



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Ägglossningstest för kvinnor

*En möjlig metod att detektera LH-toppen vid
ägglossning hos nöt och hund?*

Petra Lindvall

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:53*

Ägglossningstest för kvinnor
*En möjlig metod att detektera LH-toppen vid
ägglossning hos nöt och hund?*

Petra Lindvall

*Handledare: Renée Båge, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Bodil Ström Holst, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239 Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: Ägglossning, LH, artificiell insemination, ko, tik
Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:53*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
SUMMARY	3
INLEDNING	4
LITTERATURÖVERSIKT	5
Kons östralcykel	5
Hundens östralcykel.....	7
Könshormoner	9
Olika testmetoder för bestämning av betäckningstidpunkt.....	10
Nöt	10
• Visuell kontroll.....	10
• Pedometer.....	10
• Upphoppsdetektorer	10
• Hormonprover	10
Hund.....	11
• Vaginalcytologi.....	11
• Serumprogesteron	11
• LH	11
METOD OCH MATERIAL	12
Nötförsök	12
Djurgruppen.....	12
Analys av urinprov med LH-stickor	12
Hundförsök	14
Analys av urinprov med LH-stickor	14

Gemensamma tester	14
Analys av LH i blod.....	14
RESULTAT	16
Nötförsök	16
Hundförsök	18
DISKUSSION.....	20
SLUTSATSER.....	21
LITTERATURFÖRTECKNING.....	22

SAMMANFATTNING

Den preovulatoriska toppen av luteiniserande hormon (LH) är starkare korrelerad till ägglossning än många andra parametrar som kan användas till att bestämma lämplig tidpunkt för parning respektive inseminering hos de flesta djur. Med en bestämning av detta hormon skulle man därför kunna uppnå ett gott dräktighetsresultat. I denna studie ville vi se om man kan använda sig av ett befintligt, billigt och enkelt test, utvecklade för humant bruk, för att mäta LH hos tik och nöt. Till studien användes ägglossningstest för kvinnor som används till att mäta LH i urinen. I försöket användes 4 kvigor och 4 tikar. Urin samlades under den period då man kunde förvänta sig att LH skulle kunna finnas närvarande i urinen. Man samlade även in blodprover under samma period, och kontrollerade LH i serum för se om en frisättning skett. Positiva utslag på stickor erhöles hos både tik och kvigor men dessa utslag kunde inte starkt korreleras till LH:s frisättning. LH-stickor för humanbruk avsedda för urin kan inte användas för att detektera preovulatorisk LH-frisättning hos vare sig tik eller nöt.

SUMMARY

Preovulatory rise in luteinizing hormone (LH) is more strongly correlated to ovulation than many other parameters used to determine when to mate or inseminate most animals. If able to determine this hormone you would be able to get a better conception rate. In this study we wanted to see if a simple, cheap and already existing test developed for human use could be used in bitches and heifers for detection of LH. We used ovulation tests made for detection of LH in urine of women. In the trial there were four heifers and four bitches. Urine was sampled from these animals during the period when LH could be expected to be released. During the same period, blood was collected from these animals. The serum samples were used to study if LH release had occurred. The test gave positive results in both bitch and heifers but none of the results could be strongly correlated to the preovulatory release of LH. LH test sticks for human urine testing could not be used to detect preovulatory LH release in either bitches or heifers.

INLEDNING

Hos dagens mjölkkor, där man satsar på att få en ökad produktion, ser man över hela världen en trend med sjunkande fertilitet (Lucy, 2000; Royal, 2000). Det är viktigt för bonden att hondjuren är fruktsamma och blir dräktiga inom förväntat intervall, då det är dyrt att ha ett djur som inte blir dräktigt vid önskad tidpunkt. Orsaken till sjunkande fertilitet anses vara multifaktoriell, och förutom det ofördelaktiga genetiska samband som finns mellan mjölkproduktion och reproduktion, beror den låga fruktsamheten i många fall på dålig brunstpassning men framför allt på faktorer hos djuren som gör det svårare att upptäcka brunst (Stevensson, 1983) . Därmed är det svårt att få djuren inseminerade vid rätt tidpunkt. Det finns studier som visar på att dagens generella rekommendationer om tidpunkt för insemination enligt ”förmiddags-/eftermiddagsregeln”, dvs. om kon visar brunst på förmiddagen ska hon insemineras på eftermiddagen, alternativt om hon visar brunst på eftermiddagen ska hon insemineras följande förmiddag, inte ger det mest optimala dräktighetsresultatet (Dransfield et al., 1998; Roelofs et al., 2005).

De flesta bönder använder sig idag av visuell kontroll av brunstsymptom som är ett subjektivt sätt att avgöra om kon är i rätt stadium av brunsten. Dessutom varierar tidpunkten för ovulation i förhållande till insättande av brunstsymptom mycket hos varje individ (Roelofs et al., 2005). Ett mer objektivet sätt att fastställa när ovulation skall ske, som skulle kunna ge ett bättre dräktighetsresultat, skulle därför vara önskvärt. Om det dessutom kan utföras av bonden och är billigt är det bara till fördel.

Till skillnad från många andra djurslag har hunden en mycket lång löpning, ofta mer än två veckor, och optimal tidpunkt för parning varierar kraftigt mellan tikar. Hundägaren som vill para sin tik kan idag få hjälp med att hitta en bra tidpunkt för parning/insemination genom vaginalcytologi, säkrast i kombination med blodprov för progesteronanalys. För detta krävs minst ett besök hos en veterinär. Ett annat mer osäkert sätt är att använda sig av hanhund för att se om tiken ställer upp sig. En del tikar kan verka villiga men om man skulle låta hunden para skulle hon avvisa honom. Många gånger har man inte heller tillgång till en hanhund som fungerar som teaser (Lagerstedt, 2004).

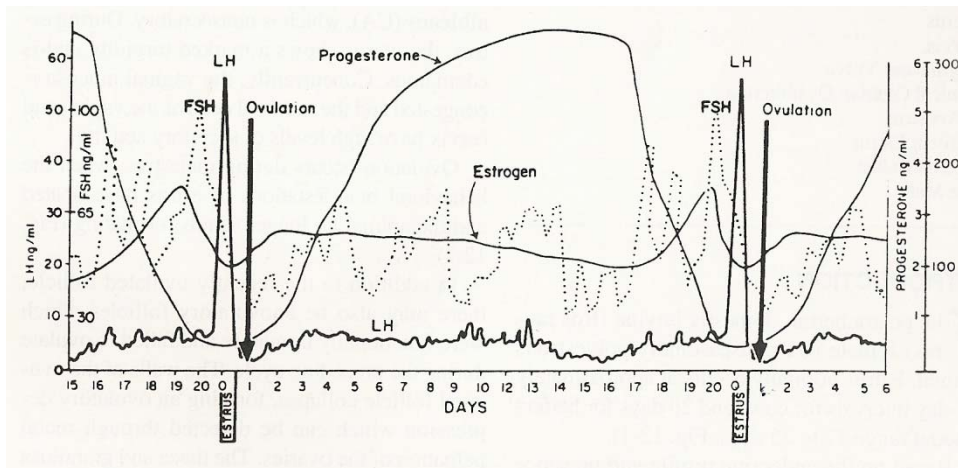
Denna studie syftar till att se om ägglossningstest för kvinnor skulle kunna fungera på två utav våra tamdjur, hund och nötkreatur. Testet mäter humant LH (luteiniserande hormon) i urin och tar bara några minuter att utföra samt är mycket billigt om man jämför med ett veterinärbesök. I början av östrus sker en massiv frisättning av LH (den så kallade preovulatoriska LH-toppen) från hypofysen, vilket framkallar ägglossning ca ett dygn senare. LH-toppen är starkare korrelerat till tidpunkten för ovulation än vad östrusbeteende är hos både nöt och hund och är ett objektivet sett att avgöra om tiden för AI/parning är rätt.(Bernard et al., 1983; Reynaud, 2006)

LITTERATURÖVERSIKT

Kons östralcykel

Östralcykel hos kor är i genomsnitt 21 dagar och hos kvigor runt 20 dagar (McDonald's, 2003). Cykeln kan delas in i proöstrus (förbrunst), östrus (högbrunst), metöstrus (efterbrunst) och diöstrus (lutealfas).

Folliklar i äggstockarna växer till och tillbakabildas kontinuerligt under östralcykeln. Kor har 2 eller 3 follikelvågor under varje cykel. Under varje våg finns det en dominant follikel. De första dominanta folliklarna ovulerar inte pga. den samtida höga progesteronproduktionen från gulkroppen. Folliklarna producerar östradiol som har en positiv feedback på hypotalamus och dess frisättning av GnRH (gonadotropin-releasing hormone). GnRH påverkar hypofysen att producera och frisätta FSH och LH. LH frisätts under hela cykeln på en pulsatil men låg nivå tills dessa att progesteron (som utövar negativ feedback på hypotalamus GnRH-produktion) börjar sjunka (pga. luteolys av CL, corpus luteum) och östradiol (producerat av den tillväxande dominanta follikeln) börjar öka (McDonald's, 2003). När östradiol når ett tröskelvärde frisätts en topp av FSH och LH vilket leder till den slutliga mognaden av follikeln och slutligen ovulation (Senger, 2003). Den preovulatoriska toppen av LH sker under en period av ca 10 timmar och samtidigt eller några timmar efter denna inträffar ståbrunst. Ovulationen sker ca 27 h från start av LH-toppen eller 17 h från slutet av LH-toppen (Bernard et al., 1983).



Figur 1. Hormoner under kons östralcykel. Från McDonald's 2003

Under proöstrus stiger halterna av östrogen i blodet efter att CL har tillbakabildats och progesteronhalterna har sjunkit. Djuret börjar visa fysiska och psykiska brunstecken pga. av de stigande östrogenhalterna men är ännu ej mottagligt för parning. Proöstrus varar ca 24 timmar med en variation på några timmar till 3 dagar (McDonald's, 2003; Institutionen för obstetrik och gynekologi (OG), 2004).

Östrus är perioden då djuret är mottagligt för parning. Perioden varar ca 24 timmar (kan variera mellan 7 och 27 timmar) (OG, 2004). Ovulation av den mogna follikeln sker efter östrus slut och i samband med det sjunker östrogen och en ny CL börjar bildas utifrån den ovulerade follikeln.

Metöstrus är övergången från östrus med ovulation tills dess att CL är helt utvecklad. Denna fas kan anses ingå i diöstrus.

Under diöstrus är CL helt utvecklad, aktiv och producerar progesteron. Perioden varar i ca 14 dagar. Om befruktning ej sker och signal för "maternal recognition of pregnancy" ej etableras leder detta till en pulsatil frisättning av prostaglandin F_{2α} från uterus endometrium vilket når CL. CL blir inaktiverad och så småningom tillbakabildas även strukturen. En ny proöstrus-period tar vid (McDonald's, 2003; OG, 2004).

Hundens östralcykel

Hundens östralcykel kan delas in i proöstrus (förlöpning), östrus (höglöpning), diöstrus (efterlöpning, lutealfas) och anöstrus (vilofas). Tiken löper i genomsnitt var 7:e månad men detta kan variera mellan 4 och 12 månader. Variationen är delvis rasberoende, men varierar även mellan individer av samma ras (McDonald's, 2003). Bestämning av de olika stadierna i östralcykeln kan göras på flera sätt. Det djurägarna själva använder sig av är tikens beteende och de fysiska förändringarna. För en mer exakt bestämning t.ex. inför parning kan veterinären studera vaginalcytologi. Det säkraste sättet att bestämma optimal parningstidpunkt är att bestämma progesteronhalterna i blod (Lagerstedt, 2004).

Proöstrus börjar den dag som man först ser blödning från vulva. Under denna period ändrar tiken beteende och hon blir mer orolig och rastlös samt kan få förändrad aptit, törst och urinering. Vulva svullnar mer eller mindre. Hundar blir under denna period intresserade av tiken men hon står vanligen inte för upphopp. I genomsnitt varar proöstrus i 9 dagar med variation på 2-15 dagar (McDonald's, 2003). Vaginalcytologiskt ses under denna period en blandad cellbild. Tidigt i proöstrus ser man parabasceller och intermediärceller. Senare övergår bilden till att innehålla intermediärceller och ett ökande antal superficialceller. Erythrocyter förekommer i måttlig-riklig mängd och vissa leukocyter samt bakterier (Feldman & Nelson, 2004). Under denna period bildas folliklar som producerar östradiol i äggstockarna. Östradiol når maximala blodnivåer 1-2 dygn före slutet av proöstrus för att sedan börja sjunka. Samtidigt börjar koncentrationen i blodet av progesteron, som bildas från folliklarna redan före ovulation och bildning av CL, att stiga. Detta leder till att tiken börjar visa höglöpningens beteende samt att en positiv feedback går till hypotalamus och hypofysen. Det senare ger en frisättning av GnRH och med den frisättning av FSH men framför allt LH (Feldman & Nelson, 2004). LH- toppen hos tik är mycket mer utdragen än hos många andra tamdjur (24-40h) (Concannon et al., 1977). Hos de flesta tikar ligger den i sen proöstrus men hos vissa i tidig östrus (McDonald's, 2003). Progesteronnivåerna i blod ligger vid tiden för LH-toppen enligt olika undersökningar på $2,9 \pm 0,2$ nmol/L (Hase, 2000) eller $8,1 \pm 1,0$ nmol/L (Concannon et al., 1977).

Östrus räknas oftast från och med den första dagen som tiken står för hund. Detta tillstånd varar i genomsnitt 10 dagar men varierar mellan 3 och 12 dagar. Vulva är mindre svullen och något mjukare än tidigare. Vaginalflytningen blir vanligen mer vattnig och lite gulaktig (McDonald's, 2003). Vaginalcytologiskt ses en typisk bild med upp emot 100 % superficialceller som ligger glest initialt för att senare ligga i tjocka lager. Viss förekomst av erythrocyter kan ses men leukocyter skall ej finnas. Östradiol fortsätter att sjunka för att nå en basalnivå i diöstrus (Feldman & Nelson, 2004). Ovulation som sker nu, i genomsnitt 38 h (24-48h) efter LH-toppen (Hase, 2000) kan pågå i ett dygn. Progesteronnivåerna ligger vid ovulationen på $15,9-22,3$ nmol/L (Reynard et al., 2006) men enligt Hase et al. (2000) på $6,0-8,9$ nmol/L (efter UL-undersökning) och $6,7-12,9$ nmol/L beräknat utifrån antagandet att ägglossning sker två dagar efter LH-toppen. Efter ägglossningen börjar CL att bildas och progesteronnivåerna fortsätter att stiga. Hundar ovulerar primära oocyter till skillnad mot de flesta andra däggdjur. Oocyterna måste därför genomgå meios innan de är befruktningssugliga vilket tar mellan 2-4 dygn. Äggen är sedan befruktningssugliga i 1-3 dygn. Under den här

tiden skall hundens sperma transporteras, vilket går under minuten, till äggledaren. Det ska även ske en kapacitering av spermerna, för att de ska kunna penetrera äggen, vilken tar ca 7 timmar. Efter det har spermerna en relativ lång överlevnad och de har visats kunna vara fertila i 6-7 dygn efter parning.

I diöstrus refuserar tiken hunden. Vulva återgår till normal anöstral storlek. CL har nu nått full storlek och är fullt funktionell. Perioden varar i genomsnitt 65 dagar men varierar mellan 55 och 90 dagar (McDonald's, 2003). Under den första tiden av diöstrus ses igen en blandad cellbild vid vaginalcytologi med intermediärceller och parabasalceller. Vanligen ses ej några erythrocyter men ofta en bild med leukocyter och skumceller (degenererade epitelceller med vakuoler i cytoplasma) (Feldman & Nelson, 2004). Progesteronet når sin maximala topp och planar sakta ut under denna period och diöstrus övergår till anöstrus då progesteronnivån ligger på basalnivå. CL är aktiv något längre hos den icke dräktiga tiken än hos den dräktiga. Vad som slutligen orsakar luteolys hos tik är oklart. Östradiol, FSH och LH ligger lågt. Alla hundar genomgår en fas av skendräktighet med mer eller mindre tydliga tecken. Detta för att progesteron fortfarande är högt under denna period precis som om hon hade varit dräktig. Man kan se beteendeförändringar men även fysiska förändringar som liknar en verklig dräktighet med svullna juver och ibland även en svullen buk (Lagerstedt, 2004; McDonald's, 2003).

Anöstrus följer diöstrus när progesteron har nått basalnivå och är en sexuellt inaktiv period hos tiken. Variationen i längd är stor, i genomsnitt 120 dagar med normala variationer mellan 40 och 270 dagar. Variationer beror på ålder, ras, hälsa m.m.(McDonald's, 2003). Vaginalcytologin är, liksom i slutet av diöstrus, mycket cellfattig. Lösa cellkärnor förekommer, samt fåtalet parabasalceller och leukocyter. FSH stiger under slutet av anöstrus för att åter sjunka när tiken går in i proöstrus. LH fluktuerar under denna period likaså östradiol som produceras från små folliklar (Feldman & Nelson, 2004).

Könshormoner

Det finns många sätt att dela in de olika könshormonerna t.ex. efter uppbyggnad eller deras ursprung.

- GnRH är ett litet peptidhormon som produceras av neuroner i hypotalamus. Via ett portasystem leder det till frisättning av hormonerna FSH och LH, de s.k. gonadotropinerna, från hypofysens framlob. Dessa hormoner frisätts i blodet från hypofysen för att nå sina målorgan gonaderna (äggstockarna) (Senger, 2003).
- Hormonerna LH och FSH, som produceras i hypofysens framlob är glykoproteiner (polypeptidkedjor med kolhydratmolekyler) som består av en alfa- och en betaenhet. Alfaenheten är densamma för dessa hormon (inklusive TSH, tyreoidestimulerande hormon, som också produceras i hypofysen) och ser likadan ut mellan arter. Betaenheten är däremot olika för varje hormon och är den del som ger dessa hormon deras specificitet och funktion. LH främjar ovulation och bildning av CL via påverkan på äggstockarnas theca interna- och lutealceller. FSH påverkar äggstockarnas granulosaaceller till follikeltillväxt (Senger, 2003).
- Steroidhormonerna, såsom progesteron och östrogen, syntetiseras från kolesterol enligt Senger (2003) genom ett komplext system av enzymatisk konvertering:

Kolesterol → Pregnenolon → Progesteron → Testosteron → Östradiol

Östradiol produceras av granulosaacellerna i äggstocksfollikeln. Det verkar både med positiv och negativ feedback på hypotalamus och dess GnRH sekretion (Senger, 2003). Det påverkar det sexuella beteendet så att djuret blir parningsvilligt och förbereder genitalia för parning och fertilisering samt uterus vid förlossning. Östradiol bidrar också till utveckling av mjölkkörtlar (Sjaastad et al, 2003) .

Progesteron produceras framför allt av CL men även placenta och binjurar (Feldman & Nelson, 2004). Det inhiberar sekretion av GnRH och hormonet verkar på uterus för att bevara dräktigheten och skapa en bra miljö för fostret. Det påverkar även mjölkkörtlar vid dräktighet (Senger, 2003).

- Prostaglandin är derivat från fettsyror (främst arakidonsyra) och frisätts från uterus endometrium och verkar luteolytiskt på CL hos de flesta djur (Senger, 2003). Hos tik har man dock sett att även om livmodern tas bort fortsätter hon att cykla normalt utan förlängd lutealfas (McDonald's, 2003). Hos kor når prostaglandin äggstocken via kärlekomples med motströmsprincip vilket snabbt ger hög koncentration till CL Senger, 2003).

Olika testmetoder för bestämning av betäckningstidpunkt

Nöt

- **Visuell kontroll**

Det vanligaste och billigaste sättet att detektera brunstbeteende på djur som går i lösdrift eller på bete är genom visuell kontroll av beteende så som upphopp på annat djur, står för upphopp och oroligt beteende med mera. Andra visuella iakttagelser för att detektera brunst är utseende på yttre könsdelar och brunstflytningarna. Det krävs ett gott djuröga och goda rutiner för brunstpassningen för att få ett gott dräktighetsresultat med denna metod.

- **Pedometer**

Detta är ett hjälpmedel som är framtaget för att upptäcka den ökade aktivitet som sammanfaller med brunst. När djuren kommer i brunst ser man en ökad aktivitet vilken registreras. Det innebär en kostnad att investera i utrustningen som krävs för denna metod.

- **Upphoppdetektorer**

Detta är en metod då djuren förses med en utrustning som reagerar på tryck då det brunstiga djuret står för upphopp. Det finns billig, enkel utrustning som klistras på kons svansrot och ger färgomslag då andra kor gör upphopp, antingen pga. att färg gnuggas fram eller att en färgampull krossas. Det finns också dyrare, elektroniska sensorer som ger utslag vid upphopp. Sensorn skickar data till en mottagare som man avläser.

- **Hormonprover**

Detta används främst som ett hjälpmedel då man har problem med att få djuren dräktiga. Då kan man med hjälp av progesteron i mjölk eller blod avgöra om de är i brunst men t.ex. inte visar brunstsymptom. LH går även att mäta i serum men det är inte en vedertagen metod för detektion av ägglossning i dagsläget. Analysen görs inte rutinmässigt i Sverige, och det är inte praktiskt möjligt att få analysvaret i tid för att få besked om det är korrekt tid för insemination eller ej.

Hund

- **Vaginalcytologi**

Provtagning sker med en lång bomullspinne samt ett spekulum. Pinnen rullas mot vaginans vägg och cellerna överförs sedan till objektglas och kan färgas i för att lättare kunna studeras i mikroskop. Metoden används för att se om tiken är i proöstrus, östrus eller diöstrus. Vid höglöpning och full östrogenpåverkan av epitelcellerna i vaginan får man en bild med mer än 80 % superficialceller. Det finns en viss tidsförskjutning mellan östrogennivån i blodet och förhorningen av vaginalcellerna (Linde & Karlsson, 1984). Ägglossning sker i normalfallet under perioden då man ser flest superficialceller. Vaginalcytologi används ofta tillsammans med progesteronprov på veterinärkliniker för att få en mer exakt tidpunkt för ägglossning.

- **Serumprogesteron**

Detta är ett vanligt sett att detektera en bra tidpunkt för parning eller insemination hos hund i Sverige. Ofta kan man initiera testningen med vaginalcytologi för att se att progesteronprov är indikerat. Provet skickas oftast till laboratorium för snabb analys till dagen efter. Det finns även semikvantitativa snabbtest som kan vara praktiska t.ex. om man vill testa på helgen. Testet utförs ofta flera gånger till dess att provresultatet visar att parning respektive inseminering är indikerat. Nackdelen är att det måste till minst en blodprovstagning och ett veterinärbesök.

- **LH**

Det finns LH-tester redan idag att använda men de baserar sig fortfarande på analys av serum och kräver således besök hos veterinär för att utföra. Med LH-DETECT® som användes i försöket, kan man använda sig av mjölk från får och get men testets uppbyggnad i sig gör att det inte lämpar sig väl för att djurägaren enkelt skall utföra testet själv.

METOD OCH MATERIAL

Nötförsök

Djurgruppen

Fyra kvigor deltog i försöket. Dessa ingick under samma period i ett större projekt med doktorand Kristina Nordéus. Kvigorna stod uppstallade på institutionen för kliniska vetenskaper (på avdelningarna för reproduktion och IME) helt isolerade från varandra då huvudförsöket inriktade sig på feromoner (bild 1.). Kvigorna anlände i början av september och sprutades sedan med syntetisk prostaglandinanalogue (Estrumat® vet, Schering-Plough AB, Stockholm, Sverige) två gånger med 11 dagars mellanrum för att synkronisera deras brunst. Detta gjordes med anledning av huvudförsöket. Kristina följde sedan kvigorna kontinuerligt genom brunstpassning, blodprovstagningar och studier av follikeldynamiken med hjälp av rektalt ultraljud. Under perioden från och med att kvigorna kom i brunst fram till ovulation togs blodprover under varannan timme och var fjärde timme undersöktes äggstockarna med ultraljud. Plasma separerades och förvarades i -18°C för att analyseras vid senare tillfälle.

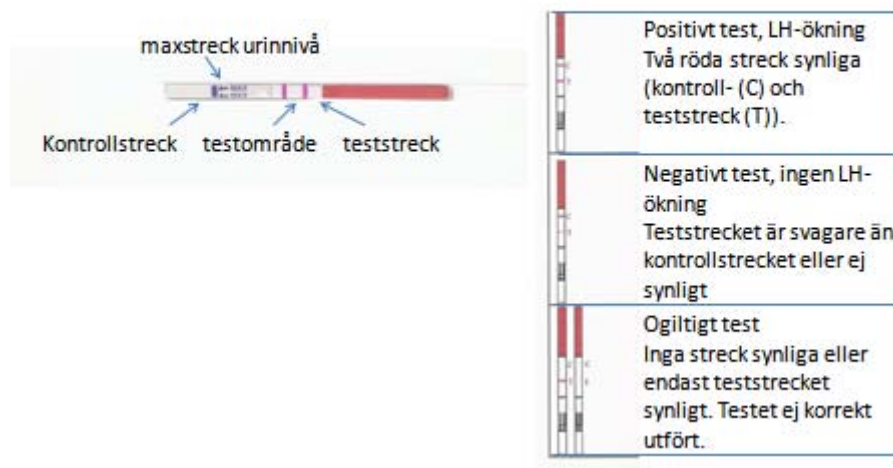


Bild1. En av kvigorna som deltog i försöket

Analys av urinprov med LH-stickor

Från och med andra brunstcykeln samlades urinprover från det att kvigorna började närma sig brunst. Samlingen gjordes var fjärde timme dygnet runt tills ägglossning konstaterats. I ett fall togs det ytterligare några prover efter ägglossningen.

Spontankastad urin samlades genom mekanisk stimulering av blygden och klitoris med handskbeklädd hand. Proverna samlades i burkar för att sedan hällas över i rör som togs med in på laboratoriet där själva provet utfördes. Testet utfördes inom en timme efter att urinen hade samlats in. Ägglossningstestet som användes var av märket Chemtrue™, Shanghai Chemtron Biotech Co., Shanghai, Kina. Stickkan har en sensitivitet för LH på 20 mIU/ml och är ett av de känsligare testen på marknaden. Teststickan doppas ner i urinen till en markerad nivå, i ca 15-20 sekunder och avläses sedan efter 5 minuter. Testresultatet avläses enligt bild nedan (fig.1). Om testresultatet var otydligt eller positivt gjordes testet om med ytterligare en remsa för att säkerställa resultatet. Vid positivt utslag användes några test av märket Clearblue (Clearblue Digitalt Ägglossningstest, Unipath Scandinavia AB, Lund, Sverige), ett digitaltest, för att se om resultatet gick att upprepa även med detta test. Detta test har en sensitivitet för LH på 40 mIU/ml. Resterande urin förvarades i -18°C för senare analys. Rören märktes med koddata, datum och tidpunkt för provtagning.



Figur 2. Avläsning av LH-stickor Chemtrue™

Hundförsök

Analys av urinprov med LH-stickor

Fyra stycken friska hundar deltog i försöket, en schäfer, en vorsteh och två beaglar. De hade alla tidigare haft normala löpningar. Djurägaren fick komma in med hunden i början av löpningen. Då togs anamnes och ett vaginalutstryk för att kontrollera hur tiken låg i löpningscykel samt blodprov för att kontrollera progesteronnivån. Progesteron och vaginalutstryk fortsatte att följas tills det att progesteron stigit till 30 nmol/L för att säkerställa att ägglossning skett. Vid den approximativa tidpunkten för LH- topp, då progesteronet börjat stiga var målet att ta blodprov varje dag. Djurägaren fick också till uppgift att vid valfri promenad under dagen samla urin som testades med stickor vid hemkomst. Dock skulle urinsamlingen göras med 24 timmars mellanrum i möjligaste mån. Vid positivt eller tveksamma resultat uppmanades djurägaren att upprepa med ytterligare en sticka. Ägglossningstestet som användes var av märket Chemtrue™, Shanghai Chemtron Biotech Co., Shanghai, Kina. Teststickan doppas ner i urinen till en markerad nivå, i ca 15-20 sekunder och avläses sedan efter 5 minuter. Testresultatet avläses enligt bild ovan (fig.2). Urinproven frös ner för vidare testning och serum sparades.



Bild 2. En av beaglarna i försöket

Gemensamma tester

Analys av LH i blod

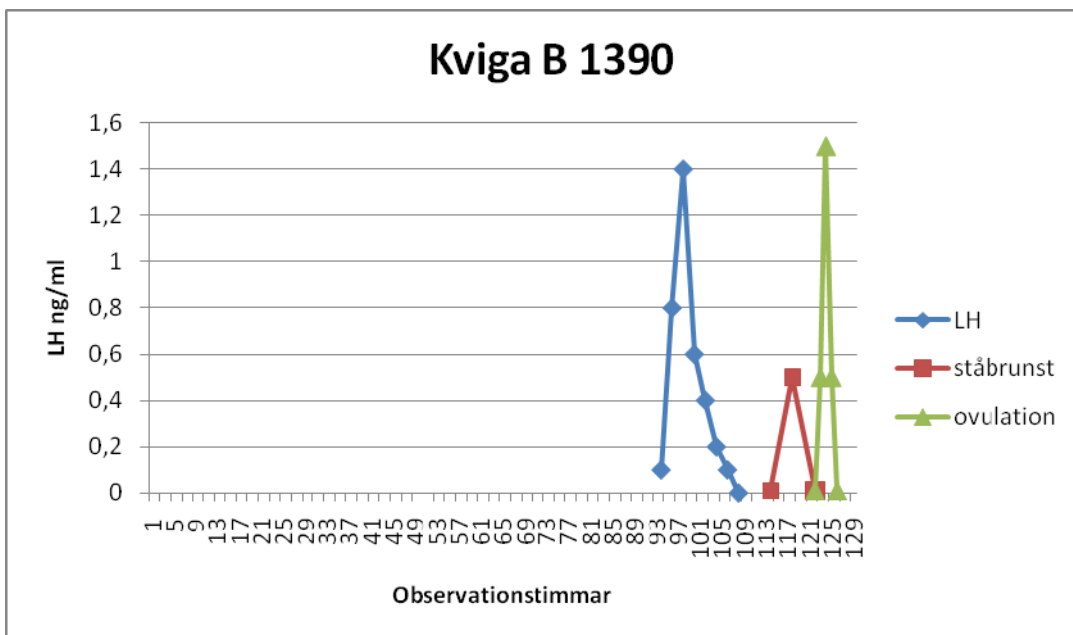
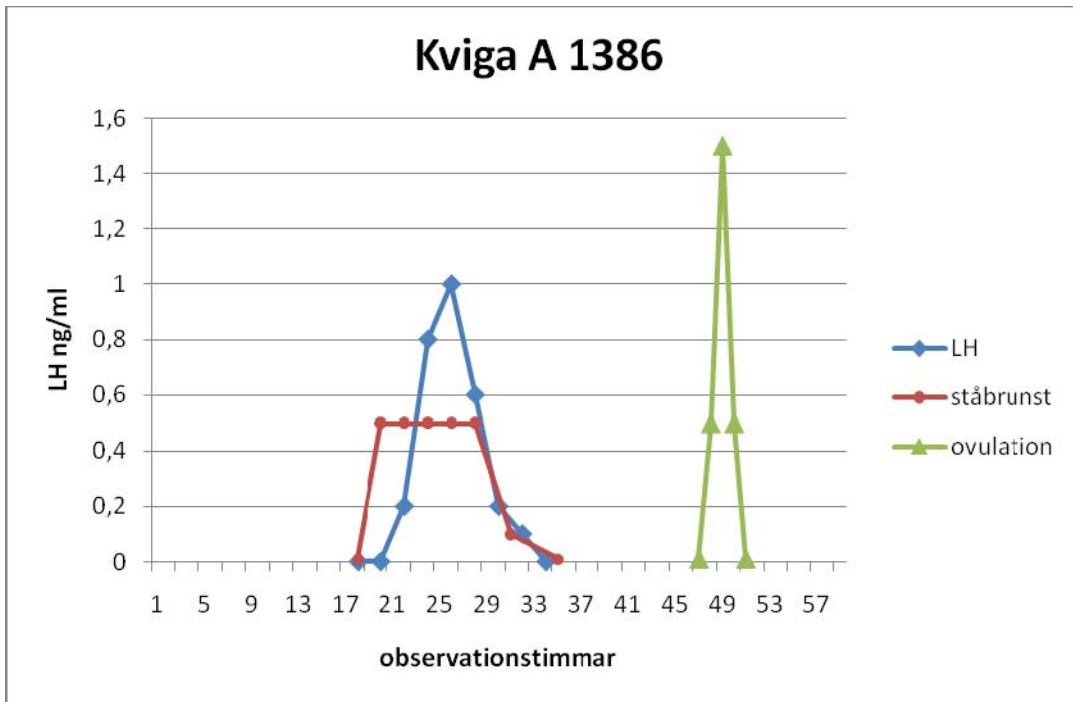
Efter att insamlingen av prover i nöt- och hundförsökets gjorts, valdes ett antal prover ut för att testas med avseende på LH med hjälp av LH-DETECT®, (INRA, Tours, France). Det är ett ELISA sandwich test som är gjort för att detektera och kvantifiera LH i helblod, plasma eller serum samt även i mjölk från får och get. Testet finns i olika utförande för flera djurslag. En mikrohålsplatta är täckt med en anti-LH antikropp. Provet tillförs och om det innehåller LH binder detta till antikroppen. En andra antikropp tillförs som binder in till LH. En tredje antikropp tillförs som är konjugerad med peroxidas. Ett kromogent substrat sätt därefter till för att man ska kunna avläsa den enzymatiska aktiviteten. Färgen jämförs med en skala med standardlösningar. Färgreaktionens intensitet (i detta fall gult) är proportionerlig mot LH-koncentrationen i provet.

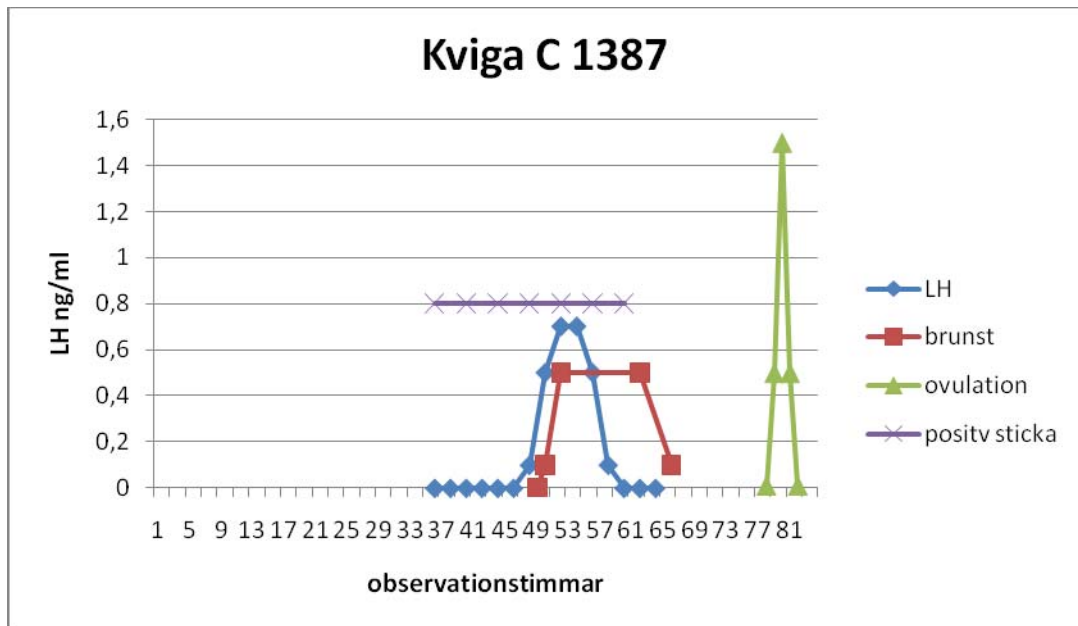
Plasmaprover som förväntades innehålla en LH-topp valdes ut. Från nötförsöket valdes därför prover ut i intervallet 17-24 timmar före ovulation. Alla dessa blodprover, tagna varannan timme, som hamnade inom detta intervall (8-9/kviga) analyserades. I ett fall togs ytterligare några blodprover (6 st.) med från en kviga som testat positiv på LH-stickorna för att se om LH kunde detekteras i blodet även under denna period. Från hundförsöken utgick man ifrån de sedan tidigare kända progesteronvärdena och valde således prover under perioden med progesteronvärden mellan 2-12 nmol/L. Samtidigt som plasmaproverna analyserades gjordes även ett försök att analysera LH i urin med detta test. Till detta valdes urin från en kviga från samma period som serumproverna samt under den period som kvigan hade testat positiv på stickorna i försöket ovan. Från hundförsöket togs urin från hunden där man hade störst sannolikhet att detektera LH i både serum och urin från samma period som serumproverna. Ett urinprov från en annan hund, som hade testat positivt på sticka, togs också med.

RESULTAT

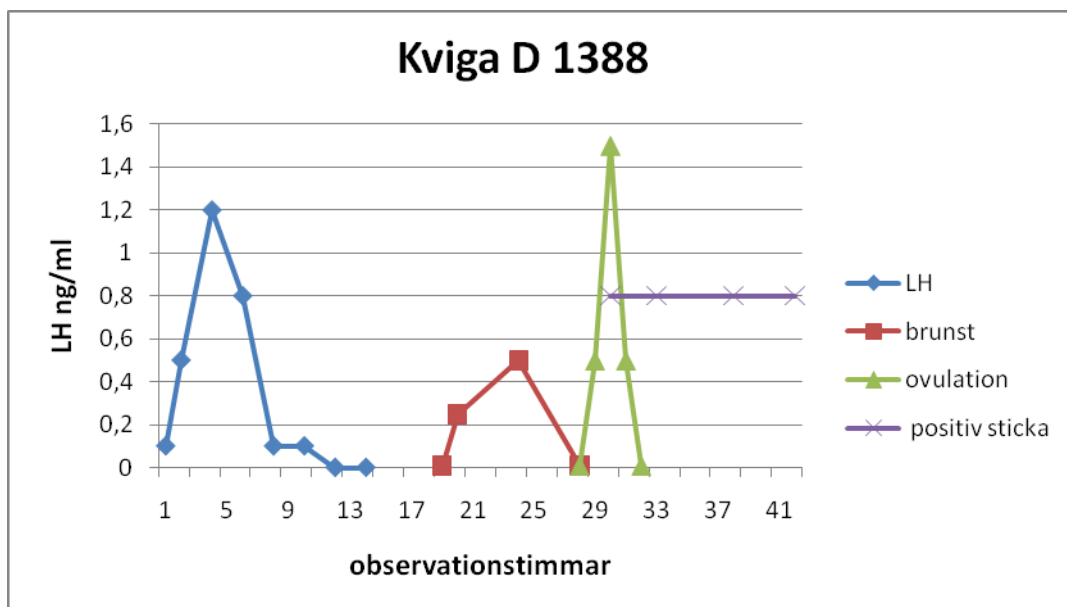
Nötförsök

Kviga A och B uppvisade inga positiva resultat alls från urinstickorna. Kviga B hade dock en något avvikande cykel mot förväntat och ovulerade först på dag 23. Alla djuren hade en detekterbar LH-topp med LH-DETECT® på förväntat intervall från ovulationen (se figurerna nedan).





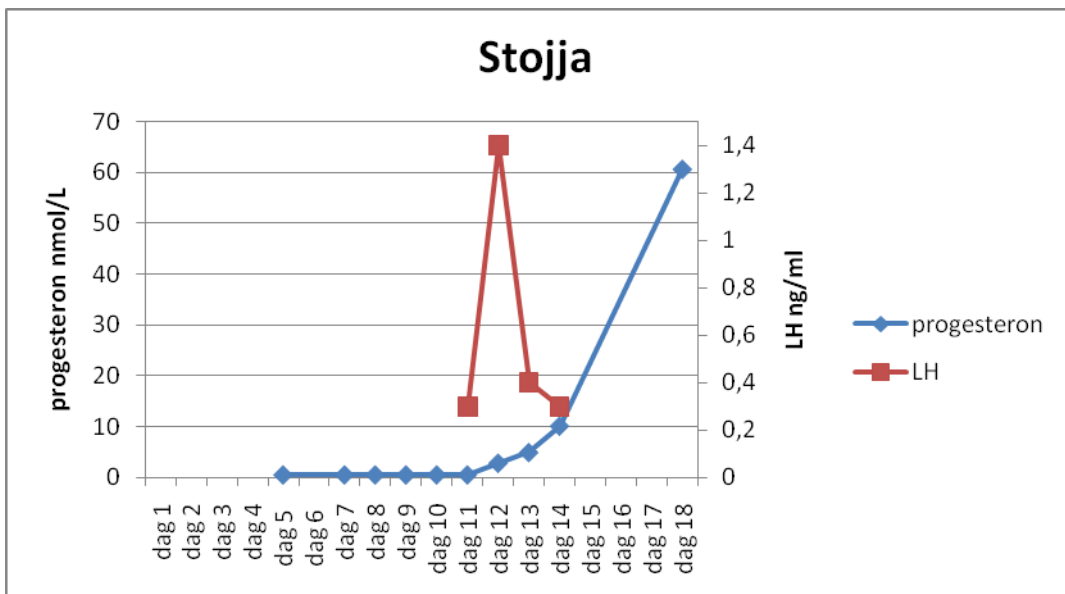
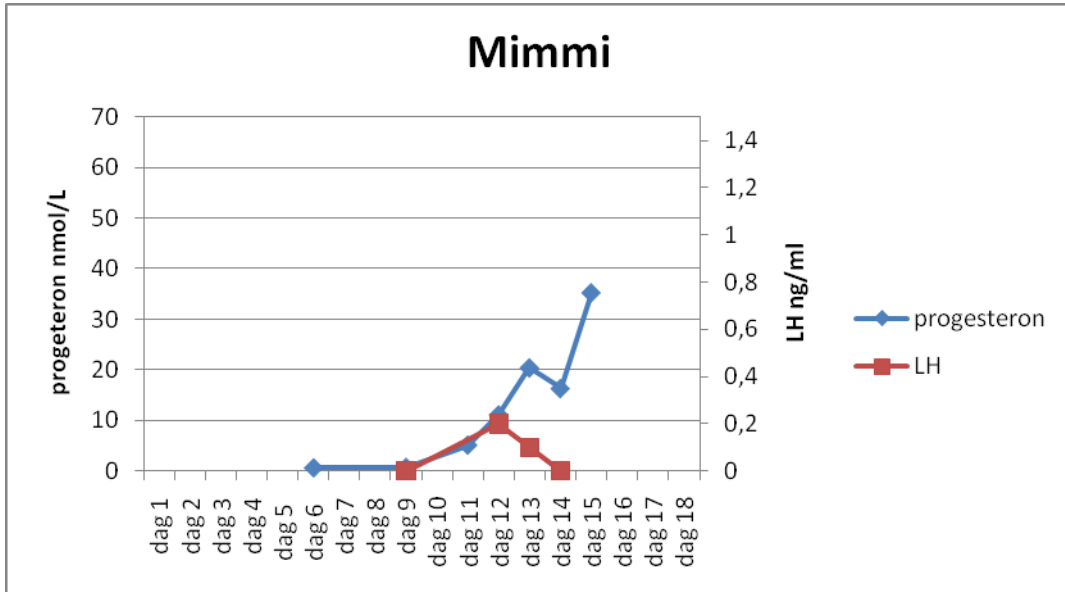
Kviga C testade positivt under 24 timmar på LH-stickor enligt figuren ovan. Vid positivt utslag testades urinen om och samma resultat erhöles. Vid ett tillfälle testades urin med positivt utslag om med ett digitalt LH-test som visade ett negativt utslag. Urin från perioden med positiva LH-stickor testades med LH-DETECT® som inte visade något utslag.



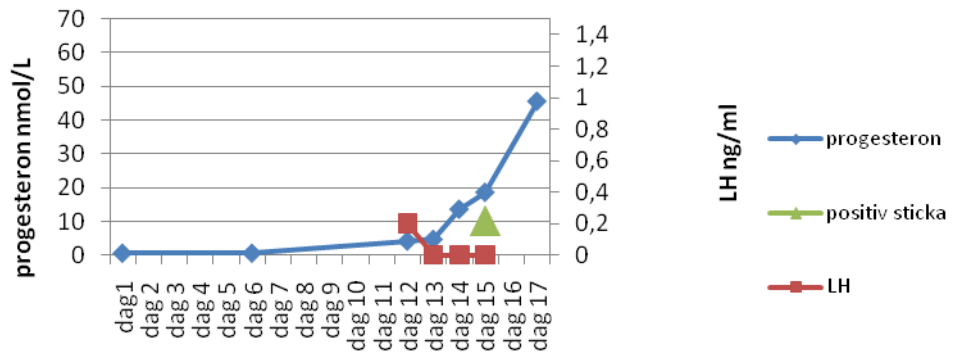
Kviga D var ej så samarbetsvillig så LH-toppen i urin har ej kunnat fångas upp då första urinprovet erhöles vid observationstimme 6. Därefter samlades nästa prov vid observationstimme 19. Hon testade dock positivt vid ovulation och fortsatte därför att provtas några gånger efter denna.

Hundförsök

I hundförsöket finns det bara ett noterat positivt urinprov som ligger några dagar senare än förväntad LH topp. LH-topparna hos tikarna är inte fullt skönjbara utom i ett fall. Den fjärde tiken som ej finns visualiserad med ett diagram hade vid första blodprovstillfället ett progesteronvärde på 18 nmol/L. Dock inleddes försök med urinstickor 3 dagar tidigare än första blodprovet efter bedömning av vaginalcytologi.



Abby



DISKUSSION

Stickorna som använts för urinproverna är framtagna för människor. Flera försök har gjorts för att få fram mer exakt hur dessa stickor är uppbyggda och hur LH binder in. Den närmaste information som erhållits angående detta är via ett telefonsamtal med Clearblues support, att deras test binder in till alfaenheten. Denna information har tillhandahållits efter att alla tester genomförts och tillförlitligheten av denna information är svår att värdera. Man kan tycka att testet borde binda in till beta-enheten eller båda delarna av LH för att undvika korsreaktion med FSH och TSH. Beta-enheten är lite olika mellan species och ju större skillnad mellan arter desto större skillnad på molekylerna. Men om testet bara binder in med alfaenhet blir det en högre risk för korsreaktioner.

De positiva testerna var upprepningsbara med samma tester så det måste finnas någon eller några faktorer som kan påverka testet så att man får ett falskt positivt utslag eftersom de inte sammanfaller med LH-toppen detekterad i blodet. När provet testades med ett digitaltest blev utfallet negativt. De olika testerna kommer från olika tillverkare och kan vara uppbyggda på lite olika sätt men de har även olika sensitivitet. Den manuellt avläsbara stickan från Chemtrue™, har en högre sensitivitet vilket kan förklara resultatet.

Det som inte var klart vid inledningen av provtagningarna var hur snabbt LH skulle kunna detekteras i urin. ”Ganska snabbt” är det enda ledord som funnits med avseende på nöt, Dr. S.E. Recabarren, personligt meddelande. Med utgångspunkt från LH:s halveringstid och att det går att detektera i humanurin borde det dock stämma. Om man ser till humanreferenser är korrelationen mellan LH-toppen i serum och urin god (Corson, 1986). Möjligen skulle en viss fördröjning av LH i urin kontra blod vara tänkbart. Dock har det varit svårt att finna något om hur LH i hundurin utsöndras. Ett möjligt scenario är att LH inte utsöndras i urinen som intakt molekyl utan som en metabolit. Det är en förutsättning att ha information om detta för att kunna utveckla ett urinbaserat test.

I fallet med kviiga C så skulle detta utfall, positivt testresultat under en period på 24 h före ovulationen, kunna motsvara FSH som tidigare nämnts har samma alfaenhet som LH. Om kviiga D verkligen hade en fördröjd utsöndring av LH i urin skulle detta ändå vara ett opraktiskt test då det inte skulle kunna detektera hormonet förrän vid ovulation. Detta är mer än ett halvt dygn försent med tanke på tidpunkt för inseminering.

LH-DETECT® testet är inte utvecklat för urin men vi valde att testa några urinprover för att se om det gick att få något positivt resultat. Så vara inte fallet, men det hade varit önskvärt att testa urinprov med en känd mängd LH i för att verkligen kunna avgöra om detta test fungerar för detta ändamål. Nämnas skall också göras att ett av urinproven för hundarna ej hade förvarats i -18° utan i kyl vilket kan ha påverkat mängden LH i urinen.

Blodproverna på hund borde ha varit flera för att kunna fånga upp LH toppen i blodet. Anledningen till de fåtal proverna beror på flera faktorer bl.a. helger då hundägare inte kunnat komma in med tiken, hund deltagit i undervisning med för

lite blod uttaget för att räkna till både progesteron och LH mm. Likaså kunde man önskat flera vaginalcytologiska prover för att möjliggöra en jämförelse mellan dessa och de analyserade blodproverna. Av samma anledning som ovan kunde inte detta samlas in.

SLUTSATSER

Ett väl fungerande test skall ha god specificitet och sensitivitet. Alltså måste flertalet individer testa positivt vid rätt tillfälle. Detta var inte utfallet i denna studie då vi på hundsidan endast erhöll ett positivt test flera dagar efter LH-toppen i blodet. På nötsidan var det två kvigor som testade positivt, en för tidigt och en för sent i förhållande till LH. De har med stor sannolikhet testat positivt för något annat. Slutsatsen blir därför att ett ägglossningstest utvecklat för kvinnor inte fungerar för vare sig hund eller nötkreatur.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Bernard, C. et al. (1983) Prediction of bovine ovulation by a rapid radioimmunoassay for plasma LH. *J Reprod Fertil* 68, 425-430.
- Concannon, P. et al. (1977) Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 17, 604-613.
- Corson, S.L. (1986) Self-prediction of ovulation using a urinary luteinizing hormone test. *J Reprod Med.* 31(8 Suppl):760-3.
- Dransfield, M.B.G. et al. (1998) Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J Dairy Sci.* 81, 7.
- Feldman, E. C., Nelson, R. W. (2004) *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 3. ed. St.Louise: Saunders
- Hase, M. (2000) Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J Vet Med Sci* 62 (3): 243-248
- Institutionen för obstetrik och gynekologi, (2004 rev. uppl.), Reproduktionsfysiologi, hondjur. Kompendium: *Nötkreaturens reproduktion*, SLU
- Lagerstedt, A_S. (2004) *Hundens fertilitet, fortplantning och könssjukdomar*. Institutionen för kirurgi och medicin, smådjur SLU. Studentlitteratur.
- Linde, C., Karlsson, I. (1984) The correlation between cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J. small Anim. Pract* 25, 77-82.
- Lucy, M. C., Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? (2000). *J Dairy Sci.* 84, 1277-1293.
- McDonald's. (2003) *Veterinary endocrinology and reproduction*. 5. ed. Iowa: Iowa Stat Press.
- Reynaud, K., et al. (2006) In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology* 66, 1685-1693.
- Roelofs, J.B., et al. (2005) Various behavioral signs of estrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 63:5, 1366-1377.
- Royal, M., et al. (2000) Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet J* 160(1), 53-60.
- Senger, P. L. (2003) *Pathways to pregnancy and parturition*. 2. ed. Pullman: Current Conception Inc
- Sjaastad, Ø., et al. (2003) *Physiology of domestic animals*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Stevenson, J.S., et al. (1983) Estrous intensity and conception rates in Holsteins. *J Dairy Sci* 66, 2.