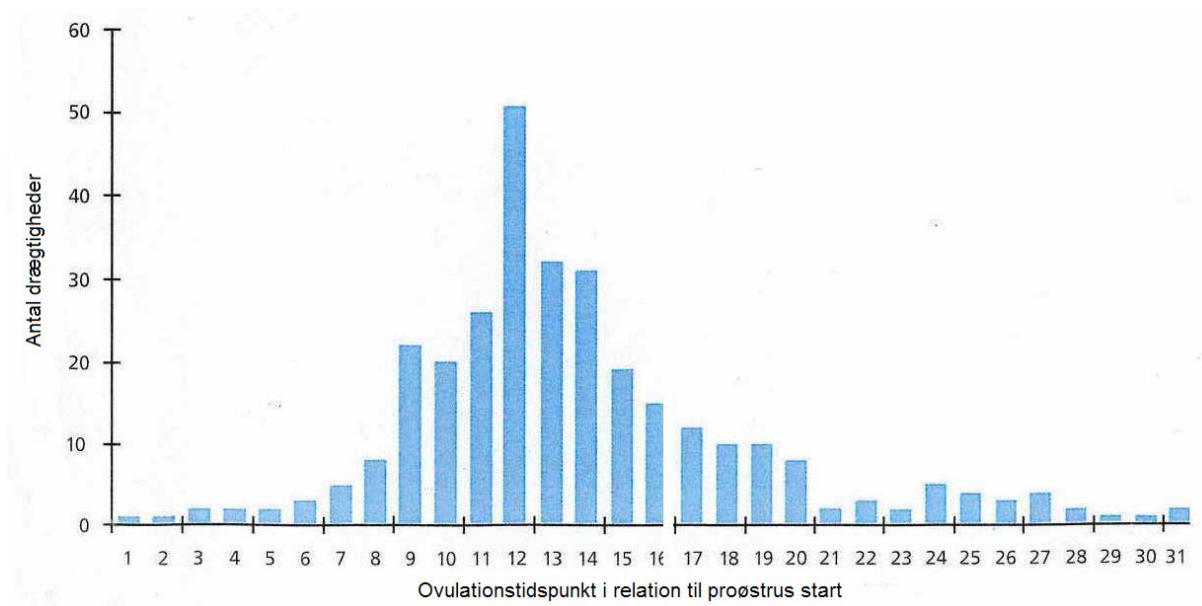
### ***Fertilisationsperioden og den fertile periode***

Fertilisationsperioden defineres som den periode, hvor mature sekundære oocytter er til stede i Salpinx Uteri. Det er fra 4 til 7 dage efter den præovulatoriske stigning i det luteiniserende hormon (LH), eller når progesteronkoncentrationen stiger til op over 8-10 ng/ml (3,4,9,10, figur 1).

Den fertile periode er den periode, hvor en parring kan resultere i drægtighed. Denne periode strækker sig fra 3 dage før til 7 dage efter den præovulatoriske stigning i LH. For at kunne planlægge et optimalt parringstidspunkt, bør den fertile periode og fertilisationsperioden bestemmes (figur 1). At den fertile periode er længere end fertilisationsperioden skyldes, at spermatozoerne kan overleve længe i uterus. Hundesæd fra en avlshan med optimal sædkvalitet kan forblive fertil i uterus i op til 7 dage efter deponering (3,4,9,10)

## **Fastsættelse af cyklus og ovulationstidspunkt**

En præcis fastsættelse af cyklusforløb og ovulationstidspunkt er af betydning for at opnå drægtighed ved parring (1,2). Der er dårlig sammenhæng imellem de fysiologiske og adfærdsmæssige ændringer i østrus og tidspunktet for ovulation, derfor er klinisk observation alene ikke nok for optimalt valg af parringstidspunkt (2,11). Ovulationstidspunkt i relation til proøstrus varierer imellem de enkelte tæver og imellem to østrusperioder hos den samme tæve (12,13,14,15). Ovulation sker normalt cirka 12 dage efter start af proøstrus. Parring vil i dette tilfælde være optimal imellem 14 og 16 dage efter start af proøstrus. Dette varierer, så ovulation kan ske fra 1-31 dage efter start af proøstrus (2, figur 2).



Figur 2. Antal dage fra 1.dag i proøstrus til ovulationsdagen for 292 tæver (2).

En del opdrættere vælger at parre deres tæver et fast antal dage fra første dag i proøstrus. Dette kan resultere i manglende drægtighed hos fertile tæver, da de parres eller insemineres på et tidspunkt, hvor der ikke er mature oocytter i Salpinx Uteri. Dette er den hyppigste årsag til manglende drægtighed hos tævehunden (11,12,13,14). En præcis fastsættelse af fertilisationsperioden er ikke nødvendig for tæver, som kan parres flere gange i en brunstperiode, hvis blot man sørger for parringen indenfor den fertile periode. Præcis fastsættelse af fertilisationsperioden er vigtig for tæver: 1) som skal insemineres med nedkølet eller frossen sæd, hvor overlevelsen af spermatozoerne er betydelig kortere, 2) for tæver som kun har mulighed for en parring eller 3) for tæver, der skal parres med en hanhund med kendt ringe sædkvalitet. Til fastsættelse af

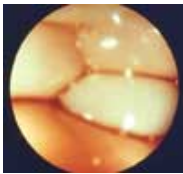
fertilisationsperioden kan i klinisk praksis blandt andet benyttes vaginalcytologi, vaginoskopi eller progesteronmåling (4,9).

### **Vaginoskopi**

Vaginal endoskopi eller vaginoskopi er en inspektion af den vaginale mucosa ved brug af et rigidt endoskop eller proktoskop. Proceduren tolereres ofte på stående og usederet hund og kan udføres på kort tid (16). Vaginoskopien er baseret på observationer af vaginalslimhindens udseende igennem østrus i relation til de hormonelle ændringer (16). Vaginoskopien skal foretages i den craniale del af vagina, hvor karakteristika for den enkelte periode er mest præcise (3,7,10,16,17).

De vaginoskopiske forandringer kan deles op i 4 perioder i forhold til cyklus:

1. periode: Tæven er i proøstrus og frem til den præovulatoriske LH-stigning. På baggrund af den stigende østrogenkoncentration, ophobes væske i mucosa. Vaginalslimhinden vil fremstå ødematøs med store afrundede folder, fugtig og med en pink eller pink/bleg farve (2,16, figur 3).



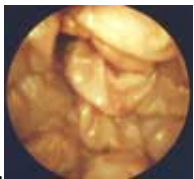
Figur 3. Billede af 1. periode set ved vaginoskopi der ses ødem, fugtig slimhinde og afrundede folder (4).

2. periode: Tæven er i den første del af østrus. Denne periode strækker sig fra LH-stigningen og 3-4 dage frem. Det pludselige præovulatoriske fald i østrogen vil få epitelet til at fremstå foldet og krympet, men med runde kanter uden angulering og slimhinden vil være tør og bleg. Det er i denne periode, der forventes ovulation, og hvor østrogen/progesteronratioen falder (2,16, figur 4).



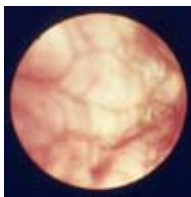
Figur 4. Billede af 2. periode ved vaginoskopi, hvor der ses aftaget ødem, blodigt flåd og bleg slimhinde.

3.periode: Tæven er i sidste del af østrus og ved starten på fertilisationsperioden. Perioden strækker sig fra 4 dage efter LH-stigningen og til metøstrus. Vaginalepitelet vil være yderligere krympet og med skarpe kanter, også kaldet angulering. Epitelets farve ændres fra bleg til cremet hvid (2,16, figur 5).



Figur 5. Billede af 3.periode, her ses krympet, anguleret slimhinde, som er tør og cremefarvet (4).

4.periode: Tæven går nu i metøstrus. Denne periode er domineret af progesterons påvirkning af epitelet og karakteriserer afslutningen af fertilisationsperioden. I starten af denne periode ses stadig angulerede vaginalfolder, men med en fremskridende affladning af epitelet. Mucosaen bliver hyperæmisk og irritativ med fremkomst af rødlige rossetter ved kontakt med endoskopet (2,16,figur 6).



Figur 6 4. periode, hvor der ses aftagende folddannelse og affladning af vaginalslimhinden som er rød og irritativ (4).

Når vaginalslimhinden er i 2.-3. periode er tæven parringsklar (2,16).

### ***Vaginalcytologi***

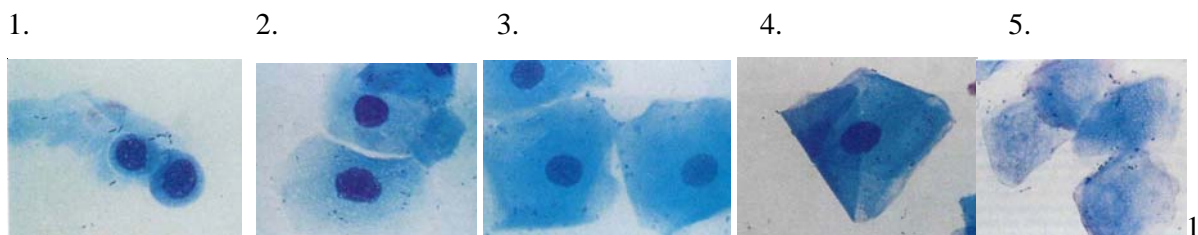
Vaginalcytologi er nem at udføre og kan være en brugbar indikator for reproduktionsstatus (2,10,18,19). Svaberprøven udtages fra den craniale del af vagina, da forandringerne her er i overensstemmelse med de forventede cytologiske forandringer i forhold til aktuel cyklusstadie (10).



Tabel 2. Vaginalcytologiske fund i relation til fremadskridende cyklus (19), jvf.figur 5.

<i>Anøstrus</i>	<i>Få cellelag og lille mængde epitelceller i skrabet domineret af parabasalceller og små intermediærceller</i>
<i>Proøstrus</i>	<i>Forøgelse af cellelag i vaginalslimhinden, der ses færre parabasalceller og flere små og store intermediærceller og erythrocytter. I sen proøstrus ses også superficialceller i skrabet.</i>
<i>Tidlig Østrus</i>	<i>Antallet af erythrocytter er aftagende, der ses mange store intermediærceller og superficialceller med pykonotisk kerne og anukleære superficialceller.</i>
<i>Sen Østrus</i>	<i>Få erythrocytter, flest superficialceller hvor mange er anukleære, store intermediær celler</i>
<i>Metøstrus</i>	<i>Polymorfnukleære leucocyter,intermediærceller,bakterier, parabasalceller og cellulær debris</i>

Ændringen i tævehundens cyklus fra proøstrus til østrus karakteriseres ved fremadskridende keratinisering af vaginas epitelceller. Antallet af cellelag i vaginalslimhinden forøges, og denne fortykkes. Epitelet ændrer sig fra i proøstrus at være et lavt kubisk epitel til i østrus at blive et keratiniseret pladeepitel. De nye og dybereliggende cellelag skubber de gamle lag væk fra basalmembranen og de underliggende blodkar, som tidligere har virket som næringskilde for cellerne, hvorved de øverste cellelag dør og afstødes. Indtil cellerne bliver store intermediærceller, er de stadig levende, og kernen er normal. Som følge af akkumulering af metaboliske biprodukter i cytoplasmaet efter reduktion af ilt og næringsstoffer til cellerne, dør de, og kernen bliver pyknotisk. Cellerne kaldes nu superficialceller (figur 7,8, tabel 2). De kan deles i 3 typer: superficialceller med pyknotisk kerne, superficialceller med pyknotiske kernerester og anukleære superficialceller. En superficialcelle har en karakteristisk kantet form (5,6,9,13,15,20).



Figur 7. Celletyper fra vaginalskrab i tævens østralcyklus: 1) Parabasalceller 2) små intermediær celler, 3) store intermediærceller, 4) superficialcelle med kerne, 5) anukleære superficialceller (21).

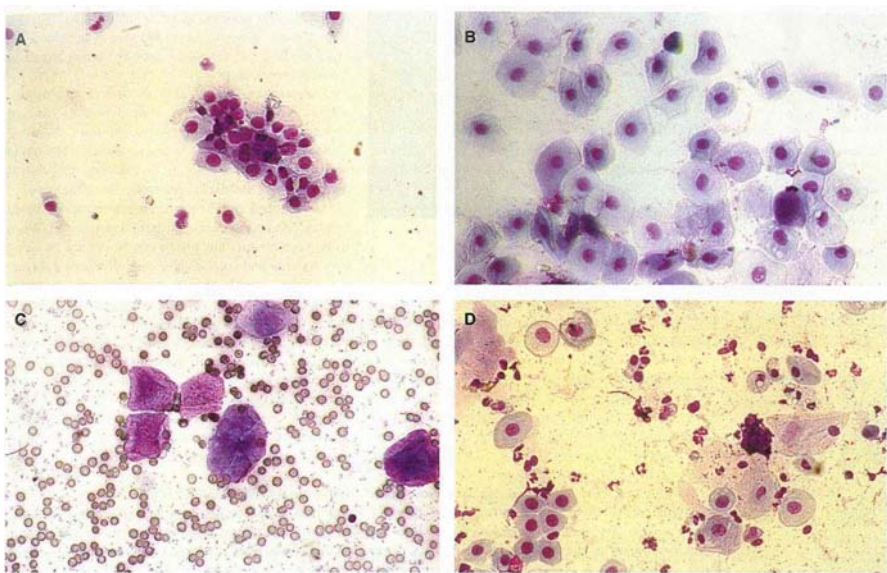
Karakteristisk for tæver i østrus er 80-100% superficialceller og manglende fund af små intermediærceller, parabasalceller og polymorf nukleære celler (10, figur 7,8).

Ved afslutning af fertilisationsperioden og overgang til metøstrus ses en udtynding af cellelagene i vagina og fremkomst af dybere cellelag. Disse cellelag er karakteriseret ved små intermediærceller, parabasalceller, cellulær debris og polymorf nukleære celler. Dette skift ses i løbet af et døgn og medfører et fald i forhornede celler med mere end 20% (10,13,15,20,22).

Det karakteristiske skift kan benyttes til fastsættelse af østrusperiodens afslutning eller metøstrus indtræden (14). Stigningen i LH og fastsættelse af om parring eller inseminering har været foretaget i fertilisationsperioden kan retrospektivt beregnes, da det cellulære skift normalt ses 7-8 dage efter LH-stigningen eller 5-6 dage efter ovulation (15).

Forhorningsindex udregnes på baggrund af forholdet imellem antallet af superficialceller og det totale antal epitelceller:

Forhorningsindex = (Antal superficialceller/totalt antal epitelceller) x 100 (19).



Figur 8. Billeder af vaginalsvaber fra forskellige stadier af cyklus fra tæver. A. Typisk svaber fra en tæve i anøstrus med parabasalceller. B. Vaginalsvaber fra tæve i proøstrus; de fleste af cellerne er store og små intermediærceller. C. Vaginalsvaber fra en tæve i østrus; der ses forhornede superficialceller, superficialceller med pyknotisk kernemateriale og en del erythrocytter. D. Vaginalsvaber fra en tæve i metøstrus; der ses en del små intermediærceller, parabasalceller og neutrofile granulocytter (2).

Hvis eneste parameter til fastsættelse af parringstidspunkt er vaginalcytologi anbefales det at parre tæven i den periode, hvor der ses mere end 80% superficialceller i vaginalsvaberen svarende til et forhorningsindex > 80% (2,10,20,22).

Anvendeligheden af vaginalcytologi er omdiskuteret, da visse tæver aldrig når et forhorningsindex over 60%, og andre har et forhorningsindex på 100% allerede på 9.dagen. Nogen tæver har to forhorningsstoppe, hvilket kan få klinikerer til at tro, at hunden efter den første top er på vej i metøstrus, selvom ovulation endnu ikke er sket (20).

Et forhorningsindex på 80% kan monitorere progressionen af proøstrus imod østrus og hindre unødige progesteronmålinger og parring, indtil proøstrus er afsluttet (3).

Hvis man vælger kun at udtage en enkelt svaber som eneste parameter til fastsættelse af parringstidspunkt, kan det være svært cytologisk at adskille tidlig proøstrus, meget sen østrus eller tidlig metøstrus, hvorfor der for den enkelte tæve bør udtages flere svaberprøver i en enkelt cyklus (10).

### ***Måling af plasma-progesteron***

Det er vist at stigningen i LH – koncentrationen i plasma kommer 2 dage før ovulationerne (14).

Desværre kræver påvisning af denne stigning daglige målinger, og resultaterne kan først frembringes fra et eksternt laboratorium 4 dage senere (14). Samtidig med stigningen i LH ses en øget koncentration af progesteron i tævens blod. Plasmaprogesteronkoncentrationen begynder at stige før østrus indtræder. Man kan derfor ved at monitorere den initiale progesteronstigning og den efterfølgende gradvise stigning forudsige ovulation og herved planlægge det optimale parringstidspunkt (1,2,12,14).

Ved at måle progesteronkoncentrationen flere gange efter hinanden med 2-3 dages interval, er det muligt at forudsige LH-stigning, ovulation og starten på fertilisationsperioden (2,4,5,6).

Parring eller inseminering bør planlægges 4 - 6 dage efter en progesteronkoncentration på 2 ng/ml svarende til tidspunktet for LH-stigningen eller 2 - 4 dage efter en progesteronkoncentration på 5 ng/ml, hvor ovulation kan forventes. En koncentration på 8-10 ng/ml indikerer starten på fertilisationsperioden (1,4,5,6, tabel 3).

Tabel 3. Ændringer i progesteronkoncentration i forhold til cyklusstadiet (8).

Serum Progesterone (ng/ml)	Cyklus stadiet
Under 1	Anøstrus eller proøstrus
1.0-1.9	Ovulation minus 3 dage, begyndende luteal aktivitet
2.0-2.9	Ovulation minus 2 dage, LH-stigning
3.0-5.0	Ovulation minus 1 dag
5.0-10.0	Ovulationstidspunkt
	Ovulation plus 2 dage er optimalt parringstidspunkt

Formålet med studiet var at sammenligne forskellige metoder til fastsættelse af cyklusstadiet og ovulationstidspunkt for at kunne bestemme optimalt parringstidspunkt. Fire metoder sammenlignes henholdsvis to semikvantitative progesterontest (Target® og Hormonost®) samt to kliniske metoder (vaginalcytologi og vaginoskopi). Disse test sammenholdes med kvantitativ progesteronniveau målt ved Chemiluminescent-immunoassay (CLIA). Metodernes anvendelighed til fastsættelse af cyklusstadiet og optimalt parringstidspunkt diskuteres.

## Materialer og metoder:

### ***Antal tæver og inklusions/eksklusions kriterier***

Antallet af tæver der skulle benyttes for at påvise en forventet korrelation imellem testene på 0,7 blev udregnet til 21 ved hjælp af kalkulatorberegning af stikprøvestørrelser

([www.home.clara.net/sisa/correl.htm](http://www.home.clara.net/sisa/correl.htm))(23) med en power på 0,8 og et konfidensinterval på 95%.

I undersøgelsen indgik 23 tæver af forskellige racer. Alle var imellem 2-8 år og havde haft minimum 2 uproblematiske brunstperioder. Ingen af tæverne havde tidligere været i behandling for urogenitale lidelser og var i forbindelse med undersøgelsen ikke i medicinsk behandling. Alle hundeejere blev mundtligt informeret om symptomer svarende til 1.dag i proøstrus. På 7.dagen efter ejers observation af 1.dag i proøstrus, som karakteriseres af vulvaødem og serohæmorrhagisk vaginalflåd, blev alle tæver præsenteret i klinikken. Der blev udført en generel klinisk undersøgelse. Tæverne blev undersøgt ved vaginoskopi, vaginalcytologi og progesteronmåling 2-4 gange med 1-3 dages mellemrum, indtil en kvantitativ koncentration i plasma på over 5 ng/ml kunne konstateres.

## **Vaginoskopi**

Vaginoskopi blev udført ved hjælp af et proktoskop med en længde på 25 cm og en diameter på 11 mm monteret på en Welsch Allen lyskilde (figur 9).



Figur 9. Proktoskop med Welsch Allen lyskilde påmonteret og indsats til proktoskopet ses ved siden af (Foto: Kathrine Kirchhoff).

Vulva blev rengjort og proktoskopet påført eksplorationsgel. Efter forsigtig digital åbning af vulva blev proktoskopet indført med en vinkling i forhold til horisontalplan på cirka 80 grader og med en god kontakt med den caudale vestibulumvæg for ikke af blive fanget af clitorisfolden. Efter at være nået til den caudale del af vagina blev proktoskopet rettet horisontalt, hvorved det fulgte vaginas forløb frem til den craniale del, hvorfra observationerne blev noteret (figur 10).



Figur 10. Vaginoskopisk undersøgelse af tævehund (Foto: veterinærsygeplejerske Anja Christensen).

## **Vaginalcytologi**

Efter rengøring af vulva, blev et sterilt vaginalt spekulum indført i vagina til åbning af vestibulum, hvorefter en vatpind vædet med sterilt vand blev indført til den craniale del af vagina, og en svaberprøve blev udtaget. Der blev lavet en cytologisk udstrygning på et objektglas, som blev

farvet med Hæmacolor©. Præparatet blev mikroskopert ved 10 x forstørrelse, og et forhorningsindex blev beregnet.

© Forhandles ved Kruuse.

### ***Bestemmelse af Progesteronkoncentration***

En ustabiliseret blodprøve fra V. cephalica blev udtaget og serum blev centrifugeret fra til bestemmelse af progesteronkoncentrationen. Der blev benyttet to forskellige test til semikvantitativ bestemmelse af progesteronkoncentrationen: Target® (Biometallics, Princeton, U.S.A.) og Hormonost® (Biolab, München). Begge er baseret på enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (figur 11). Ifølge producenten er det vigtigt for præcisionen af begge test, at de ikke udføres på fuldblod, og at reagenserne har stuetemperatur inden de benyttes (24,25). Alle testreagenser blev udtaget fra køl 6 timer før testudførelsen.

Alle undersøgelser er udført af forfatteren.



Figur 11. Target® (Biometallics, Princeton, U.S.A) og Hormonost® (Biolab, München) (Foto: Kathrine Kirchhoff).

Alle blodprøver blev undersøgt ved begge test efter producentens foreskrift, og progesteronkoncentrationen blev aflæst ved at sammenligne intensiteten af en eventuel fremkommen blå nuance i testbrønden med 4 standardfarver for Target® og 2 standardfarver for Hormonost® (tabel 4) .

Tabel 4. Sammenhæng imellem farveomslag og cyklusstadiet (C.L.=Corpus Luteum, P4= Progesteron) for Hormonost® og Target® (17).

Hormonost®, aflæsning	Mørkere/som Standard 1	Lysere end St 1 Mørkere end St 2	Som Standard 2	Lysere end Standard 2
Oversættelse	Ingen C.L-akt Proøstrus	Begyndende C.L-akt LH-top	Ovulation	Fertilisationsfase
Target®, aflæsning	C1: kraftig blå P4: 0-1 ng/ml	C2: lyseblå P4: 1-2,5 ng/ml	C3: svag blå P4: 2,5-5 ng/ml	C4: hvid P4: over 5 ng/ml
Oversættelse	Proøstrus	Begyndende progesteronstigning før LH-top	Østrus Ved LH-top	Efter ovulation

Til kvantitativ bestemmelse af progesteronkoncentration blev serum sendt til KU LIFE©, hvor der benyttes Chemiluminescent-immunoassay (CLIA). Chemiluminescent er defineret som en kemisk produktion af lys (17). Chemiluminescent-molekyler bundet til hormoner i serum udsender en målbar lysintensivitet proportional med mængden af hormon i prøven (17,25). Testbrønden er i bunden og op ad dens sider beklædt med et specifikt progesteronantistof. Hertil tilsættes ved automatiseret afpipettering patientens serum, og det hele inkuberes ved 37 grader. Ved centrifugering omkring testbrøndens vertikale akse, tvinges det ubundne materiale i reaktionsvæsken op i et øvre kammer og væk fra det antistof/antigenbundne materiale. Denne vaskeprocedure gentages flere gange. Proceduren gør at selv helt små mængder progesteron kan måles i prøven, da alt ubundet materiale effektivt bliver vasket væk. Chemiluminescent-substrat tilsættes, og lysintensiviteten aflæses med en højsensitiv photontæller (13,17,26).

© Københavns Universitet, Det Biovidenskabelige Fakultet for Fødevarer, Veterinærmedicin og Naturressourcer.

## Resultater

For Target® og Hormonost® blev aflæsningerne registreret og sammenholdt med progesteronkoncentrationer målt med CLIA.

Vaginoskopiundersøgelser blev inddelt i 3 stadier og opdelt efter deres overensstemmelse med (CLIA).

Stadie 1: svarende til proøstrus (~ 0-2ng/ml Progesteron).

Stadie 2: svarende til perioden fra LH-stigningen og frem til fertilisationsperiodens indtræden (~ 2-8ng/ml Progesteron)

Stadie 3: svarende til fertilisationsperioden (~ > 8 ng/ml Progesteron) .

Resultater ved vaginalcytologi blev opgjort i forhorningsindex. Ved forhorningsindex under 80% blev tæven vurderet som værende i proøstrus og ved forhorningsindex over 80% blev tæven vurderet som værende i østrus. Disse blev sammenholdt med progesteronmåling målt ved CLIA.

Resultaterne er sammenholdt i Tabel 5 og visualiseret i Figur 12.

Tabel 5. Overensstemmelse imellem Semikvantitative progesterontest (Target® og Hormonost® , vaginoskopi og vaginalcytologi sammenholdt med progesteronniveau målt ved CLIA.

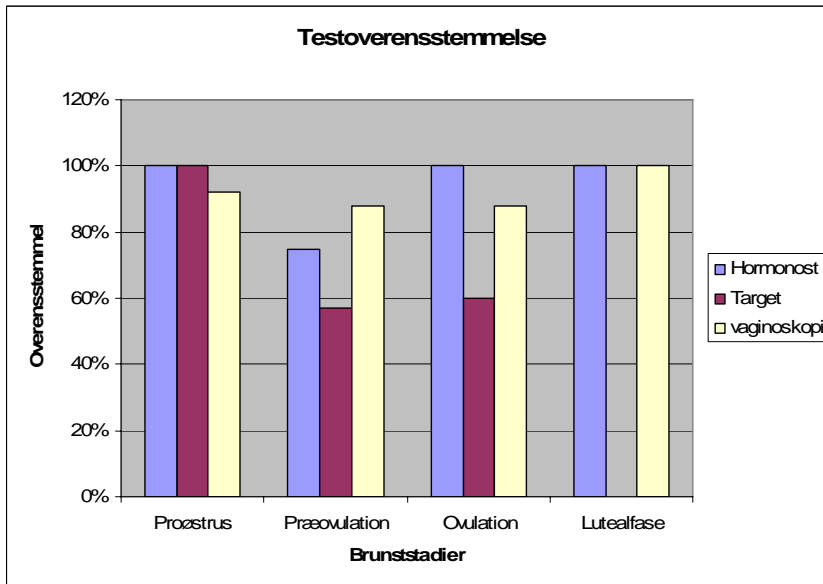
Test	Proøstrus	Præovulatorisk	Ovulationsfasen	Luteal eller	
CLIA	0-1ng/ml	Prog.stigning	5-8 ng/ml	konceptionsfase	
		1-5ng/ml		Over 8 ng/ml	
Hormonost®	100%	78%	100%	100%	
Target	100%	62%	60%	§	
Vaginoskopi	93%	92%	(2-8 ng/ml)#	100%	
	(0-2ng/ml)	(2-8ng/ml)			
Cytologi	71% er under	79% er over			
	80%	80%			
	kornificerede	kornificerede			

§ Testen kan ikke differentiere imellem ovulationsfasen og lutealfasen, da farven i brønden forbliver hvid.

# Denne periode har ikke en klar definition udover aftagende ødem og mere udtalt folddannelse.

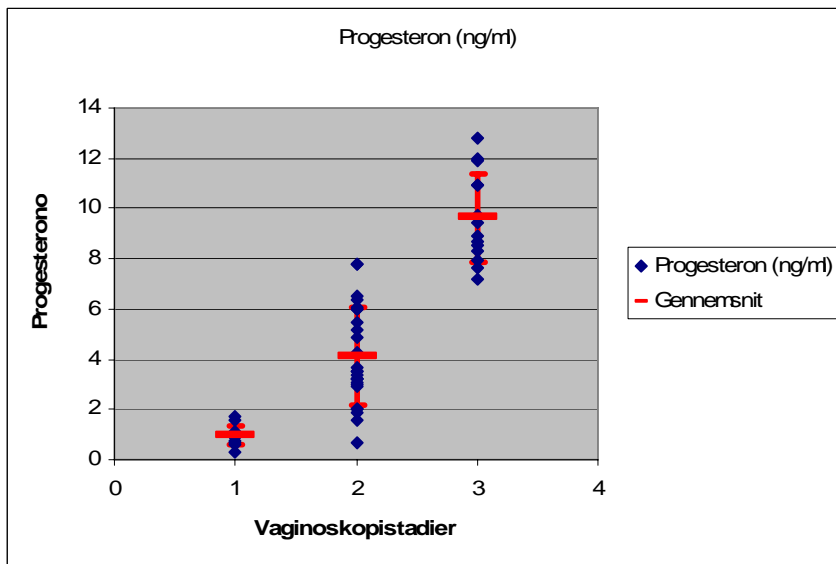


I figur 12 ses overensstemmelse imellem Hormonost®, Target® og vaginoskopi i forhold til den kvantitative progesteronbestemmelse igennem cyklus hos tæverne.



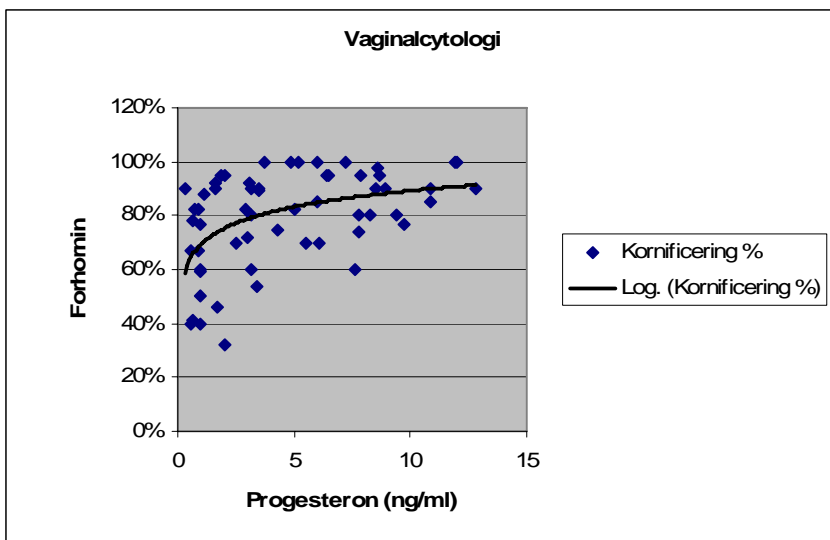
Figur 12. Overensstemmelse imellem Target®, Hormonost®, vaginoskopi i procent i forhold til CLIA for 4 forskellige cyklusstadier.

I figur 13 kan ses placeringerne af de vaginoskopiske fund og de tilhørende udregnede gennemsnit for de 3 første vaginoskopiperioder sammenholdt med den kvantitative progesteronbestemmelse.



Figur 13. Placeringen af vaginoskopifundene i forhold til den kvantitative progesteronmåling med et udregnet gennemsnit på henholdsvis 1; 4,2; og 9,7 ng/ml og en spredning for hver periode.

I figur 14 kan ses de udregnede forhorningsindex og logaritmen hertil sammenholdt med den kvantitative progesteronbestemmelse.



Figur 14. Sammenhængen imellem tævernes forhorningsindex og de målte progesteronkoncentrationer ved CLIA.

Target®'s og Hormonost®'s evne til udpegelse af om ovulation er forekommet er evalueret med programmet WinEpiscope (27). Kvantitativ progesteronbestemmelse ved CLIA er benyttet som reference. Tærskelværdien for om ovulation er forekommet eller ej er sat til 5 ng/ml for denne test. Med free-ware programmet WinEpiscope er Sensitiviteten, Specificiteten, den Positive og Negative Prædiktive værdi samt korrelationen (Kappa-værdien) imellem testene og CLIA beregnet for tre perioder: dag 6-9, dag 10-12 og dag 13 efter 1.dag i proøstrus. Resultaterne for de to test ses i tabel 6 og 7.

Tabel 6. Evaluering af Hormonost®'s evne til udpegelse af om ovulation er forekommet.

	Dag 6-9	Dag 10-12	Dag 13-
Sensitivitet	100%	100%	100%
Specificitet	100%	100%	100%
Pos.Prædiktiv værdi	100%	100%	100%
Neg.prædiktiv værdi	100%	100%	100%
Kappa-værdi <u>1</u>			

Tabel 7. Evaluering af Target®'s evne til udpegelse af om ovulation er forekommet.

	Dag 6-9	Dag 10-12	Dag 13
Sensitivitet	33%	57%	75%
Specificitet	100%	100%	100%
Pos. Prædiktiv værdi	100%	100%	100%
Neg.Prædiktiv værdi	91%	57%	72%
Kappa-værdi på <u>0,71</u>			

## Diskussion

Ved brug af vaginoskopi til fastsættelse af cyklusstadiet fandtes god korrelation i forhold til CLIA-bestemmelse af progesteronkoncentrationen. Procentvis lå vurderingerne imellem 92-100% med størst overensstemmelse ved progesteronkoncentration imellem 0-1ng/ml. Med henvisning til figur 12 og 13 ses god overensstemmelse imellem de vaginoskopiske observationer og de målte progesteronkoncentrationer med en gennemsnitlig progesteronværdi for de 3 vaginoskopistadier på henholdsvis 1; 4,2; 9,7 ng/ml. En enkelt tæve havde et progesteronniveau på under 1 ng/ml, men blev bedømt til stadium 2 ved vaginoskopi. Tæven var en af de første, som indgik i studiet, og bedømmelsen beror med størst sandsynlighed på klinikerens manglende rutine. Vaginoskopi er afhængig af en subjektiv bedømmelse af vaginas slimhinde og er afhængig af klinikerens rutine og præcision i bedømmelsen. Denne faktor var en svaghed i nærværende studie specielt for de første tæver, som indgik i undersøgelsen. Jeffcoate et.al.1989 (9). beskriver et skoresystem ud fra vaginoskopiske observationer til fastsættelse af cyklusstadiet hos tæven, hvor klinikerens kan oparbejde en rutine i fastsættelse af fertilisationsperioden udelukkende ud fra sine vaginoskopiske observationer. Fay et.al.2003 (15) fandt ved undersøgelse af 207 tæver igennem østrus en tilfredsstillende korrelation imellem aktuel cyklusstadiet og vaginoskopiske observationer, men at sikkerheden blev forbedret ved at benytte flere alternative test. Nærværende studie viser, at man ved at benytte vaginoskopi med stor sandsynlighed kan fastsætte starten på fertilisationsperioden og dermed det optimale parringstidspunkt. Præcis konstatering af ovulationstidspunktet kræver at klinikerens har oparbejdet en vis rutine, da netop dette tidspunkt er karakteriseret af tydelig aftaget ødem, men stadig uden angulering.

Ved brug af vaginalcytologi til fastsættelse af cyklus viste studiet en stigende forhorning af vaginalepitelet hen til lige under eller lig 80% på tidspunktet for LH-stigningen. Med henvisning til figur 11 ses herefter en tydelig affladning af kurven igennem østrus. Udfra denne affladning ses at fastsættelse af ovulationstidspunktet alene udfra vaginalcytologi ikke er muligt, men kan benyttes til konstatering af begyndende lutealaktivitet, med henblik på supplerende undersøgelser af tæven til fastsættelse af det optimale parringstidspunkt. Metoden kan spare klinikerne for unødige progesteronbestemmelser i proøstrus, da stigningen i forhorningsgrad i den sene proøstrus er påfaldende. I litteraturen er beskrevet overgangen fra fertilisationsperioden til metøstrus med et karakteristisk fald i forhornede celler på op over 20% i løbet af et døgn (15,20). Dette vil være et godt indicium til fastsættelse af fertilisationsperiodens afslutning og fastsættelse af det præcise ovulationstidspunkt retrospektivt. Der var ingen tæver i dette studie, som blev undersøgt til metøstrus. Bouchard et.al.1991 (10) fandt ved undersøgelse af 16 tæver at vaginalcytologien var brugbar til udpegelse af ovulationstidspunktet både prospektivt og retrospektivt. Det er det eneste studie, som har fundet cytologien brugbar til prospektiv bestemmelse af ovulationstidspunkt, og der er i studiet taget forbehold for den specielle forsøgsopstilling, hvor alle cytologiske vurderinger var sammenlignet med det aktuelle progesteronindhold i tævernes serum. Wright, P.J.1990 (18) konkluderede ved undersøgelse af 11 tæver igennem cyklus ved vaginalcytologi sammenholdt med progesteronmåling at en præcis udpegelse af proøstrus, start på østrus og metøstrus var mulig. Fastsættelse af ovulationstidspunktet krævede at vaginalcytologien blev kombineret med progesteronmåling. England, G.C.V.1992 (20) undersøgte 50 tæver ved vaginalcytologi og vaginalflåddets udseende. 42 af tæverne havde 2 forhorningstoppe med et gennemsnitligt antal dage imellem de to på 3,6 . Optimalt parringstidspunkt blev konstateret når 2. forhorningstop var erkendelig, da det korrelerede med 4,4 dage efter LH-toppen. Det anbefales altid at udføre flere svaberprøver igennem cyklus, for at konstatere om tæven havde 1 eller to forhorningstoppe, hvorved der undgås parring på et forkert tidspunkt. I nærværende studie blev ikke konstateret tæver med flere forhorningstoppe. Enkelte tæver havde et lille fald i antallet af forhornede celler for herefter at stige, men da det ikke drejede sig om mere end nogen få procent, blev det ikke tillagt nogen betydning. Ud fra denne undersøgelse ses vaginalcytologi at være en brugbar metode til fastsættelse af endokrinologisk østrus, men for upræcis til fastsættelse af optimalt parringstidspunkt, hvis ikke kombineret med vaginoskopi eller progesteronmåling, da forhorningsindexet kun ændrede sig få % fra LH-stigningen og frem til efter ovulation.

Ved bestemmelse af progesteronkoncentrationen blev CLIA brugt som reference i forhold til Target® og Hormonost®. Det har ikke været muligt at få oplyst inter-og intraassay værdier for testen. Kutzler et.al.2003 (26) konstaterede ved måling af progesteronkoncentrationer af 63 tæver igennem cyklus med radioimmunassay (RIA) og chemiluminescent immunassay (CLIA) en god korrelation imellem de to testformer. RIA viste størst præcision i forhold til CLIA når progesteronkoncentrationen lå i det lave område imellem 1-2ng/ml. Til gengæld havde CLIA den fordel, at den gav et hurtigt svar og uden brug af radioaktive isotoper. Begge test var præcise metoder til fastsættelse af cyklusstadiet hos tævehunden.

Ved brug af Target® til fastsættelse af cyklusstadiet fandtes en korrelation på 100% når tæverne var i proøstrus. Til gengæld stemte testen kun overens med CLIA imellem 60-62% af tilfældene efter progesteronkoncentrationen begyndte at stige og helt hen til et progesteronniveau på omkring 7-8 ng/ml. Testen viste at tæverne var tidligere i cyklus end tilfældet var, det vil sige med en risiko for, at tæven ville blive parret eller insemineret for sent. Testen var enkel at udføre og med en let læselig og udførlig brugsanvisning. Hospes et.al. 2004 (13) fandt ved undersøgelse af 32 tæver med Target®, Hormonost® og vaginalcytologi igennem cyklus, den samme manglende korrelation ved brug af Target® i perioden fra stigende progesteronkoncentration til fertilisationsperiodens start. England et.al.1989 (12) fandt ved undersøgelse af 7 tæver med to ELISA-baserede test, at 1 ud af 10 tæver ville blive parret for sent, som følge af for sent farveomslag i testbrønden i forhold til det målte progesteronniveau ved RIA. Bouchard et.al.1991(10) undersøgte 16 tæver igennem cyklus ved semikvantitativ ELISA-baseret progesterontest og vaginalcytologi. De fandt, at der var god korrelation imellem den ELISA-baserede test og RIA til fastsættelse af ovulationstidspunkt. Target® kan ikke bestemme tidspunktet for fertilisationsperiodens start, da sidste omslag for koncentrationer over 5ng/ml er hvid, og det ændrer sig ikke ved stigende koncentrationer. Omslaget til hvid forekom hos en del af tæverne først når koncentrationen nåede 7-8 ng/ml, men skulle i følge producenten være slået om ved 5 ng/ml (24).

Hormonost® viste i studiet en 100% præcision når tæverne var i proøstrus og når progesteronkoncentrationen steg op over 5 ng/ml. Når progesteronkoncentrationen lå imellem 1-5 ng/ml viste testen overensstemmelse i 78% af tilfældene. Testen viste 100% overensstemmelse i udpegelse af ovulationsperioden og hermed fastsættelse af parringstidspunkt. Fordelen ved denne test er, at den kan konstatere en stigende progesteronkoncentration postovulatorisk, når fertilisationsperioden er indtrådt. Udførelsen af testen krævede lidt øvelse og ro i lokalet de første gange, den skulle udføres. Instruktionen fra producenten var fyldestgørende. Hospes et.al. 2004 (13)

fundt ved undersøgelse af 32 tæver med Target® og Hormonost® dårligst korrelation med RIA i perioden for den initiale progesteronstigning, men kunne konstatere en forbedring af resultaterne ved brug af målepipetter i stedet for de medfølgende engangsplastikpipetter. Dette blev ikke benyttet i nærværende studie, da formålet var at sammenligne de to test ud fra de fra producenten medfølgende retningslinier.

Ifølge Hospes et.al.2003 (13) og Biolab®, München skulle følgende dosering af reagenser benyttes for at opnå en større præcision af Hormonost®:

- Fra standard 1, 2 og patientserum afmåles 200 µl
- Fra flaske 1 afmåles 300 µl
- Fra flaske 2 90 µl
- Fra flaske 3 afmåles 500 µl

Testenes evne til udpegelse af ovulationstidspunktet viste for Hormonost® en korrelationskoefficiens på 1. Det vil sige, at den i alle tilfælde er en meget sikker test til dette formål. At den hos enkelte tæver viste, at de var i proøstrus på trods af en begyndende præovulatorisk progesteronstigning stiller krav til klinikerens om yderligere undersøgelser af tæven i denne periode for ikke at risikere en for sen parring eller inseminering. For Target® konstateredes en korrelationskoefficiens på 0,71 for udpegelse af ovulationstidspunkt. For de enkelte perioder lå sensitiviteten på henholdsvis 33%, 57% og 75%. Det vil sige en vis procent af tæverne vil give et negativt svar på testen, når der rent faktisk er forekommet ægløsning. Samtidig var den negative prædiktive værdi på henholdsvis 91%, 57% og 72 for de tre perioder, hvilket betyder at kun i de nævnte procenter kan man for testen regne med, at der ikke er forekommet ægløsning, når den udpeger det. Specificitet og Positive Prædiktive værdi var for alle 3 perioder på 100%. Dette studie viser, at når Target® aflæses til et omslag svarende til en koncentration på over 5ng/ml svarende til at ovulation kan forventes, er der 100% overensstemmelse. Desværre vil en del tæver, som er ovuleret ikke blive udpeget ved denne test, eventuelt medførende en for sen parring og manglende drægtighed.

Nærværende studie var behæftet med enkelte svagheder i forbindelse med indsamling af data: 1) fastsættelsen af 1. dag i proøstrus afhang af ejerens observationsevne, og på trods af informationssamtaler med klienterne forud for undersøgelsen, må der forventes en vis usikkerhed i forbindelse med fastsættelse af denne dag. 2) observationerne kunne ikke altid foretages på den ønskede dag af hensyn til klienternes tidsplan, så enkelte progesteronmålinger blev foretaget en dag

senere end egentlig beregnet ud fra sidste undersøgelse. 3) klassificeringen af observationer ved vaginoskopi, farveomslag for de semikvantitative progesterontest og vaginalceller i de cytologiske aftryk er subjektiv, og vil derfor være afhængig af forfatterens evne og rutine i bedømmelsen af disse parametre. Men det er den virkelighed, der arbejdes med i klinisk praksis indenfor reproduktionskontrol af tæver.

For fastsættelse af det optimale parringstidspunkt kan ud fra nærværende studie anbefales at en tæve i tidlig proøstrus undersøges ved vaginalcytologi og vaginoskopi indtil et forhorningsindex på 80% og et begyndende aftagende ødem i vaginalslimhinden kan konstateres. På dette tidspunkt, hvor der ses en præovulatorisk progesteronstigning, kan anbefales vaginoskopi og progesteronmåling som de optimale undersøgelsesmetoder. Hormonost® viste sig at være den mest præcise af de to undersøgte semikvantitative progesterontest. Hvis man vælger at benytte Target®, skal en omhyggelig vaginoskopering udføres ved hver undersøgelse af tæven for at konstatere starten på fertilisationsperioden og herudfra en korrekt planlægning af det optimale parringstidspunkt.

## **Konklusion**

Vaginoskopi er en god og sikker metode til fastsættelse af parringstidspunkt hos tæven, dog bedst i kombination med progesteronbestemmelse i tævens blod hen imod ovulationstidspunktet.

Vaginalcytologi er en god metode til fastsættelse af den præovulatoriske progesteronstigning, men bør benyttes i kombination med enten vaginoskopi eller progesteronmåling til fastsættelse af optimalt parringstidspunkt. Af de to undersøgte semikvantitative progesterontest er Hormonost® den mest præcise til fastsættelse af cyklusstadiet og det optimale parringstidspunkt hos tævehunden.

## **Tak**

Tak til Kruuse, Biolab, E-vet og Frimodt- Heineke Fonden for økonomisk støtte.

Tak til Dyrlæge, p.H.d Helene Jacobsen for korrekturlæsning.

Tak til Statistiker Marlene Trinderup for statistisk vejledning.

Tak til kollegaer fra Dyrlægegruppen Frijsenborg A/S og Dyrlæge Lene Kristensen for hjælp til indsamling af tæver til undersøgelsen.

## Litteraturliste

1. Concannon, P.W, Hansel, W., Mcentee, K.: Changes in LH, Progesterone and Sexual Behavior Associated with Preovulatory Lutenization in the Bitch. *Biology of Reproduction* 1977, 17, 604-613.
2. Hewitt, D., England, G.C.W.: Assessment of optimal mating time in the bitch. *In Practice* 2000, 24-33.
3. Goodman, M.: Ovulation Timing. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2001, 31(2), 219-235.
4. Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C.: Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. *International Veterinary Service* 2002.
5. Concannon, P.W., England, E., Verstegen, J.: Canine Pregnancy: Predicting Parturition and Timing Events of Gestation. *International Veterinary Information service* 2000.
6. Concannon, P.W., Lein, D.H.: Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnancy, and pregnancy in dogs. In: Kirk RW, ed. *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice, Vol X*. Philadelphia: W.B. Saunders. 1989: 1269-1282.
7. Concannon, P.W., Hansel, W., Visek, W.J.: The Ovarian Cycle of the Bitch: Plasma Estrogen, LH and Progesterone. *Biology of Reproduction* 1975, 13, 112-121.
8. Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J.: Use of Commercial Luteinizing Hormone and Progesterone Assay Kits in Canine Breeding Management. *International Veterinary Information Service* 2001.
9. Jeffcoate, I.A., Lindsay, F.E.F.: Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journals of Reproduction and Fertility* 1989, 39, 277-287.
10. Bouchard, G.F., Solorzano, N., Concannon, P.W., Youngquist, R.S., Bierschwall, C.J.: Determination of ovulation time in the bitches based on Teasing, Vaginal Cytology, and Elisa for progesterone. *Theriogenology* 1991, 35(3), 603-611.
11. England, G.C.W: ELISA determination of whole blood and plasma progestogen concentrations in bitches. *Veterinary Record* 1991, 129, 221-222.
12. England, G.C.V., Allen, W.E., Porter, D.J.: A comparison of radioimmunassay with quantitative and qualitative- enzymelinked immunoassay for plasma progestogen detection in bitches. *The veterinary Record* 1989, 125, 107-108.



13. Hospes, R., Richter, B.R., Riesenbeck, A., Bostedt, H.: Untersuchung zur Zuverlässigkeit handelsüblicher Progesteron-Schnelltests in der gynakologischen Diagnostik beim Hund. Tierarztl Prax 2004, 32(K), 247-51.
14. Haafte, B., Dieleman, S.J., Okkens, A.C., Willemse, A.H.: Timing the mating of dogs on the basis of blood progesterone concentrations. Veterinary Record 1989, 125, 524-526.
15. Fay, J., Mezo, T., Solti, L., Wolfgang, Anna, Abonyi-Toth, Zs.: Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch. Acta Veterinaria Hungarica 2003, 51(3), 385-394.
16. Badinand, F., Fontbonne, A., Maurel, M.C., Siliart, B.: Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. Journals of Reproduction and Fertility 1993, 47, 63-67.
17. Forsberg, M., Linde-Forsberg, C., Karlsson, Å., Carlsson, M.-A.: Progesterone and oestradiol in canine plasma monitored by enhanced luminescence immunoassays. Journals of Reproduction and fertility 1993, 47, 127-132.
18. Wright, P.J.: Application of cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. Journal of small animal practice 1990, 31, 335-340.
19. Mestre, J., Wanke, M., Sucheyre, S.: Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 during oestrus in the bitch. Journal of Small Animal Practice 1990, 31, 568-570.
20. England, G.C.V.: Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. Journal of Small Animal Practice 1992, 33, 577-582.
21. Cowell R.L., Tyler, R.D., Meinkoth, J.H.: Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat, secons edition
22. Linde,C., Karlsson, I.: The correlation between the cytology og the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. Journal of Small Anomal Practice 1984, 25, 77-82.
23. [www.home.clara.net/sisa/correl.htm](http://www.home.clara.net/sisa/correl.htm).
24. Instruktionsvejledning for Target®.
25. Instruktionsvejledning for Hormonost®.
26. Kutzler, M.A., Mohammed, H.O., Lamb, S.V., Meyers-Wallen, V.N.: Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. Theriogenology 60 2003, 1187-1196.
27. [www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/Epidemiological\\_analysis\\_software.htm](http://www.vetschools.co.uk/EpiVetNet/Epidemiological_analysis_software.htm)

## Bilag 1, Målinger og observationer.

Tæver	Østrustidsp.	Target	Hormonost	Chemilunesc	Vaginoskopi	Cytologi
1	0-1 ng/ml	+	+	1,0	+ (1)	40
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	-(C3 ) +	+	6,1 8,3 (dag 10)	+ (2) + (3)	70 80
2	0-1 ng/ml	+	+	0,6	+ (1)	40
	1-5 ng/ml	- (C1)	+	3,2	+ (2)	90
	5-10 ng/ml					
	Over 10 ng	+	+	10,9(dag 13)	+ (3)	90
3	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml					
	Over 10 ng	+	+	10,9(dag 9)	+ (3)	85
4	0-1 ng/ml	+	+	0,75	+ (1)	82
	1-5 ng/ml	- (C1)	+	2,9	+ (2)	82
	5-10 ng/ml	- (C3)	+	7,2(dag 12)	- (3)	100
5	0-1 ng/ml	+	+	1,0	+ (1)	50
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	+	+	9,4(dag 11)	+ (3)	80
6	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	- (C3)	+	7,8(dag 11)	+ (2)	74
	Over 10ng	+	+	12,8(dag 12)	+ (3)	90
7	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	- (C3)	+	7,8(dag 8)	+ (2)	80
8	0-1 ng/ml	+	+	1	-	60
	1-5 ng/ml	- (C1)	+	2,5	-	70
	5-10 ng/ml	+	+	5,1(dag 12)	-	82
9	0-1 ng/ml	+	+	0,95	+ (1)	59
	1-5 ng/ml	+	+	3,2	+ (2)	60
	5-10 ng/ml	-( C3)	+	7,6(dag 12)	- (3)	60
10	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml	+	+	4,3	+ (2)	75
	5-10 ng/ml	+	+	8,5(dag 9)	+ (3)	90
11	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml	- (C1) +	+	3,2 3,4	+ (2) + (2)	80
	5-10 ng/ml	- (C3)	+	6(dag 10)	+ (2)	100
12	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml	- (C1)	- (st1)	1,7	+ (1)	46

		+	+	3,4	+(2)	54
	5-10 ng/ml	-(C3)	+	5,5(dag 11)	+(2)	70
13	0-1 ng/ml	+	+	1,0	+(1)	77
	1-5 ng/ml	-(C1)	-(st1)	1,9	+(2)	95
	5-10 ng/ml	-(C3)	+	5,2(dag 12)	+(2)	100
14	0-1 ng/ml	+	+	0,6	+(1)	67
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	+	+	8,9(dag 14)	+(3)	90
15	0-1 ng/ml	+	+	0,65	+(1)	41
	1-5 ng/ml	+	+	3	+(2)	72
	5-10 ng/ml	-(C3)	+	6(dag 15)	+(2)	85
16	0-1 ng/ml	+	+	1,0(dag 13)	+(1)	88
	1-5 ng/ml	-(C1)	-(st 1)	1,6(dag 16)	+(1)	90
		+	+	3,5(dag 20)	+(2)	90
	5-10 ng/ml	+	+	6,5(dag 22)	+(2)	95
17	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	+	+	8,6(dag 10)	-	98
18	0-1 ng/ml	+	+	0,9	+(1)	67
	1-5 ng/ml	-(C1)	-(st1)	1,6	+(2)	92
		+	+	3,1	+(2)	92
	5-10 ng/ml	+	+	7,9(dag 13)	-(3)	95
19	0-1 ng/ml	+	+	0,9	+(1)	82
	1-5 ng/ml					
	5-10 ng/ml	+	+	6,4( dag 10)	+(2)	95
20	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml	-(C1)	+	2	+(2)	32
	5-10 ng/ml	+	+	9,7(dag 11)	+(3)	77
21	0-1 ng/ml	+	+	0,3	+(1)	90
	1-5 ng/ml	+	+	3,7	+(2)	100
	5-10 ng/ml					
	Over 10ng	+	+	12,0(dag 14)	+(3)	100
22	0-1 ng/ml					
	1-5 ng/ml	+	+	2	+(2)	95
		+	+	4,9	+(2)	100
	5-10 ng/ml					
	Over 10 ng	+	+	11,9(dag 12)	+(3)	100
23	0-1 ng/ml	+	+	0,67	+(2)	78
	1-5 ng/ml	+	+	3,5	+(2)	89
	5-10 ng/ml					
	Over 10ng	+	+	8,7(dag 15)	+(3)	95