



Diagnostisk användbarhet av vaginalcytologi hos tik

Sara Huber

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet

Uppsala 2023



Diagnostisk användbarhet av vaginalcytologi hos tik

Diagnostic value of vaginal cytology in bitches

Sara Huber

Handledare: **Bodil Ström Holst, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper**

Bitr. handledare: Ida Hallberg, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Inger Lilliehöök, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX1003

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2023

Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: estradiol, vaginalcytologi, östruscykel, pyometra, juvertumör, tik

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Veterinärprogrammet

Sammanfattning

Syftet med detta arbete var att jämföra östradiolkoncentrationer och östradiolpåverkan på vaginal-epitelet hos tikar i olika löpstadier och tikar med sjukdomstillstånden pyometra och juvertumörer, och på så sätt studera användbarheten av vaginalcytologi som diagnostiskt verktyg vid dessa sjukdomstillstånd. Syftet var även att jämföra två olika metoder för att utvärdera vaginalutstryk. Vaginalcytologi fungerar som ett indirekt mått på östradiolkoncentrationen och används normalt sett i kliniken för att bestämma tikens löpcykelstadium. Höga koncentrationer av östradiol får epitelcellslagret i vaginalslemhinnan att proliferera och keratiniseras. Östradiol kan ha en roll i patogenesen för juvertumörer och pyometra men frågan är om östradiolkoncentrationen har ett diagnostiskt och prognostiskt värde i praktiken för dessa sjukdomar.

Vaginalcytologiska utstryk och blodprov togs från tikar med diagnostiserad pyometra, juvertumörer, kastrerade tikar och tikar i olika löpcykelstadier. Vaginalcellprov från 66 tikar bedömdes enligt två olika metoder; den första utifrån ett flödesschema för cellbedömning baserad på en studie av Reckers *et al.* (2022) och den andra utifrån metoden som lärs ut på veterinärprogrammet på SLU. Med Reckers metod räknades 100–200 celler från varje preparat beroende på celltäthet och celltyp bedömdes utifrån olika mått och kriterier. Om andelen förhornade celler översteg 90 % tolkades provet som östrus. Med metoden som lärs ut på SLU gjordes en uppskattning av andelen förhornade celler men även förekomst av neutrofiler och erythrocyter vägdes in i bedömningen. Utifrån en helhetsbedömning av preparatet kunde proven delas in i anöstrus, proöstrus, östrus eller metöstrus. Östradiolkoncentrationen analyserades i blod med hjälp av en ELISA.

Resultatet från denna studie visade att vaginalcytologibilden från hundarna med pyometra och juvertumörer gick ej att skilja från de friska tikarnas cellbild. Ingen tydlig östradiolpåverkan i form av stor andel förhornade celler räknade med Reckers metod kunde ses på vaginalutstryket hos tikarna med dessa sjukdomstillstånd. Proverna från tikar med juvertumörer kunde ej skiljas från proverna från de intakta tikarna i anöstrus. Samtliga prover från tikarna med pyometra innehöll neutrofiler men detta ses även normalt i metöstrus. Däremot kan en cellbild med rikligt med neutrofiler och bakterier stärka misstanken om att tiken har pyometra om den kliniska bilden stämmer in i övrigt.

Vidare visade resultatet ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentration mellan tikarna med sjukdomstillstånden pyometra eller juvertumörer och de friska tikarna enligt en envägs variansanalys. Komplicerande faktorer i jämförelsen är att tikarna ej var i samma löpcykelstadium, det finns en stor normalvariation i östradiolkoncentrationen och hormonet kan produceras av fler vävnader och organ än äggstockarna såsom binjuren, huden och fettvävnad. Vid jämförelse av de två metoderna för vaginalcytologiprovavläsning framkom att den ena metoden i vissa vaginalutstryk överestimerade andelen förhornade celler, då metoden baseras på förhorningslinjer oberoende av cellkärnans storlek. Det är ej heller säkert att ELISA-metoden som användes för att analysera östradiol fungerade optimalt för hund då inga tidigare studier som validerat och använt metoden hittades. Detta är felkällor som kan ha påverkat resultatet och bör tas i beaktan vid bedömning av resultatet. Framtida studier med ett större urval kan ge en djupare inblick i användbarheten av vaginalcytologi som ett diagnostiskt verktyg.

Nyckelord: estradiol, vaginalcytologi, östruscykel, pyometra, juvertumör, tik

Abstract

The aim of this study was to investigate whether vaginal cytology can be used as a diagnostic tool for different medical conditions in bitches, such as pyometra and mammary gland tumors. In addition, the aim was to compare two different methods for analyzing vaginal smears. Vaginal cytology is commonly used to determine the cycle stage of the bitch. Since oestradiol causes the vaginal epithelium to proliferate and keratinize, vaginal cytology works as a bioassay for oestradiol. Oestradiol may be involved in the pathogenesis of pyometra and mammary gland tumors. The question is if oestradiol has a diagnostic and prognostic value in practice for these medical conditions.

Samples for vaginal cytology and blood serum was collected from bitches diagnosed with pyometra or mammary gland tumors, from ovariectomized bitches and from bitches in heat and in anestrus. The vaginal cytology was evaluated with two different methods; firstly, according to a flowchart for determination of the cell type of exfoliated vaginal cells made by Reckers *et al.* (2022) and secondly according to the method taught to veterinary students at the veterinary program at SLU. In the method by Reckers *et al.* (2022) 100-200 cells were counted and determined while in the method by SLU an estimation of the amount of each celltype was done. The samples were then interpreted as estrous or not estrous with Recker's method and estrous, anestrus, proestrus or metestrus with SLU's method. Blood samples were collected and analyzed for oestradiol with ELISA.

The result from this study showed that the vaginal smears of the dogs with mammary gland tumors and pyometra did not differ from the vaginal smears of the healthy dogs. No distinct signs of high oestradiol as demonstrated by high percentage of cornified cells counted by Reckers method were seen in the vaginal smears from the bitches with these conditions. The vaginal cytology from the dogs with mammary gland tumors were similar to the intact dogs in anestrus. All the vaginal smears from the bitches with pyometra contained neutrophils but since neutrophils are also present in metestrus this is not a specific trait. However, a vaginal smear with an abundant number of neutrophils and bacteria may support the diagnosis of pyometra. Vaginal cytology was not found to be reliable as a sole diagnostic tool in the present study.

Furthermore, there were no significant difference in the concentration of oestradiol in bitches with pyometra or mammary gland tumors compared to healthy dogs according to a one-way analysis of variance. Complicating factors in the comparison include the fact that the bitches were not in the same cycle stage, there is a large normal variation in oestradiol concentration, and the hormone can be produced by many tissues apart from the ovaries such as the adrenal gland, the skin and adipose tissue. When comparing the two methods it became apparent that Reckers method in some cases overestimated the amount of cornified cells, since the method was based on cornification lines rather than the size of the nucleus. There is a possibility also that the ELISA used in this study did not work properly for analyzing oestradiol in dogs. These sources of error may have affected the result and should be taken in consideration when evaluating the result. Future studies with a larger selection of samples could provide further insight into the application of vaginal cytology as a diagnostic tool.

Keywords: oestradiol, exfoliative vaginal cytology, estrous cycle, pyometra, mammary gland tumors, bitch

Innehåll

Förkortningar	9
1. Inledning	11
2. Litteraturoversikt.....	12
2.1 Reproduktionsfysiologi hos intakta tikar	12
2.1.1 Tikens löpcykel	12
2.1.2 Tikens könshormon: Östrogen.....	12
2.1.3 Tikens dräktighetshormon: Progesteron.....	13
2.2 Reproduktionsendokrinologisk diagnostik	14
2.2.1 Bestämning av parningstidpunkt	14
2.2.2 Vaginalcytologi som diagnostisk metod.....	15
2.2.3 Bestämning av löpcykelstadium	17
2.3 En kastrerad tik jämfört med en tik i anöstrus.....	18
2.4 Sjukdomstillstånd hos tik.....	19
2.4.1 Pyometra.....	19
2.4.2 Juvertumörer.....	21
3. Material och metoder	23
3.1 Insamling av material	23
3.2 Analys av material.....	24
3.2.1 ELISA östradiolanalys i serum.....	24
3.2.2 Vaginalcytologi avläsning	25
3.2.3 Statistiska analyser	26
4. Resultat	27
4.1.1 Jämförelse mellan avläsningsmetoderna för vaginalcytologibedömning	28
4.1.2 Vaginalcytologibedömning enligt Reckers metod.....	31
4.1.3 Vaginalcytologibedömning enligt metoden som lärs ut på SLU	32
4.1.4 Jämförelse av östradiolkoncentrationen mellan de olika grupperna	35
4.1.5 Frekvens förhornade celler hos de olika grupperna	37
5. Diskussion	39
5.1.1 Jämförelse av avläsningsmetoderna för vaginalcytologibedömning	39
5.1.2 Jämförelse av östradiolkoncentrationen	41
5.1.3 Frekvens förhornade celler på vaginalutstryken.....	43

5.1.4 Felkällor	45
6. Konklusion.....	48
Referenser.....	49
Populärvetenskaplig sammanfattning	55

Förkortningar

AMH	Anti-müllerskt hormon
CEH	Cystisk endometriehyperplasi
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FSH	Follikelstimulerande hormon
GnRH	Gonadotropinfrisättande hormon
IM	Intermediär cell
LH	Luteiniserande hormon
NaCl	Natriumklorid
PB	Parabasal cell
SF	Superficial cell
SQ	Anukleär superficial cell

1. Inledning

Ett av de hormoner som spelar störst roll i tikens östruscykel är östradiol, det vanligaste östrogena hormonet hos hund (Sjaastad *et al.* 2017). Östradiol produceras i ovarierna och har funktionen att initiera östrus och optimera chansen för fertilisering (Sontas *et al.* 2009; Sjaastad *et al.* 2017). Hormonnivåerna stiger under proöstrus och gör att epitelcellslagret i vaginalslemhinnan prolifererar och keratiniseras vilket kan ses på ett vaginalcytologiprov (Arlt 2018). Vaginalcytologi är en vanlig metod för att tillsammans med analys av progesteron bestämma optimal parningsdag (Nelson & Couto 2020). Många studier har gjorts inom detta område på friska djur, medan färre studier har undersökt vaginalcytologi som diagnostiskt verktyg vid olika sjukdomstillstånd. Frågan är om vaginalcytologi även kan användas vid diagnostik av vanliga sjukdomstillstånd hos tik såsom pyometra eller juvertumör.

Syftet med detta arbete var att jämföra östradiolkoncentrationer och östradiolpåverkan på vaginalepitelet hos tikar i olika löpcykelstadier och tikar med sjukdomstillstånden pyometra och juvertumörer, och på så sätt utreda användbarheten av vaginalcytologi som diagnostisk verktyg vid dessa sjukdomstillstånd. Syftet var även att jämföra två olika metoder för att utvärdera vaginalutstryk. Frågeställningen för detta arbete lyder: *Kan man utöka användbarheten av vaginalcytologi i diagnostiken av olika sjukdomstillstånd hos tik?*

2. Litteraturöversikt

2.1 Reproduktionsfysiologi hos intakta tikar

2.1.1 Tikens löpcykel

Tikens löpcykel kan delas in i fyra olika stadier; anöstrus, proöstrus, östrus och metöstrus. Andra djurslag har även diöstrus men hos tik är metöstrus och diöstrus samma period eftersom det inte finns någon period efter ovulation med lågt progesteron hos tik (Concannon 2011). Östrus kan definieras som perioden under vilken en tik är mottaglig för parning. Anöstrus är perioden under vilken tiken ej är mottaglig för parning och saknar äggstocksaktivitet. En löpcykels längd mäts från startpunkten på en proöstrus fram till nästkommande proöstrus start (Sjaastad *et al.* 2017).

2.1.2 Tikens könshormon: Östrogen

Under östruscykeln spelar det honliga könshormonet östrogen en central roll. Den huvudsakliga produktionen sker i ovarierna men det finns även en liten andel som produceras i placenta och binjurebarken (Sontas *et al.* 2009). Produktionen i ovarierna styrs av ett komplext samspel mellan hypothalamus, främre hypofysen och ovarierna. Hypothalamus producerar gonadotropin-frisättande hormon (GnRH) som stimulerar främre hypofysen att producera follikelstimulerande hormon (FSH) och luteiniserande hormon (LH). FSH och LH i sin tur stimulerar ovarierna att producera östrogen (Hatoya *et al.* 2003). Hypothalamus sekretion styrs av en endogen pulsatil rytm, men även av neuroner i andra delar av hjärnan (Sjaastad *et al.* 2017).

Produktionen regleras i huvudsak genom negativ feedback (Thomas & Fontbonne 2008). Negativ feedback innebär att vid hög mängd östrogen fås en inhibitorisk effekt på GnRH, LH och FSH. FSH inhiberas också av inhibin som bildas av granulosaaceller i follikelväggen under selektionen av folliklarna. I sen proöstrus sker dock ett avbrott i det negativa feedback-systemet och det blir en positiv feedback-effekt för att framkalla ovulation. I takt med att folliklarna mognar ökar

östrogennivåerna och när östrogen nått en viss nivå kommer neuroendokrina celler i hypothalamus att frisätta en våg av GnRH, som i sin tur genererar en våg av LH vilket inducerar ovulation. Ovulationen sker i slutet av follikelfasen när östrogen minskar och progesteron ökar och varar i 24-48 h (Nelson & Couto 2020). Hundar har spontan ovulation vilket innebär att den sker oberoende av parning (Concannon 2011).

Både granulosaaceller och thecaceller i follikelväggen bidrar till produktionen av östrogen (Sjaastad *et al.* 2017). LH stimulerar thecaceller att syntetisera androgener som sen diffunderar till granulosaacellerna, som på grund av FSH stimuleras att proliferera och syntetisera östrogen av androgenerna. Den största mängden östrogen kommer ut i blodet, men en del ackumuleras i follikelvätskan. Det huvudsakliga östrogenet hos hund är östradiol vars biologiska form är 17β -estradiol. Grundmolekylen för produktion av östradiol är kolesterol och intermediära molekyler under syntesen är progesteron (Sjaastad *et al.* 2017) och de hanliga könshormonen androstendion och testosteron (Concannon 2011).

Östrogenets främsta funktion är att optimera chansen för befruktning genom att stimulera follikeltillväxten och reglera gonadotropinfrisättningen (Sjaastad *et al.* 2017). Östrogen initierar också mottagligheten för parning och fertilisering och förbereder yttre genitalia för parning. Därefter underlättar östrogen transporten av spermier till äggladaren och skapar en gynnsam miljö i uterus för de befruktade äggen. Slutligen stöttar östrogen tillväxten och utvecklingen av mjölkkörtlarna och främjar utvecklingen av könsegenskaper. Östrogen bidrar även till att öka blodflödet till uterus och yttre genitalia och till slemproduktionen i cervix. Till följd av den ökade blodtillförseln och kärlpermeabiliteten med diapodes som östrogen orsakar har tikar en blodtillblandad flytning från vulva vid östrus. Vanligen anger man löpningens dag 1 som den första dag den hemorragiska flytningen noteras (Concannon 2011).

2.1.3 Tikens dräktighetshormon: Progesteron

Ett annat hormon som har en central roll under östruscykeln är progesteron. Progesteron produceras av gulkroppen, corpus luteum, som bildas efter att follikeln har ovulerat (Sjaastad *et al.* 2017). Unikt hos tik är dock att produktionen påbörjas redan innan ovulation på grund av preovulatorisk luteinisering. Syntesen av progesteron stimuleras av LH och hormonnivåerna kulminerar i metöstrus samtidigt som östrogennivåerna sjunker. Hos hundar fortgår produktionen av progesteron oberoende av om tiken blir dräktig eller ej. Lutealfasen är till och med lite längre (ca 69 ± 1 dagar) om tiken ej blir dräktig (Concannon 2011). Livmodern har ingen eller liten påverkan på lutealfunktionen (Sjaastad *et al.* 2017).

Progesteronets främsta effekt är att skapa en förmånlig miljö i livmoderslemlhinnan för embryots utveckling till ett foster (Sjaastad *et al.* 2017). Det gör progesteron genom att stimulera tillväxten och sekretionen av livmoderkörtlarna samtidigt som uteruskontraktioner motverkas. Fortsättningsvis bidrar progesteron till tillväxt och utveckling av mjölkkörtlarna och förbereder dem för mjölksyntes. Både östradiol och progesteron styr sekretionen av GnRH genom feedback-reglering på neuronerna i hypothalamus och främre hypofysen. Progesteron har alltid en negativ feedback medan östrogen påverkar genom både negativ och positiv feedback. Inhibin påverkar enbart främre hypofysens produktion av FSH genom negativ feedback (Marino & Zanghì 2013).

2.2 Reproduktionsendokrinologisk diagnostik

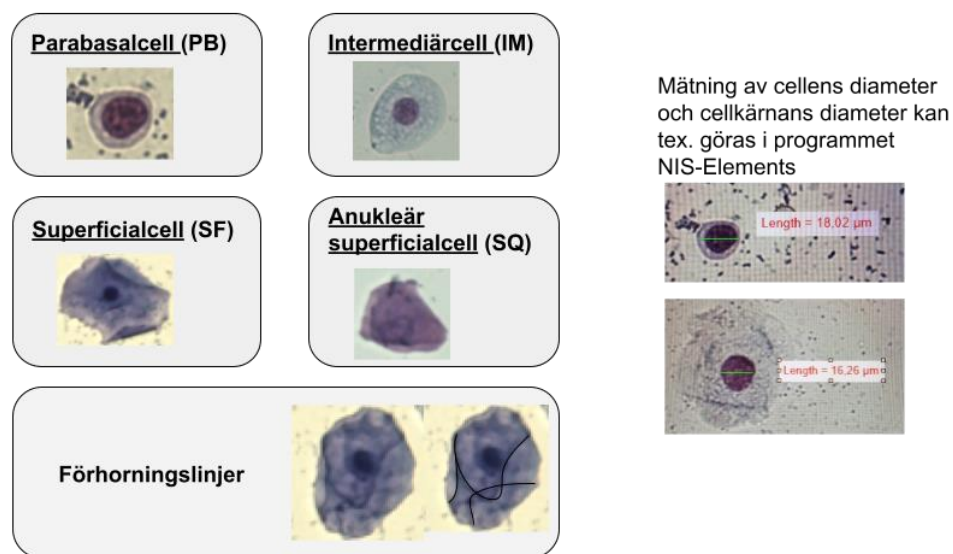
2.2.1 Bestämning av parningstidpunkt

Att uppskatta östradiol- och progesteronnivåerna kan utnyttjas för att bestämma optimal tidpunkt för parning (Concannon 2011). Östradiol har sin topp i sen proöstrus en till två dagar innan den preovulatoriska LH-toppen. Progesteron börjar stiga redan före tidpunkten för LH-toppen och därmed innan ovulation. Detta är unikt för tik och progesteron kan därför fungera som en indirekt detektor av LH-toppen. Att mäta LH-nivåerna för att identifiera tidpunkten för ovulation är även det möjligt men då LH-toppen varar under en så kort period kräver det dagliga provtagningar (Nelson & Couto 2020). LH är normalt förhöjt i en till tre dagar och toppar oftast under de första 12-18h, normalt två dagar efter att östradiol haft sin topp (Concannon 2011). Progesteron däremot räcker det som regel att mäta varannan dag och därmed blir det mindre kostsamt (Nelson & Couto 2020).

En vanlig metod för att bestämma parningstidpunkt är att indirekt uppskatta östradiolkoncentrationen genom ett vaginalcytologiproov, som sen kan vägas samman med en progesteronanalys från serum (Nelson & Couto 2020). Det mest kostnadseffektiva är att analysera progesteron först efter att ett vaginalutstryk har analyserats som visar på att tiken är i östrus. Vanligen väntar man till vaginalcytologin visar ca 70 % superficialceller. Om man sedan mäter progesteron varannan dag kan man identifiera när progesteronnivåerna börjar stiga vilket indikerar att LH har haft sin topp.

2.2.2 Vaginalcytologi som diagnostisk metod

Vaginalcytologi är en metod för att indirekt mäta östradiolproduktionen och kan användas för att bestämma vilket löpcykelstadium tiken befinner sig i (Arlt 2018). Vaginalslemhinnan förändras cykliskt. Under follikelfasen ökar östrogenkoncentrationen för att förbereda slemhinnan för parning. Östrogenpåverkan leder till förtjockning och förhornning av epitelcellslagret i vagina och på cellnivå kan ses att cellerna keratiniseras och kärnan går i apoptos. På ett vaginalcytologiprov ses dessa epitelceller som normalt delas in i tre olika typer; parabasalceller (PB), intermediär-cell (IM) och superficialceller (SF). Även erythrocyter och neutrofiler kan ses beroende på när i löpet vaginalcytologin tas.



Figur 1. Bilder på de olika celltyperna, förhorningslinjer och hur mätning av cellen kan göras. Bilderna är tagna från preparaten som analyserades i denna studie med hjälp av Nikon eclipse kamera. Foto: Sara Huber

De olika epitelcelltyperna är samma sorts epitelcell men i olika faser vilket gör att definitionerna och gränsdragningarna mellan dem ej är helt tydlig. En studie av Reckers *et al.* (2022) sammanställde de olika definitionerna som finns publicerade och av studien framkom att cellerna kan klassificeras utifrån diameter, förhornning, förekomst, storlek och utseendet av kärnan, förhållandet mellan kärna och cytoplasma och form på cellerna. Förhornning kan bedömas genom antalet förhorningslinjer, som definieras som de mörkare linjerna som ses inuti cellen (Figur 1). Ju fler linjer desto mer förhornad är cellen (Reckers *et al.* 2022). De flesta författare är överens om att PB och IM ej är förhornade alls (Johnston *et al.* 2001; Kustritz 2006) och att de har en rund, oförändrad kärna (Schutte 1967b; Olson *et al.* 1982; Antonov 2017). IM har enligt vissa (Johnston *et al.* 2001) en kärna med area $>90 \mu\text{m}^2$, medan andra specificerar kärnan till $38,5\text{-}95 \mu\text{m}^2$ (Christie *et al.* 1972).

Merparten beskriver intermediärcellernas kärna som stor, tydligt urskiljbar (Schutte 1967b), prominent och normal i sitt utseende (Johnston *et al.* 2001). SF beskrivs enstämigt ha en pyknotisk kärna (Christie *et al.* 1972; Pérez *et al.* 2005; Aydin *et al.* 2011) som efterhand genomgår karyorrhexi eller karyolys (Reckers *et al.* 2022). Flera författare anser att cellens form är viktig för bedömningen, det vill säga om cellen är rund eller kantig (Christie *et al.* 1972; Post 1985), men om den används som ensamt klassificeringsmått anser en del att det kan leda till att IM och SF blandas ihop (Johnston *et al.* 2001).

För att underlätta och homogenisera avläsningen av vaginalcytologiprover tog Reckers *et al.* (2022) fram en mall för klassificeringen av de olika celltyperna. Första steget är att mäta maxlängden på cellen. Om cellen är under 20 μm är det en PB och om den är över går man vidare till steg två; att bedöma förhorningsgrad. Om cellen saknar förhorning eller har max en förhorningslinje går man vidare till att mäta arean på cellkärnan. Cellkärnan bedöms som rund och dess area kan därför beräknas genom att mäta dess diameter i mikroskop och sedan använda formeln för cirkelns area. Om kärnans area är över 79,5 μm^2 klassas den som en IM. Om arean är under 79,5 μm^2 eller om cellen har måttlig till signifikant förhorning (minst två förhorningslinjer) går man till steg tre; att bedöma cellkärnan. Ser man en kärna som är definierbar och har en färgskillnad från cytoplasman klassificeras cellen som en SF. Ser man ingen cellkärna eller kärnan är eroderad och knappt synbar räknas det som en form av anukleär superficialcell som på engelska fått benämningen ”squamous cell” (SQ). Dessa celler har ingen cellkärna enligt vissa författare (Schutte 1967b; Kustritz 2006), medan andra hävdar att de kan ha rester av en upplöst cellkärna. Till följd av att det inte finns någon enhetlig definition av celltyperna tolkas vaginalcytologiprover många gånger på olika sätt (Reckers *et al.* 2022).

En av de tidigaste publikationerna som beskrev vaginalcytologi-avläsning på tik är skriven av Schutte (1967b). Enligt Schutte finns det ingen skillnad i den cellulära diametern mellan de SQ, SF med pyknotisk kärna och stora IM. Det finns däremot en skillnad i cellkärnans utseende och diameter. SF har en pyknotisk kärna på mindre än 6 μm i diameter, medan de stora IM har en vesikulär kärna med en diameter på 7-11 μm . IM har normal kärnarkitektur, även om det endast finns en antydning till sådan klassificeras cellen som intermediär. Vidare påstår Schutte att diametern på SF är ungefär dubbelt så stor som PB, medan diametern på PB kärna är 2 μm större än SQ, SF och stora IM.

Schutte beskrev även (1967a) vaginalutstrykens utseende vid de olika löpcykelstadierna hos tik. Proöstrus beskrivs som bestående av i huvudsak SF och stora IM. I första delen av fasen är det en låg keratiniseringsgrad med många erythrocyter. En del leukocyter kan ses de första dagarna. Keratiniseringsgraden ökar mot slutet av

fasen medan erytrocytmängden minskar. I vissa fall kan det finnas erytrocyter genom hela både proöstrus- och östrusfasen. Förutom celler ses även cellulär debri och slemstråk i proöstrus. Östrus beskriver Schutte som normalt i avsaknad av både erytrocyter och leukocyter. Stadiet karaktäriseras av SQ (<15 %), SF med pyknotisk kärna och stora IM. Utstryken har rent och klart utseende till skillnad från proöstrus. Metöstrus beskriver Schutte som en fas med hög leukocytkoncentration och med ökande förekomst av små intermediära celler och PB. Några PB har leukocytinfiltration, så kallade metöstrusceller. Leukocytkoncentrationen avtar under senare delen av fasen för att sen bli låg under anöstrus. Denna beskrivning ligger fortfarande till grund för hur vi avläser vaginalcytologi idag.

Schuttes beskrivning av celltyperna är endast deskriptiv och har ingen kvantitativ information om proportionerna av celltyper som finns i varje löpcykelstadium (Schutte 1967a). En del försök har gjorts att kvantifiera förändringarna av celltyperna i de olika löpcykelstadierna men det finns ingen enhetlig definition (Christie *et al.* 1972). En del författare definierar östrus som 100 % SF och >80 % celler med pyknotisk eller ingen kärna (Bergeron *et al.* 2014; Antonov 2017). Andra sätter gränsen vid >90 SF för att klassas som östrus (Bouchard *et al.* 1991). Det finns också en definition på östrus som är 100 % förhorning med >50 % SQ (Kustritz 2006). För metöstrus finns det dock mer en samsyn på vaginalcytologibilden. De flesta definierar starten på metöstrus som när SF och SQ minskar med 20 % (Bouchard *et al.* 1991; Antonov 2017) och det syns fler neutrofila granulocyter (Post 1985; Aydin *et al.* 2011; Reckers *et al.* 2022)

Det finns många olika metoder som beskriver hur ett vaginalcytologiprov bör tas. De flesta författare är överens om att vaginalcytologiprov bör tas från främre vagina då celler från klitoris fossa och kaudala vagina ej speglar löpcykelstadiet lika bra (Goodman 2001), även om det finns de som har visat att ett prov från vulva går lika bra av praktiska skäl speciellt under proöstrus och östrus (Bell *et al.* 1973). En del rekommenderar spekulum för att undvika kontamination av celler från andra delar av vagina (Bouchard *et al.* 1991). Många kliniska studier använder dock inget spekulum eller liknande vid provtagningen (Pérez *et al.* 2005; Antonov 2017).

2.2.3 Bestämning av löpcykelstadium

Bestämning av löpcykelstadium på en tik görs genom en helhetsbedömning av tikens anamnes, fynd vid klinisk undersökning samt resultatet av vaginalcellutstryk och progesteronprov.

Anöstrus varierar från 1 till 6 månader (Nelson & Couto 2020). Under anöstrus är tiken ej parningsvillig, vulva är liten och ingen vaginal flytning ses. Uterus genomgår involution eller reparation. Endokrint är östrogen på basal nivå, progesteron

som lägst, GnRH ökat pulsatil, FSH måttligt förhöjt och LH lindrigt förhöjt. På vaginalcytologi ses ett cellfattigt utstryk med sparsam förekomst av PB och små IM (Post 1985).

Proöstrus varar i allt ifrån tre dagar till tre veckor, i medel nio dagar (Nelson & Couto 2020; Concannon 2011). Under proöstrus är tiken attraktiv men ej mottaglig för parning, vulva är måttligt svullen och en hemorragisk flytning ses (Concannon 2011). I ovarierna sker follikulogenes där folliklarna mognar. Endokrint toppar östrogen, progesteron ökar, GnRH är pulsatil, FSH ökar och i slutet av fasen har LH sin topp (Nelson & Couto 2020). På vaginalcytologi ses ett mer cellrikt utstryk och cellbilden övergår från att bestå av mest PB och IM till successivt fler SF (Schutte 1967a). Hos majoriteten syns även en stor mängd erythrocyter men dessa minskar vanligen när tiken närmar sig östrus.

Östrus varar i tre dagar till tre veckor (Nelson & Couto 2020). Under östrus är tiken mottaglig för parning, vulva är svullen och en serohemorragisk flytning ses. Stadiet börjar med ovulation och sedan kan parning och befruktning ske. Endokrint sker en minskning av östrogen och en stegring av progesteron. På vaginalcytologi ses SF, eventuellt bakterier och erythrocyter. Maximal förhornning ses vid ovulation med varierande andel (10-40 %) SQ (Olson *et al.* 1984; Moxon *et al.* 2010).

Metöstrus varar i två till tre månader även om tiken ej blivit dräktig (Nelson & Couto 2020). Under metöstrus är tiken ej mottaglig för parning, vulva är mindre svullen och ofta ses ingen flytning. Endokrint är östrogen lågt, progesteron förhöjt tills slutet av fasen då det minskar, LH är pulsatilt och prolaktin ökar. Under den långa fasen sker implantation och dräktighet eller skendräktighet om tiken ej blivit dräktig. På vaginalcytologi ses PB, neutrofiler och eventuellt bakterier. I början av metöstrus ses en minskning av andelen SF till under 50 % inom 24h (Schutte 1967a; Holst & Phemister 1975).

2.3 En kastrerad tik jämfört med en tik i anöstrus

Det är lätt att i vaginalutstryk särskilja kastrerade från intakta tikan under proöstrus och östrus då vävnaden är under hög påverkan av östradiol, men att skilja en kastrerad tik från en i tik anöstrus är svårare (Buijtel *et al.* 2006). Ett sätt att särskilja dem är att mäta FSH-koncentrationen i plasma. Den basala nivån av cirkulerande LH och FSH ökar efter gonadoektomi till följd av att negativ feedback från gonadhormonen försvinner. Basalkoncentrationen FSH i plasma är högre hos kastrerade tikan än intakta tikan i anöstrus. Det räcker dock inte med ett provtagningstillfälle då sekretionen är pulsatil, utan krävs flera blodprov i följd (Beijerink *et al.* 2007). Ett alternativ till detta som är under utredning är att istället

mäta kvoten mellan FSH och kreatinin i urin då det reflekterar FSH koncentrationen i plasma över flera timmar och är enkelt och icke invasivt (Albers-Wolthers *et al.* 2016). Det har även visat sig att det går att mäta LH-koncentrationen för att påvisa äggstocksvävnad så länge provtagning undviks vid LH-toppen under lopp (Alm & Holst 2018).

Ett annat sätt för att ta reda på kastreringsstatus är att mäta cirkulerande anti-müllerskt hormon (AMH) (Place *et al.* 2011, Alm & Holst 2018). Ovarierna anses vara den enda källan till AMH och därför kan AMH förväntas vara en specifik indikator för förekomst av funktionell gonadvävnad. AMH koncentrationen i plasma har visats vara högre hos intakta tikar än kastrerade tikar, men det finns överlappningar i koncentrationsintervallen och individuella skillnader.

Vaginalcytologi på kastrerade tikar i en studie av Rota *et al.* (2020) visade ett väldigt cellfattigt utstryk, troligtvis ett resultat av vävnadsdystrofi på grund av köns-hormonbrist. En del av studien jämförde utstryken hos kastrerade tikar med tikar i anöstrus. Hälften av de kastrerade tikarnas utstryk innehöll erythrocyter vilket ej sågs hos den anöstrala tikarna, detta kan tyda på skörhet i mucosalagret. Hos anöstrustikarna sågs ett normalt cellulärt mönster med framför allt PB, IM och enstaka neutrofiler. Hos varken kastrerade eller anöstrala tikarnas utstryk observerades östrogenpåverkan eller patologiska tecken.

2.4 Sjukdomstillstånd hos tik

2.4.1 Pyometra

Ett sjukdomstillstånd som kan vara relaterat till östradiol är pyometra, livmoderinflammation. Pyometra ingår ofta i ett komplex med cystisk endometriehyperplasi (CEH) då CEH är en predisponerande faktor för pyometra, men pyometra och CEH kan utvecklas oberoende av varandra (De Bosschere *et al.* 2001). Pyometra drabbar främst medelålders-äldre tikar och utvecklas typiskt under lutealfasen två till fyra månader efter östrus då progesteron är högt. Progesteron gör miljön i livmodern gynnsam för ett embryo och denna miljö gynnar även bakterietillväxt. Bakterier, oftast *E.coli*, når vanligtvis uterus ascenderande från vaginalöppningen men även hematogent (Hagman 2018). Progesteron stänger cervix, minskar uteruskontraktionerna, trycker ner det lokala immunsystemet och stimulerar endometrie-körtlarnas utveckling och utsöndring av sekret. Detta sekret är en bra grogrund för bakterier (Nelson & Couto 2020). Om livmodern inte lyckas rena sig utvecklas pyometra, en septisk livmoderinflammation.

Tikar med pyometra kan presenteras med eller utan flytningar beroende på om cervix är öppen eller stängd. En stängd pyometra är allvarigare då det medför en potentiell risk för till exempel livmoderuptur eller septisk peritonit (Jitpean *et al.* 2016). Vanliga kliniska tecken vid pyometra är flytningar i olika grad, inappetens, letargi, polyuri/ polydipsi, takykardi, takypné, sänkt pulskvalité och onormala slemhinnor. Andra tecken är feber, dehydrering, kräkning, bukömhet, rörelse-svårigheter och diarré. Sjukdomstillståndet diagnostiseras med hjälp av anamnes, klinisk undersökning, hematologi och biokemiska analyser, ultraljud och/eller röntgen av abdomen (Hagman 2018).

Vaginalcytologi utförs inte som rutinmässig diagnostik vid en pyometra och utstryk kan visa på en varierande bild. Vid öppen pyometra ses stora mängder intra- och extracellulära bakterier, degenererade neutrofiler, makrofager, proteinhaltig debri och epitelceller (Nelson & Couto 2020). Även en del makrofager, plasmaceller och lymfocyter kan ses (Hagman 2018). De epitelceller som ses är främst PB, fler vid öppen än vid stängd pyometra, och en mindre mängd IM (Llazani *et al.* 2021).

Cirkulerande nivåer av östrogen och progesteron har i studier visat sig vara normala hos tikar med spontan CEH-pyometra (Hadley 1975), även om hormonerna antas spela en roll i patogenesen. Endogena östrogener tros vara en faktor i patogenesen antingen genom att påverka livmodern under proöstrus och östrus, och därigenom öka känsligheten för progesteronets verkan, eller som en pågående faktor under sjukdomens utvecklande (Ververidis *et al.* 2004). Progesteron spelar en central roll i patogenesen för CEH-pyometra i och med att sjukdomstillståndet vanligtvis uppträder i metöstrus som domineras av progesteron, och kan behandlas med läkemedel som hämmar progesteronets verkan (Verstegen *et al.* 2008). En annan författare skriver att hormonnivåerna av östrogen och progesteron vanligtvis inte är onormalt höga vid CEH-pyometrakomplexet men en ökad mängd och sensitivitet av hormonreceptorer tros initiera en förstärkt respons av hormonerna (Hagman 2018).

Det finns dock rapporterade fall av högre östradiolkoncentrationer vid CEH-pyometra. I studien av Ververidis *et al.* (2004) mättes serum-östradiol före och efter operation och jämfördes med friska tikar. Resultatet visade att serumöstradiolkoncentrationen var signifikant högre hos tikar med CEH-pyometra än hos friska tikar under metöstrus respektive anöstrus, dock var östradiolnivåerna inte så höga som vid proöstrus eller östrus. Även andra studier (Fayrer-Hosken *et al.* 1992; Blendinger *et al.* 1997) har rapporterat fall av CEH-pyometra med högre östradiolkoncentrationer, men dessa fall hade förlängd östrus, follikelcystor i ovarierna och äggstocksförändringar. Hög östradiolkoncentration under tidig anöstrus när progesteronnivåerna är basala har visats aktivera östrogenreceptorerna i uterus (Ververidis *et al.* 2004).

2.4.2 Juvertumörer

Juvertumörer är den vanligaste neoplasin och efter hudtumörer den vanligaste orsaken till tumörorsakad död hos intakta tikar (Fan *et al.* 2021). Cirka hälften av juvertumörerna är maligna enligt histologisk bedömning. Den mest kritiska faktorn för överlevnad och behandling är tidig diagnostisering. Patogenesen är inte helt klarlagd men det finns evidens som tyder på att östrogen har en roll i bildandet av juvertumörer på humansidan och även hos hund (Canadas-Sousa *et al.* 2019). Flest juvertumörer drabbar tikar och de som drabbar hanar är kopplade till testikel-tumörer som producerar östrogen (Saba *et al.* 2007). Ovariehysterektomi i tidig ålder har visat sig ha en förebyggande effekt (Sorenmo *et al.* 2000) och serumnivåer av steroidhormoner, bland annat östradiol, har rapporterats vara högre hos tikar i anöstrus med juvertumörer än hos friska tikar i anöstrus (Queiroga *et al.* 2005).

Östrogen är viktigt för normal utveckling och funktion av flera organ, bland annat juverkörteln, och bidrar till utvecklingen av juvrets alveoler och utförsgångar (Hilton *et al.* 2018). Det har visat sig att östrogen har en proliferativ och anti-apoptotisk effekt (Chen *et al.* 2013) och att vissa intermediära produkter som härstammar från metabolismen av östrogen har en genotoxisk effekt (Santen *et al.* 2009). På människa utgör långvarig exponering för östrogen såsom tidig menstruationsdebut eller sen menopaus en känd riskfaktor för bröstcancer (Dall & Britt 2017).

I en normal juvervävnad finns östrogenreceptorer som östrogen binder till, men i juvervävnad som är neoplastiskt transformerad har studier rapporterat förändringar i östrogenreceptorerna och deras uttryck (Rutteman *et al.* 1988). Ett lägre uttryck av östrogenreceptorer har kopplats till en större tumörstorlek och lymfknutemetastasering vilket betyder att östrogenreceptorernas uttryck kan fungera som en markör för prognosen (Nieto *et al.* 2000). Hos tikar med maligna tumörer har serumnivåerna av östradiol uppmätts vara signifikant högre än hos tikar med benigna tumörer (Queiroga *et al.* 2005).

På humansidan har man visat individuella genetiska skillnader vad gäller bildandet av östrogen, dess metabolism och funktion (Bugano *et al.* 2008). Dessa genetiska skillnader kan kopplas till hur sannolikt det är att en individ utvecklar bröstcancer, vilka symptom individen har och hur sjukdomen progredierar (Larsen *et al.* 2014). På hund har rapporterats viss genetisk variation i genen ESR1. I en studie av Canadas-Sousa *et al.* (2019) undersöktes kopplingarna mellan genen ESR1 och juvertumörer och det visades att det finns hundar med genetiska profiler som har en senare debutålder av juvertumörer, mindre aggressiva former, utökad tubulär differentiering, mindre tumörstorlek och bättre prognos. Enligt författarna bakom studien kan det vara så att dessa hundar som bär på en annan variant av ESR1 har

receptorer som är mindre känsliga för östrogen, vilket resulterar i en juervävnad som är mindre responsiv för hormonet, och därmed mer skyddad från dess carcinogena effekt. Slutsatsen som drogs var att studier av hundens ESR1 genetiska profil kan hjälpa till att besluta för vilka hundar som man ska rekommendera förebyggande åtgärder mot utvecklandet av juvertumörer, såsom till exempel tidig kastration.

Kastrering har enligt flera studier visat sig minska risken för juvertumörer, men i vilken grad kastrering är förebyggande mot utvecklandet av juvertumörer är omdiskuterat (Beauvais *et al.* 2012). Kopplingen mellan gonadektomi, tumörutveckling, livslängd och tumörrelaterad död är komplex och mekanismerna bakom processen är fortfarande ej klarlagda. De motstridande resultaten från olika studier anser Canadas-Sousa *et al.* (2019) kan ha sin förklaring i att hundar har olika genetisk profil och därmed olika risk att utveckla juvertumörer. Resultatet i studien av Canadas-Sousa *et al.* (2019) visar att canine ESR1-genen skulle kunna användas som underlag vid beslutet om en kastrering, men mer forskning behövs kring vilken betydelse den genetiska profilen har för att säga hur stor effekt en kastration har mot utvecklandet av juvertumörer.

3. Material och metoder

3.1 Insamling av material

Vaginalcytologiska utstryk och blod samlades in från friska tikar i olika löpcykelstadier, friska kastrerade tikar, tikar med pyometra och tikar med juvertumörer. Rekrytering av hundar skedde via reproduktionscentrum och via akut- och operationsmottagningen på SLU Universitetsdjursjukhuset (UDS) under september och oktober månad 2022 och på akutmottagningen på Östersunds djursjukhus under juli och augusti 2022. Även prover tagna i maj 2022 från SLUs försökshundar och 23 vaginalcytologiprover från tikar som provtogs 2019 inkluderades i studien; 14 tikar i löp, sex ej i löp och tre kastrerade. Endast djur som var medgörliga vid provtagningen och vars ägare godkänt djurets medverkan inkluderades i studien. Studien är en delstudie av en större studie om anti-müllerskt hormon som är godkänd av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (diarienummer 5.8.18-17395/2018). Totalt samlades prover in från 16 tikar som ej visade tecken på löp, 12 tikar som visade tecken på löp, åtta tikar med diagnostiserad pyometra, fem tikar med juvertumörer som skulle opereras bort samt två friska kastrerade tikar. Kriterierna för att klassas som löp var anamnestiska uppgifter om att tiken påbörjat sitt löp för mindre än tre veckor sedan och/ eller att tiken visade kliniska tecken på löp, såsom hemorragisk flytning och svullen vulva. Kriterierna för att klassas som ej i löp var det motsatta, att tiken påbörjat sitt löp för mer än tre veckor sedan och/ eller att tiken ej visade kliniska tecken på löp.

Vaginalcytologin utfördes med hjälp av bomullspinne, spekulum, natriumklorid (NaCl), objektglas, handskar, bomullstussar och klorhexidinsprit. Vulva spritades av med en bomullstuss fuktad av klorhexidinsprit. Spekulumet fördes in i vagina, med undantag för de två kastrerade hundarna där provet togs utan spekulum då tikarna var för små för undersökning med spekulum utanför löp. En bomullspinne fördes in genom spekulumet och rullades mot vaginalslemhinnan. Bomullstoppens cellmaterial rullades ut på ett objektglas. Objektglaset färgades inom två veckor enligt en Romanowsky-typ av färgning (Grünwald-Giemsa) av personal på Klinisk-kemiska laboratoriet på UDS.

Blodproven togs med hjälp av blodserumrör, kanyl, bomullstuss, klorhexidinsprit, stas, rakapparat och handskar. Området för blodprovstagningen rakades om det behövdes, och spritades av. Stas anlades. Blod togs från vena cephalica med hjälp av en kanyl eller venkateter och samlades upp i ett blodserumrör. Serumrören centrifugerades och serumet överfördes till två kryorör som frystes ner och förvarades i -80 °C i väntan på analys.

3.2 Analys av material

3.2.1 ELISA östradiolanalys i serum

Blodet analyserades för östradiol med hjälp av en enzymkopplad immunsorberande analys (ELISA) test. ELISA är en analysmetod som används för att detektera och kvantifiera antikroppar, antigen, proteiner, glykoproteiner eller hormoner. Metoden baseras på att antikroppar binder till antigen. Detektionen sker med hjälp av ett substrat som kan generera färg (Alhaji & Farhana 2022).

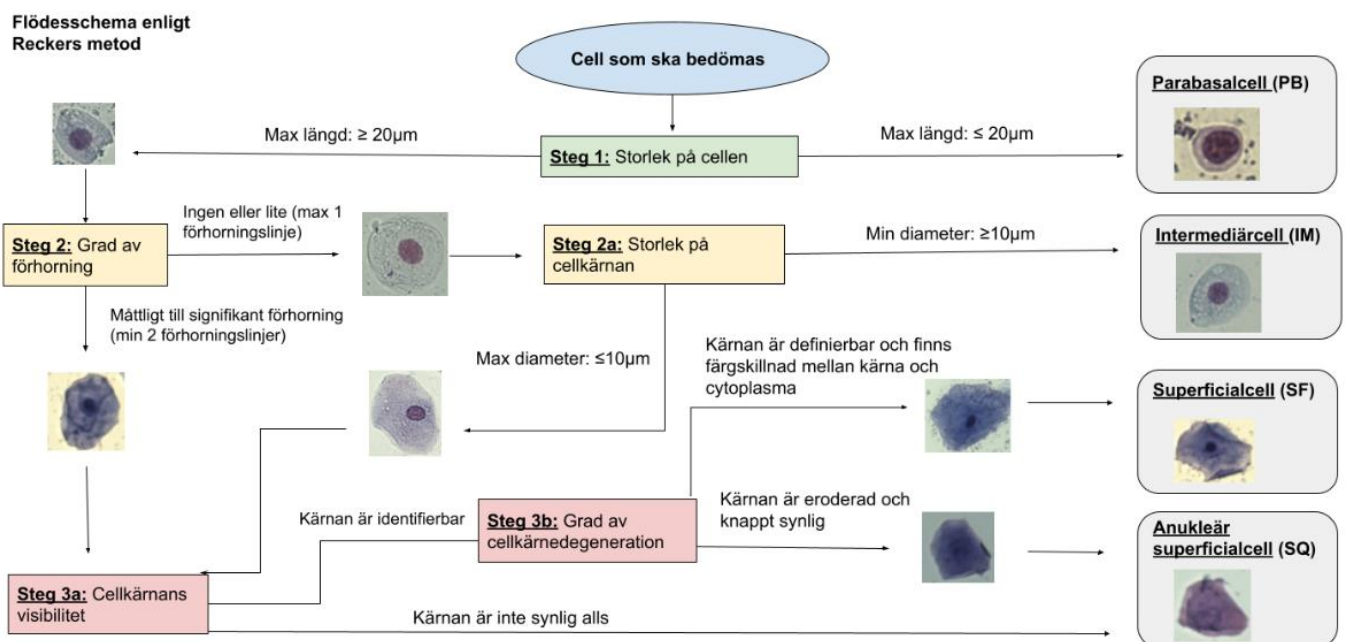
Två ELISA-kit som enligt producenten var tillförlitliga för analys av östradiol hos hund provkördes på ett par tikar i och utanför lopp. Först testkördes Arbor Assays Canine Estradiol (E2) ELISA-kit (Ann Arbor, USA) men det testet visade på odetekterbara nivåer av östradiol. Ett nytt test beställdes; Assay Genie Canine Estradiol (E2) ELISA-kit (Dublin, Irland) och vid testkörning såg det lovande ut och resten av proverna analyserades med detta test. Assay Genie Canine Estradiol (E2) Kit är en kompetitiv ELISA.

Alla prover analyserades i duplikat. Standardprover med östradiol från tillverkaren användes för att generera en standardkurva. Prover utan östradiol användes som negativ kontroll. ELISA-plattan tvättades två gånger innan start och alla brunnarna märktes upp. Till varje brunn pipetterades 50 µl standardprover, kontrollprover respektive serumprover. Direkt efter adderades 50 µl lösning med östradiolantikroppar till varje brunn. Plattan täcktes över och inkuberades i 45 min i 37 grader.

Efter inkuberingen tvättades plattan tre gånger med tvättbuffert för att få bort allt som ej bundit in. Ett konjugat adderades; 100 µl HRP-Streptavidin Conjugate. Plattan inkuberades på samma sätt som tidigare i 30 min och tvättades därefter fem gånger. Sedan adderas 90 µl TMB substrat som reagerar med det bundna konjugatet och genererar färg. Plattan inkuberades ytterligare 10-20 min i mörker. Reaktionen stoppades sedan med 50 µl stopplösning. Den optiska densiteten mättes därefter med en plattavläsare inställd på 450 nm våglängd. Koncentrationen östradiol bestämdes sedan genom att proverna jämfördes med standardkurvan som hade kända koncentrationer.

3.2.2 Vaginalcytologi avläsning

Vaginalcytologiproverna blindades och avlästes ett åt gången enligt två olika metoder. Först enligt metoden som beskrivs i artikeln från Reckers *et al.* (2022). Preparaten fotades i 4x och i 10x med Nikon eclipse kamera och cellernas diameter och cellkärna mättes i programmet NIS-Elements. Med en manuell elektronisk cellräknare räknades därefter 100 eller 200 celler från varje preparat beroende på hur cellrikt preparatet var. I cellrika preparat räknades 200 celler. Cellerna bedömdes som parabasalcell (PB), intermediär cell (IM), superficial cell (SF) eller anukleär superficial cell (SQ) enligt flödesschemat nedan (Figur 2) som är baserat på Reckers *et al.* (2022) flödesschema för celldetektion, beskrivet i litteraturen.



Figur 2. Flödesschemat för cellbedömning som användes i denna studie baserat på Reckers framtagna flödesschema. Bilderna är tagna från preparaten som analyserades i denna studie med hjälp av Nikon eclipse kamera.

Enda skillnaden från Reckers flödesschema var att istället för att mäta cellkärnans area, mättes dess diameter och gränsen drogs då vid $10\ \mu\text{m}$ i diameter istället för arean $79,5\ \mu\text{m}^2$ för att klassa cellen som IM. Diametern beräknades genom att lösa ut radien i formeln för cirkelns area; $r^2\pi$ och multiplicera med två. Vid användning av detta flödesschema gjordes bedömningen att cellkärnans area ej spelade någon roll enligt flödesschemat om cellen hade fler än två förhorningslinjer, utan då klassades den som en SF eller SQ. Proverna tolkades därefter avseende om de hade en östrusbild eller inte. Gränsen för östrus drogs vid $>90\%$ förhornade celler enligt definitionen av Bouchard *et al.* (1991).

Andra avläsningsmetoden var enligt metoden som lärs ut på veterinärprogrammet på SLU (Axné 2019). Metoden går ut på att studera preparatet översiktligt och göra en uppskattning om hur många PB, IM, SF, erythrocyter och neutrofiler som finns. Bakterieförekomst av intra- och extracellulära bakterier analyserades ej i denna studie. Den generella bilden av preparatets utseende beskrivs avseende celltäthet, cellmönster och eventuell förekomst av lösa cellkärnor, celldebris, slemstråk eller andra fynd. I denna studie lades även en uppskattning om antalet SQ till som en separat cell åtskild från SF. I ett protokoll skriver man ett streck om inga celler av den typen hittats, ett plus om enstaka hittats, två plus om det är måttlig förekomst av cellen och tre plus om man bedömer det som riklig förekomst. Därefter jämförs resultatet med en mall som ses nedan som visar hur stadierna ser ut normalt sett (Tabell 1). Löp tolkades enligt vaginalcellutstryket som östrus eller proöstrus och ej löp som anöstrus eller metöstrus.

Tabell 1. En mall för kategorisering av löpcykelstadie enligt metoden som lärs ut på SLU, tabell: Axné (2019)

Cyklusstadie	Parabasalceller	Intermediärceller	Superficialceller	Erythrocyter	Neutrofiler
Anöstrus	Enstaka till måttligt	Inga till enstaka, ibland måttligt	Inga	Inga	Enstaka
Proöstrus, tidig	Enstaka till måttligt	Måttligt	Inga till enstaka	Rikligt	Enstaka
Proöstrus, sen	Enstaka	Måttligt till rikligt	Måttligt	Rikligt	Enstaka
Östrus	Inga	Inga till max 20 %	Rikligt	Inga till måttligt	Inga
Metöstrus	Enstaka	Måttligt till rikligt	Enstaka i början, sedan inga	Enstaka till måttligt i början, sedan inga	Måttligt till rikligt i början, blir sedan färre

3.2.3 Statistiska analyser

Resultaten från avläsningsmetoderna analyserades med hjälp av statistikprogrammet Minitab i form av boxplot, individual value plot och scatterplot.

De olika gruppernas (ej i löp, i löp, kastrerad, pyometra, juvertumör, samt anöstrus, proöstrus, östrus och metöstrus) östradiolvärden jämfördes med en envägs variansanalys i Minitab.

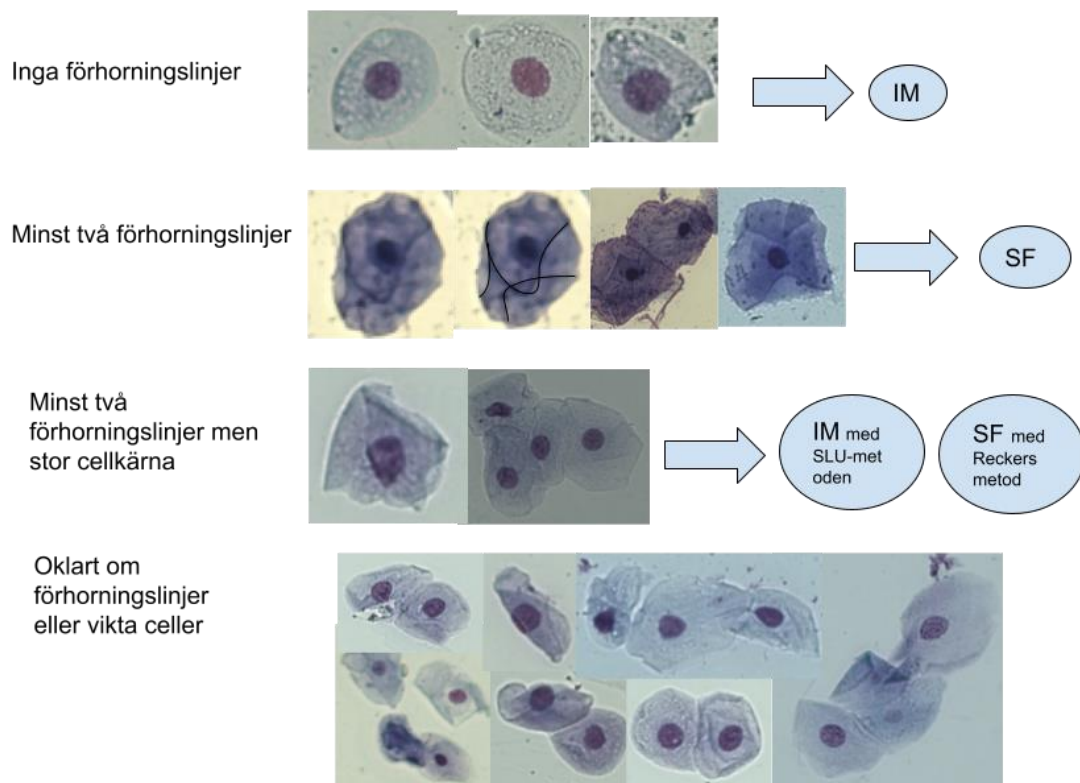
4. Resultat

Totalt analyserades prover från 66 tikar varav 23 från 2019 och 43 från 2022. Av de 66 tikarna grupperades 22 som ej i löp, 26 som i löp, fem som juvertumörer, fem kastrerade friska och åtta som pyometra. Raserna som förekom var beagle (19st), schäfer (6st), labrador retriever (4st), berner sennen (2st), flat coated retrievers (2st), pudel (2st) och vardera en av raserna american staffordshire terrier, australian shepherd, belgisk vallhund, border collie, chesapeake bay retriever, chihuahua, collie, finsk lapphund, fransk bulldog, golden retriever, golden-doodle, gråhund, jack russel, jämthund, kinesisk nakenhund, labradoodle, lapsk vallhund, petit brabancon, pomeranian, tax, tollare, västgötaspets, welsh springer spaniel, west highland white terrier och östsibirisk lajka. Även sex blandrashundar förekom i studien. Åldern varierade från 1,5 till 13 år med en medelålder på runt sju år. I anöstrus-gruppen var de flesta hundar fem år gamla och av rasen Beagle medan i de andra grupperna var ras och ålder blandat.

Från fyra av tikarna med juvertumörer erhöles PAD svar som visade benigna tumörer (adenom) hos två av dem och maligna (komplext carcinom) hos två. Tre av dessa tikar hade genomgått mastektomi förut. Av hundarna med pyometra var hälften slutna och hälften öppna och fyra löpte för två månader sen, en för fyra-fem veckor sen, en för tre månader sen, en var i sitt löp nu och en hade ej någon uppgift om senaste löp. Uppgifterna om senaste löpningen är estimerade och har erhållits genom anamnesen från djurägaren men det frågades ej om ”två månader” avser slutet eller början på senaste löpet. Med undantag för åtta av beaglarna då erhöles uppgifter om hela löpets längd och tiden är då räknad från början av senaste löpet.

4.1.1 Jämförelse mellan avläsningsmetoderna för vaginalcytologibedömning

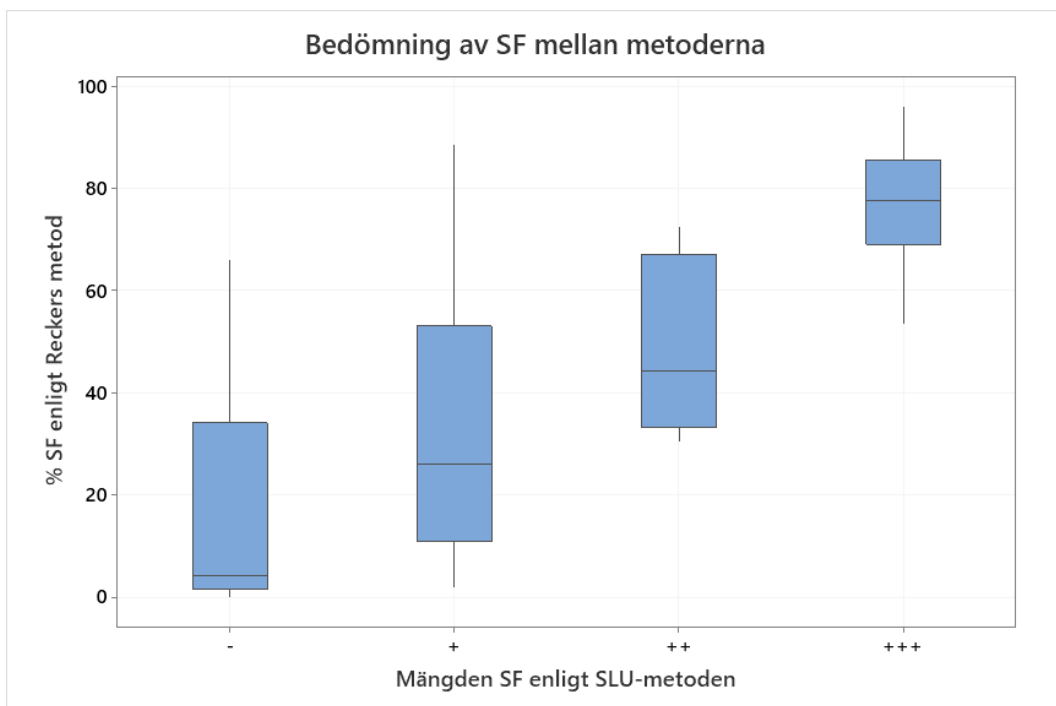
Med Reckers metod tolkades epitelceller som har fler än en förhorningslinje som SF oberoende av kärnans storlek. Kärnans storlek mättes enbart om cellen hade ingen eller liten förhorning och då räknades den som en IM om kärnan var större än 10 µm i diameter. Med metoden som lärs ut på SLU var kärnans storlek av stor vikt i bedömningen och de med större kärna bedömdes som IM och de med mindre som SF. Till följd av detta bedömdes emellanåt epitelceller med större kärna än 10 µm som IM med metoden som lärs ut på SLU men som SF med Reckers metod (Figur 3).



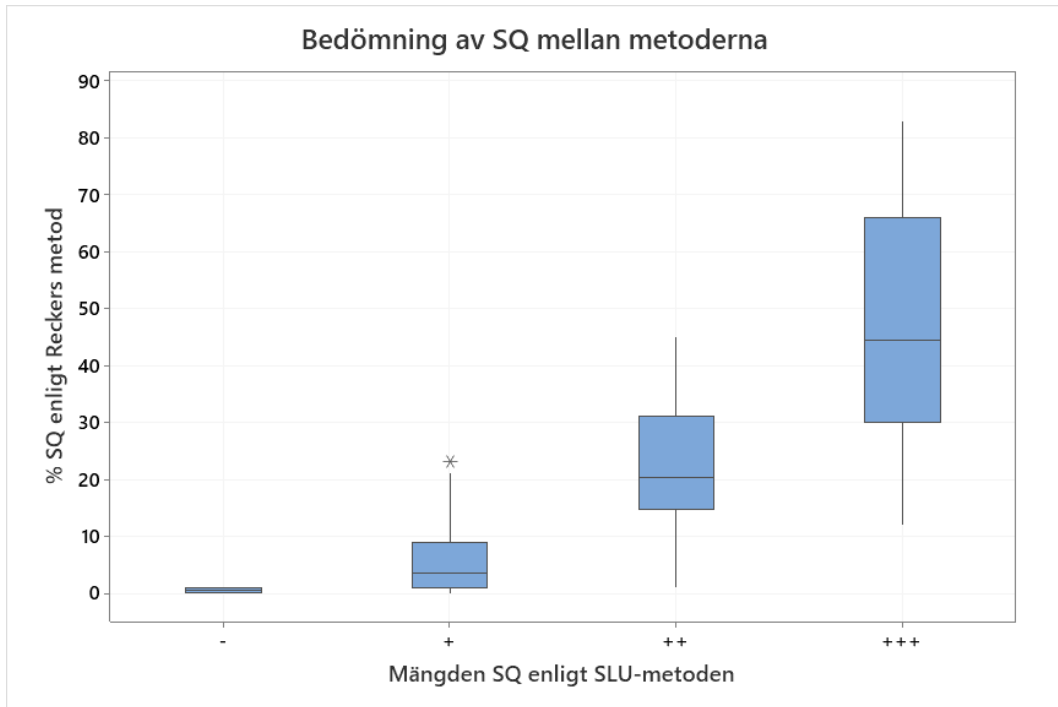
Figur 3. En beskrivning av hur bedömningen av förhorningslinjer såg ut och hur det ibland var svårt att bedöma. Bilderna är tagna från preparaten som analyserades i denna studie med hjälp av Nikon eclipse kamera.

I figurerna nedan visas hur metoderna skilde sig åt avseende andelen identifierade celler av vardera celltyp. I figur 4 kan ses att med Reckers metod identifierades betydligt fler superficialceller än med SLU-metoden. Detta medför att även i gruppen av hundar med lindrig förekomst (+) enligt metoden som lärs ut på SLU sågs upp till 60 % superficialceller med metoden enligt Reckers (Figur 4). I denna jämförelse ska dock tas i beaktan att på ena axeln visas procentandel celler och på andra axeln mängd celler vilket betyder att det ej förväntas vara en fullständig

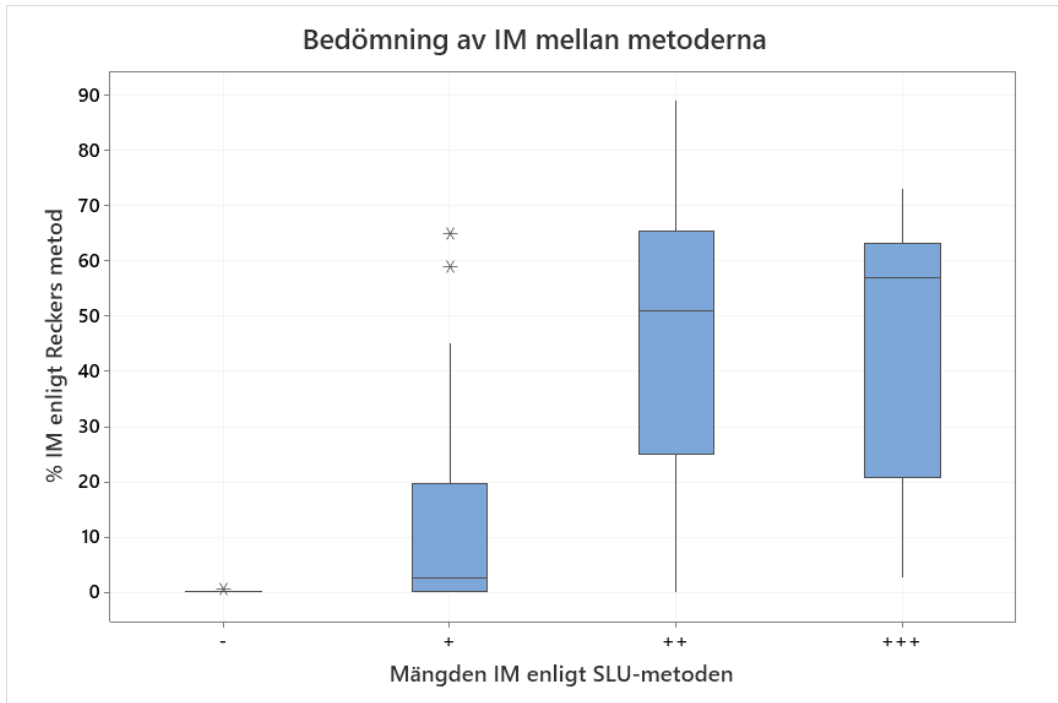
överensstämmelse. Bägge metoderna var överens gällande avsaknad av SQ-celler (Figur 5). Variationen var större när metoden som lärs ut vid SLU identifierade rikligt (+++) med SQ-celler medan proportionen celler som identifierades via Reckers metod varierade mycket i den gruppen (Figur 5). Tvärtom mot för superficialcellerna identifierades färre IM celler med Reckers metod än med metoden som lärs ut via SLU (Figur 6). Detta kan förklaras med att Reckers baserar sin bedömning på förhorningslinjer snarare än cellkärnans storlek medan SLU-metoden baserar sin bedömning på cellkärnans storlek snarare än förhorningslinjer. Överensstämmelsen mellan metoderna och bedömningen av parabasalceller kan ses i Figur 7.



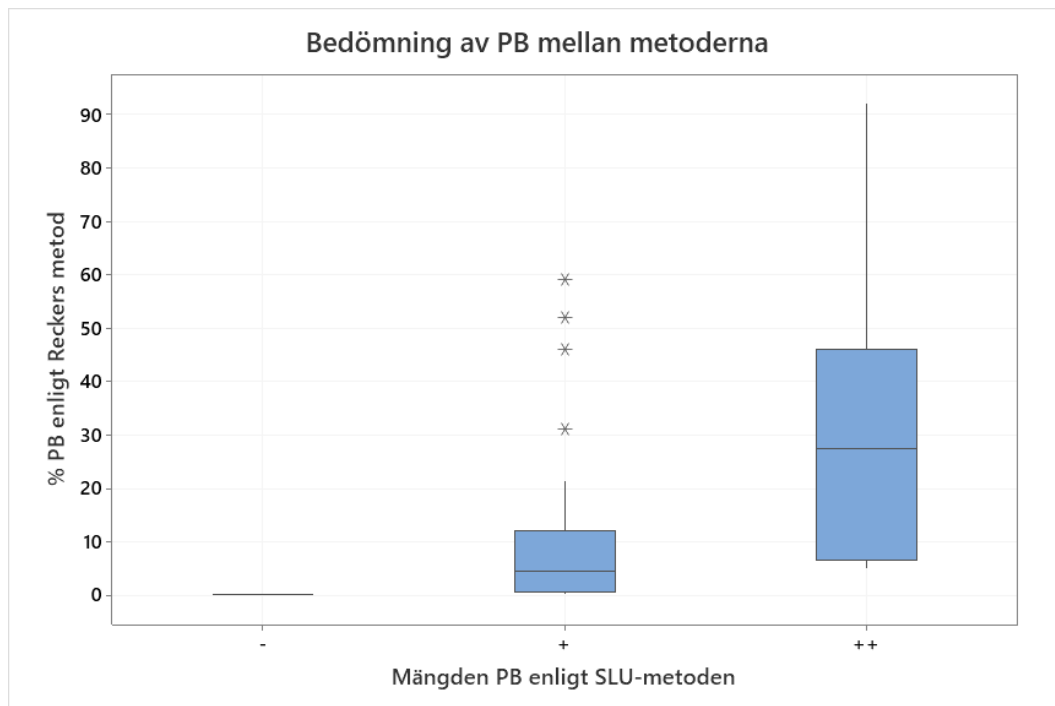
Figur 4. Jämförelse av bedömningen av superficialceller mellan metoderna. Lådorna innefattar den mittersta hälften av materialet och deras avgränsning markerar första kvartilen (Q1) och tredje kvartilen (Q3). Vågräta linjen inuti lådan markerar medianvärdet. Den vertikala linjen markerar det största och lägsta värdet.



Figur 5. Jämförelse av bedömningen av anukleära superficialceller mellan metoderna. Lådorna innefattar den mittersta hälften av materialet och deras avgränsning markerar första kvartilen (Q1) och tredje kvartilen (Q3). Vågräta linjen inuti lådan markerar medianvärdet. Den vertikala linjen markerar det största och lägsta värdet. Stjärnorna markerar avvikande värden.



Figur 6. Jämförelse av bedömningen av intermediärceller mellan metoderna. Lådorna innefattar den mittersta hälften av materialet och deras avgränsning markerar första kvartilen (Q1) och tredje kvartilen (Q3). Vågräta linjen inuti lådan markerar medianvärdet. Den vertikala linjen markerar det största och lägsta värdet. Stjärnorna markerar avvikande värden.



Figur 7. Jämförelse av bedömningen av parabasalceller mellan metoderna. Lådorna innefattar den mittersta hälften av materialet och deras avgränsning markerar första kvartilen (Q1) och tredje kvartilen (Q3). Vågräta linjen inuti lådan markerar medianvärdet. Den vertikala linjen markerar det största och lägsta värdet. Stjärnorna markerar avvikande värden.

4.1.2 Vaginalcytologbedömning enligt Reckers metod

I tabell 2 ses att av de 26 tikar som kliniskt visade tecken på löp eller anamnestiskt borde vara i löp, hade 25 en östrusbild på vaginalutstryket där cellerna bedömdes med Reckers metod och definitionen för östrus var >90 % förhornade celler. En tik som enligt anamnesen löpte visade ej någon östrusbild dvs andelen förhornade celler var <90 %. Denna tik befann sig enligt anamnesen i dag 14 i sitt löp och med metoden som lärs ut på SLU tolkades den som proöstrus. Av de 22 tikar som ej visade tecken på löp, hade 21 ingen östrusbild medan en tolkades som östrus. Detta prov var måttligt cellrikt och hade mycket celldebri, cellartefakter och vad som såg ut som lös cytoplasma som tolkades som SQ. Enligt Reckers metod hade preparatet 83 % SQ och totalt 97 % förhornade celler vilket då översteg gränsvärdet för östrus. Denna tik löpte senast för sex mån sedan. Av de kastrerade tikarna och de med juvertumörer hade ingen en östrusbild enligt denna bedömningsmetod. Av tikarna med pyometra tolkades en att vara i östrus och sju tolkades som inte i östrus. Den tiken som tolkades vara i östrus löpte för tillfället enligt anamnesen och dess preparat var mycket cellrikt.

Tabell 2. Tolkning av löpstadie med hjälp av vaginalcytologi enligt Reckers metod

Anamnes	Ej östrusbild	Östrusbild	Totalt
I löp	1	25	26
Ej tecken på löp	21	1	22
Kastrerad	5	0	5
Juvertumör	5	0	5
Pyometra	7	1	8
Totalt	39	27	66

4.1.3 Vaginalcytologibedömning enligt metoden som lärs ut på SLU

Tolkning av löpstadie enligt metoden som lärs ut på SLU presenteras i tabell 3. Av tikarna som kliniskt eller anamnestiskt bedömdes vara i löp visade vaginalcytologibilden på östrus hos 21 tikar, proöstrus hos fyra och metöstrus hos en efter bedömning med metoden som lärs ut på SLU. Tikarna som bedömdes vara i proöstrus började löpet för ca 8, 11, 14 och 15 dagar sen. Tiken som tolkades som metöstrus löpte i ca dag 11. Av tikarna som ej visade tecken på löp hade 14 en anöstrusbild, två proöstrus-, en östrus- och fem metöstrusbild. Tiken som bedömdes vara i östrus här var samma som den enda tiken ovan som bedömdes vara i östrus, med 83 % SQ enligt Reckers metod och definitionen av Bouchard *et al.* (1991). Av tikarna som ej visade tecken på löp tolkades 95 % som ej östrus med Reckers metod och Bouchards definition och 86 % som anöstrus eller metöstrus med metoden som lärs ut på SLU, resterande som proöstrus och östrus.

Av de kastrerade tikarna bedömdes tre som anöstrus, en som östrus och en metöstrus. Den som bedömdes som östrus hade rikligt med SQ och lindrigt med SF. Den som bedömdes som i metöstrus var svårbedömd och passade egentligen inte i någon kategori men var mest lik metöstrus.

Tabell 3. Tolkning enligt metoden som lärs ut på SLU

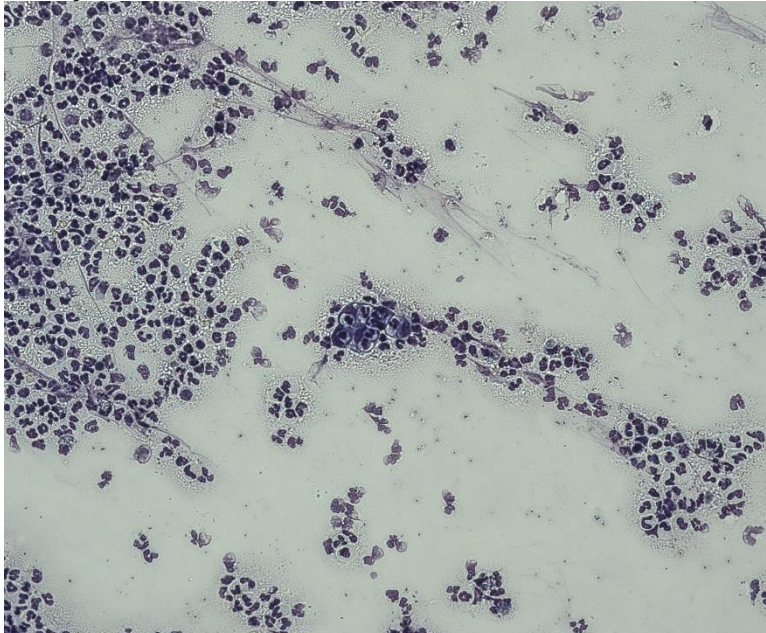
Anamnes	Anöstrus	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Totalt
I löp	0	4	21	1	26
Ej tecken på löp	14	2	1	5	22
Kastrerad	3	0	1	1	5
Juvertumör	5	0	0	0	5
Pyometra	5 (med	0	1	2	8
Totalt	neutr) 27	6	24	9	66


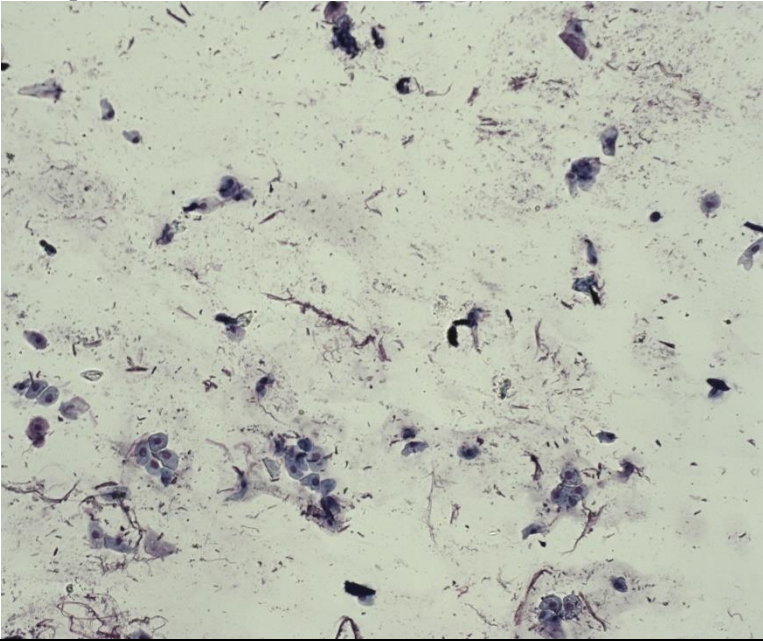
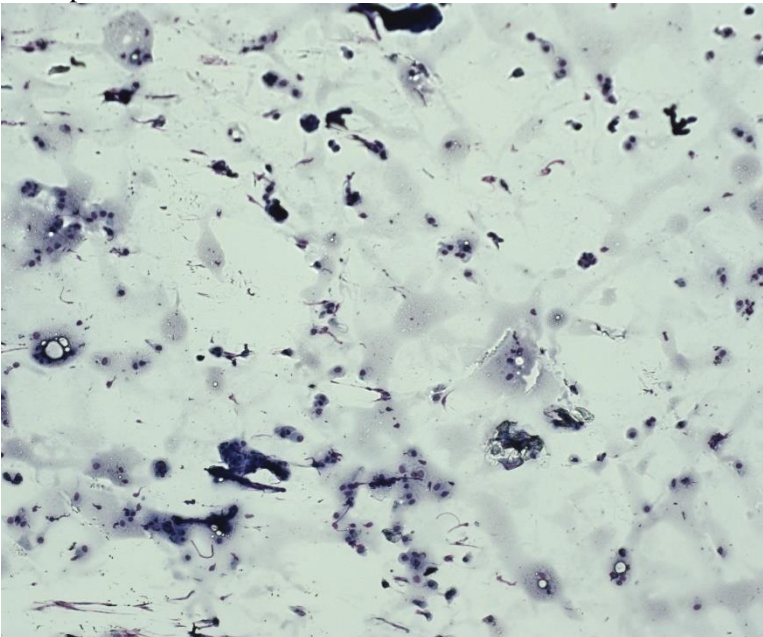
Av de med juvertumörer tolkades samtliga som anöstrus. Två av dessa var kastrerade, två löpte senast för ca två månader sedan och en saknade uppgift om

senaste löp. Av tikarna med pyometra visade fem utstryk på anöstrus, ett visade östrus och två hade ett utstryk som visade på metöstrus. Tiken i östrus var samma som i Reckers bedömning ovan och löpte för tillfället. Den ena tiken i metöstrus löpte senast för två månader sedan och den andra saknade uppgifter om senaste löpningen. Uppgifterna om senaste löpningen är estimerade och har erhållits genom anamnesen från djurägaren men det frågades ej om två månader avser slutet eller början på senaste löpet.

Den generella cytologibilden från tikarna med pyometra visade på anöstrus med ökat antal neutrofiler och degenererade celler (Tabell 4). Två tikar med pyometra hade en metöstrusbild, den ena i form av metöstrusceller och ett måttligt cellrikt preparat med måttligt med IM och neutrofiler. Avvikande från metöstrus i SLU-bedömningstabellen var dock att den hade rikligt med erythrocyter och måttligt med SQ. Den andra tiken med pyometra hade ett mycket cellrikt utstryk med rikligt med IM och neutrofiler. Avvikande från SLU-bedömningstabellen var att den hade måttligt med PB. Gemensamt för alla tikar med pyometra var att vaginalutstryken innehöll neutrofiler, såväl de öppna som de stängda pyometrorna, och en stor mängd degenererade celler.

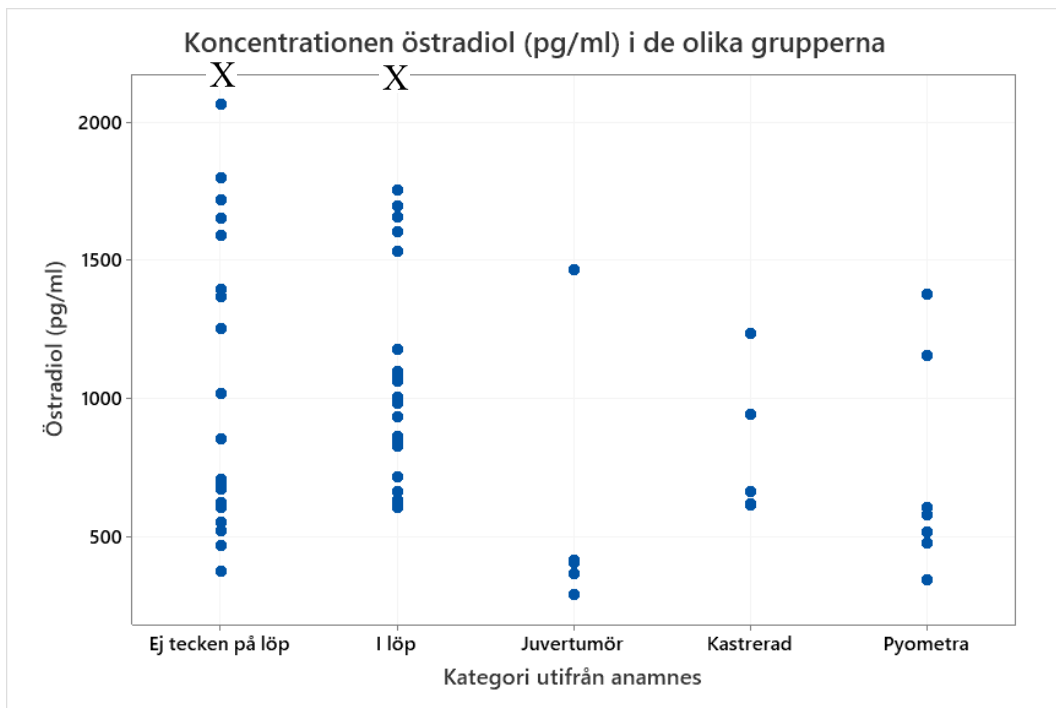
Tabell 4. Generell cytologibild hos tikarna med pyometra, juvertumörer och de kastrerade tikarna

Anamnes	Cytologibild
Pyometra	<p>Mycket cellfattigt → mycket cellrikt Enstaka → rikligt med degenererade neutrofiler Inga → rikligt med erythrocyter Celldebri, slemstråk, slemtrådar, extracellulära bakterier Exempel:</p> 

	<p>Metöstruscell: </p>
<p>Juvertumörer</p>	<p>Mycket cellfattigt- måttligt cellrikt Inga → enstaka neutrofiler Celldebri, lösa cellkärnor, slemtrådar Exempel: </p>
<p>Kastrerade</p>	<p>Mycket cellfattigt- måttligt cellrikt Inga → enstaka neutrofiler Celldebri, lösa cellkärnor, slemtrådar Exempel: </p>

4.1.4 Jämförelse av östradiolkoncentrationen mellan de olika grupperna

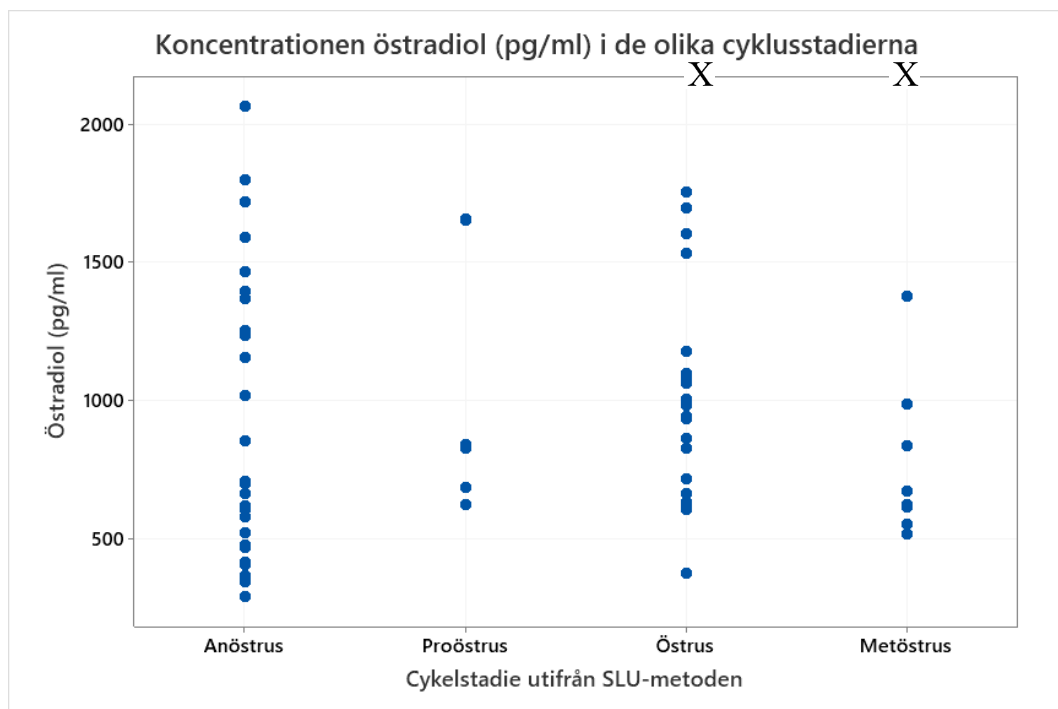
Hos tikarna utan tecken på löp var medianvärdet av östradiolkoncentrationen 852 pg/ml med stor spridning (375–3437 pg/ml). Hos tikarna med tecken på löp var medianen 982 pg/ml (spridning: 603–5695 pg/ml). Tikarna med juvertumörer hade en median på 407 pg/ml (spridning: 288–1464 pg/ml). De två tikarna med benigna tumörer (adenom) enligt PAD-svaret hade ett östradiolvärde på 288 respektive 412 pg/ml. De två tikarna med maligna tumörer (komplext carcinom) enligt PAD hade ett östradiolvärde på 365 respektive 1464 pg/ml (Figur 8). Tiken med högst koncentration hade flera tumörer och genomgått mastektomi tidigare. De kastrerade tikarna hade en median på 662 pg/ml (spridning: 612–1236 pg/ml) och tikarna med pyometra hade en median på 547 pg/ml (spridning: 345–1378 pg/ml). De två tikarna med pyometra som hade högst östradiolvärde bedömdes vara i metöstrus och anöstrus och den med lägst värde bedömdes vara i anöstrus.



Figur 8. Jämförelse av koncentrationen östradiol (pg/ml) mellan de olika grupperna. Två mycket höga östradiolvärden, en hos en tik utan tecken på löp (3437 pg/ml) och en hos en tik i löp (5695 pg/ml) visas endast som kryss i ovankant.

Östradiolkoncentrationerna jämfördes också mot vaginalcytologiska bilden och skiljde sig inte märkvärdt mellan de olika löpstadierna. Östradiolkoncentrationen hos tikarna som bedömdes som anöstrus med metoden som lärs ut på SLU hade som medianvärde 696 pg/ml (spridning: 288–2066 pg/ml). I proöstrus låg medianen på 835 pg/ml (spridning: 624–1657 pg/ml). I östrus var medianen 942 pg/ml (sprid-

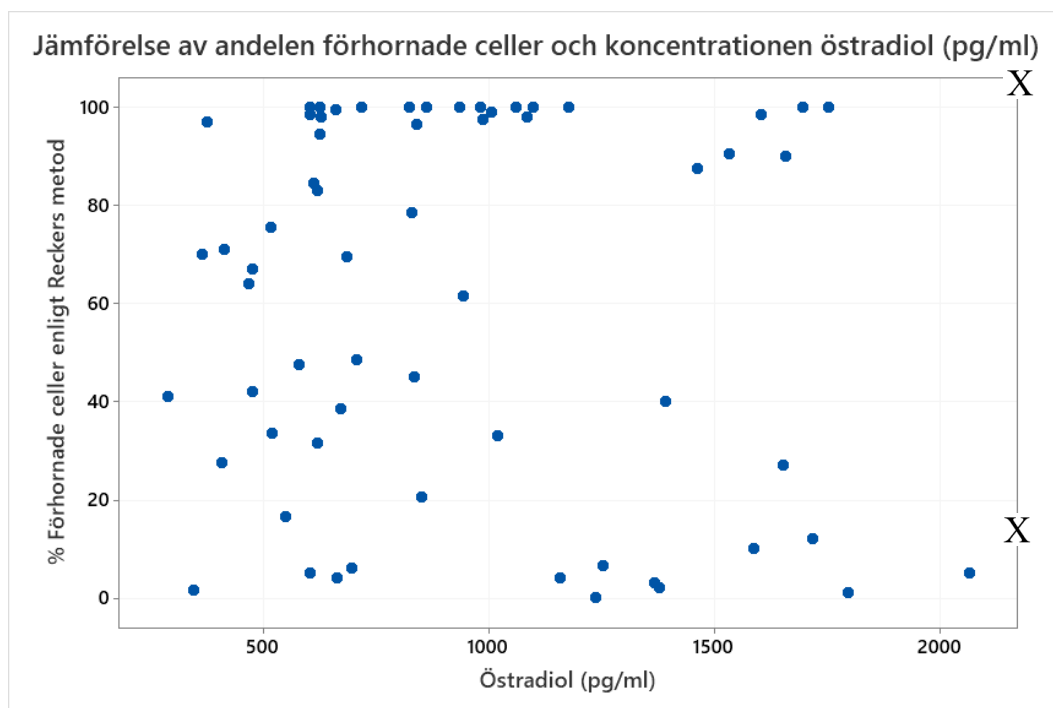
ning: 375–5695 pg/ml). Metöstrus-tikarna hade ett medianvärde på 646 pg/ml (spridning: 516–3437 pg/ml) (Figur 9).



Figur 9. Jämförelse av koncentrationen östradiol (pg/ml) i de olika cyklusstadierna. Två mycket höga östradiolvärden på 3437 pg/ml i metöstrus och 5695 pg/ml i östrus visas endast som kryss i ovankant.

Det var ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentration mellan grupperna med olika diagnoser ($P=0,14$) eller cyklusstadier ($P=0,7$) enligt en envägs variansanalys i Minitab.

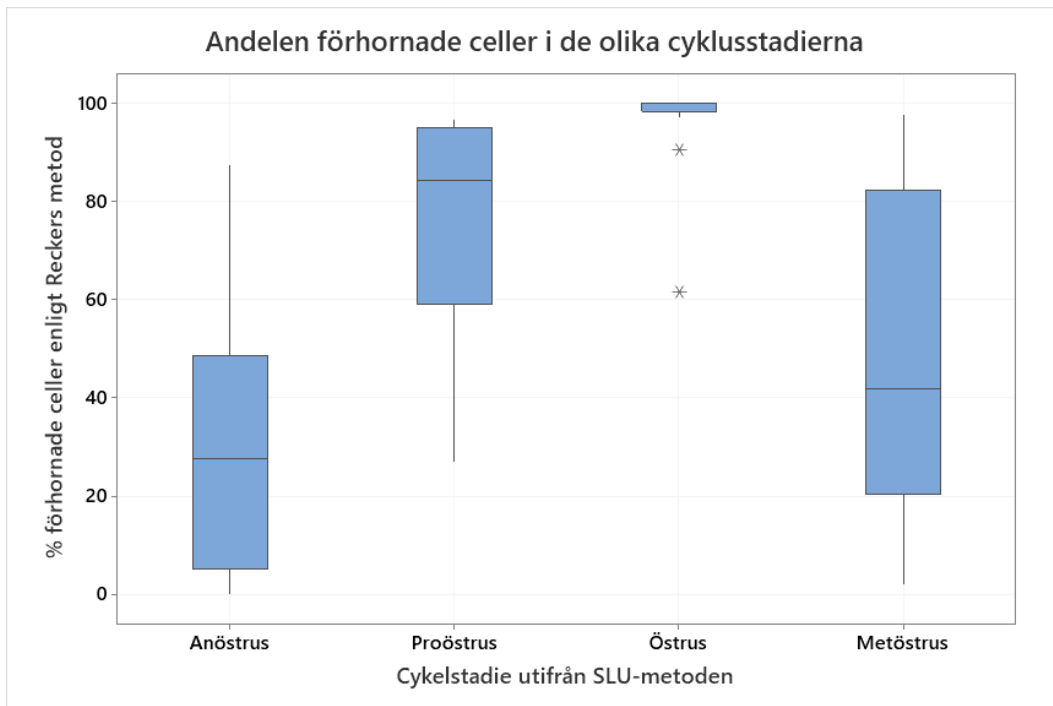
Proportionen förhornade celler (SF+SQ) enligt Reckers metod, som baserades på förhorningslinjer, mot koncentrationen östradiol presenteras i Figur 10. Inget samband sågs mellan koncentrationen av östradiol och andel förhornade celler räknade med Reckers metod.



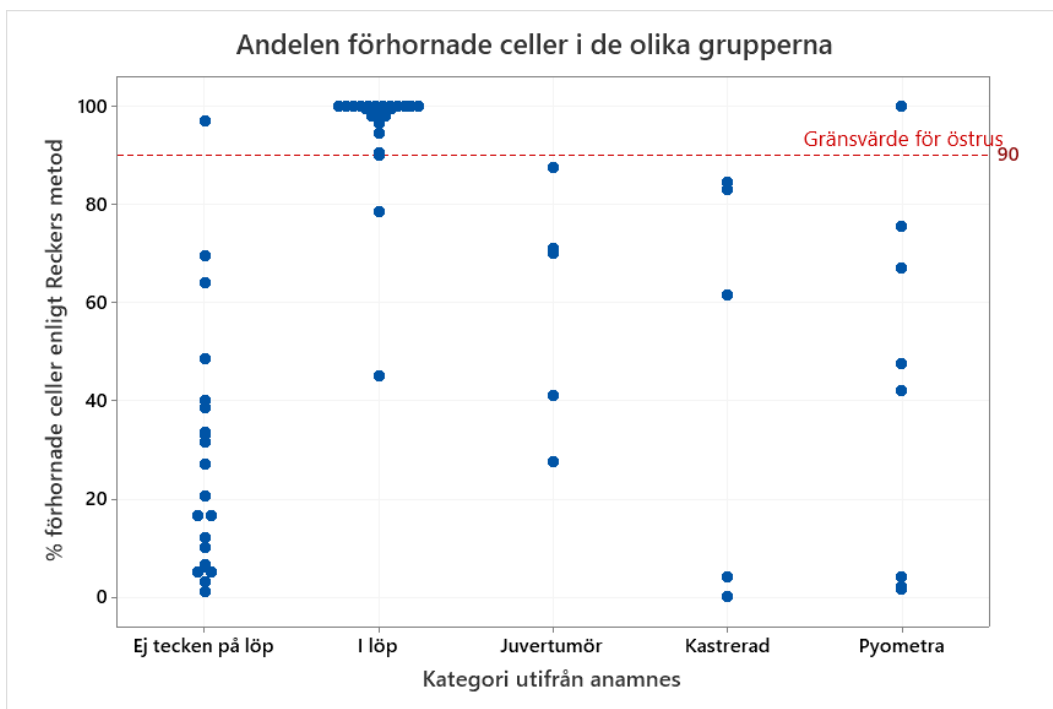
Figur 10. Jämförelse av andelen förhornade celler enligt Reckers metod i förhållande till koncentrationen östradiol (pg/ml). Två mycket höga östradiolvärden på 3436 pg/ml och 5695 pg/ml visas endast som kryss i högerkant. Värdet på 3436 pg/ml hade 16,5 % förhornade celler enligt Reckers metod och värdet på 5695 pg/ml hade 100 % förhornade celler.

4.1.5 Frekvens förhornade celler hos de olika grupperna

Graden av östradiolpåverkan på vaginalepitelet undersöktes genom att räkna andelen förhornade celler på vaginalutstryken. Figureerna 11 och 12 nedan visar andelen förhornade celler bedömda enligt Reckers metod mot cyklusstadie enligt metoden som lärs ut på SLU och grupperade efter anamnesen. Observera att metodernas definition av SF och SQ skiljer sig. Andelen förhornade celler med Reckers metod ökade från det SLU-metoden definierade som anöstrus till proöstrus och var som högst under östrus för att sedan minska igen under metöstrus (Figur 11). Andelen förhornade celler varierade från hög till låg vid samtliga diagnoser, förutom hos tikar i löp som konsekvent hade en proportion av förhornade celler >40 % och majoriteten >90 % (Figur 12).



Figur 11. Jämförelse av andelen förhornade celler enligt Reckers metod i de olika cyklusstadierna. Lådorna innefattar den mittersta hälften av materialet och deras avgränsning markerar första kvartilen (Q1) och tredje kvartilen (Q3). Vågräta linjen inuti lådan markerar medianvärdet. Den vertikala linjen markerar det största och lägsta värdet. Stjärnorna markerar avvikande värden.



Figur 12. Jämförelse av andelen förhornade celler enligt Reckers metod i de olika anamnesgrupperna. De individuella värdena visas och gränsvärdet för östrus på 90 %.

5. Diskussion

I den här studien undersöktes vaginalutstryk och östradiolkoncentration hos 53 friska tikar i olika cyklusstadier, samt 13 tikar med pyometra eller juvertumörer.

5.1.1 Jämförelse av avläsningsmetoderna för vaginalcytologibedömning

Med Reckers metod gjordes enbart bedömningen östrus eller ej östrus då metoden endast var skapad för cellbedömning och inte hade riktlinjer för kategorisering i de olika löpcykelstadierna. Ett gränsvärde för östrus drogs vid >90 % förhornade celler (SF+SQ) enligt definitionen från Bouchard *et al.* (1991). Med denna gräns var samstämmigheten med anamnesen för tikar i löp ca 93 % enligt data från tabell 1, vilket motsvarade två felbedömda i figur 12. Samstämmigheten för tikar utan tecken på löp var ca 95 % vilket motsvarade en felbedömd. Alla de kastrerade tikarna, tikarna med juvertumör och tikarna med pyometra bedömdes utifrån dessa kriterier att inte ha någon östrusbild förutom en tik med pyometra som vid provtagningen fortfarande befann sig i löp. I figur 12 kan ses att denna brytpunkt på 90 % förhornade celler lämpade sig bra för att bedöma östrus i detta material.

Med metoden som lärs ut på SLU gjordes en helhetsbedömning av preparatet och en kategorisering av löpcykelstadie utifrån uppskattat antal celler i vaginalutstryket. Räkning av procentuell fördelning av olika celltyper utfördes inte. Till skillnad från Reckers metod inkluderades även erythrocyter och neutrofiler i bedömningen samt ett allmänt intryck av cellutstryket avseende celltäthet, cellernas utseende och cellmönster. Detta gjorde det möjligt att dela in preparaten i de olika löpcykelstadierna och på så sätt är metoden mer applicerbar i den kliniska verksamheten. Att bedöma cellutstryket med metoden som lärs ut på SLU gick fortare, var enklare och krävde mindre avancerad utrustning i och med att cellerna ej behövde mätas. Den främsta nackdelen med metoden som lärs ut på SLU är att bedömningen blir subjektiv och det finns inga objektiva mått på hur preparaten ska bedömas. En studie av Moxon *et al.* (2010) visade att det är väldigt låg samstämmighet mellan olika veterinärer i bedömningen av vaginalutstryk och att det därför bör finnas en kvalitetskontroll.

Samstämmigheten mellan metoderna vid bedömning av celltyp och deras antal var lägst avseende SF. I ett av preparaten kunde inga SF noteras med metoden som lärs ut på SLU och 66 % SF med Reckers metod. Detta utstryk kom från en tik med pyometra och dessa var generellt mer svårbedömda pga fler degenererade celler. En förklaring till att antalet SF i många fall skattades högre med bedömning av Reckers metod än metoden som lärs ut på SLU, var att i Reckers avläsningsmall ska alla celler med två eller fler förhorningslinjer bedömas som SF oberoende av kärnans storlek. Förhorning är steget före kärnans storlek i bedömningsmallen. Förhorningslinjer är dessutom inte lätta att skilja från linjer skapade av att cellerna är vikta eller ihopskrynkade vilket kan ha gjort att många celler felaktigt klassificerats som SF men egentligen varit IM. Med metoden som lärs ut på SLU däremot görs en sammanvägning av hela cellens utseende och metoden ger mer utrymme för subjektiv bedömning. Med Reckers metod bedömdes epitelceller som hade flera förhorningslinjer och stor kärna som SF, men enligt flera författare ska SF ha en pyknotisk kärna (Christie *et al.* 1972; Pérez *et al.* 2005; Aydin *et al.* 2011). Om man följer Reckers metod kan det leda till att IM felklassificeras som SF, vilket ger en övertolkning av SF i vissa prover.

Effekten av denna övertolkning av SF är dock inte så stor i denna studie då preparaten bedömdes enbart som östrus eller ej östrus med Reckers metod och resultatet visade att det fanns bara ett vaginalutstryk som tolkades som östrus utan att vara det. Däremot om Reckers cellbedömning skulle användas ihop med en helhetsbedömning av preparatet för att klassificera löpcykelstadium, skulle det kunna bli fel. Till exempel fanns det ett anöstrus-preparat där 65 % av cellerna klassificerades som SF med Reckers metod. Med så hög procentandel SF hade nog preparatet ej bedömts som anöstrus. Övertolkningen var sannolikt lägst i östrus-preparaten där IM var sällsynta, och störst i de preparaten med flest IM som då kunde missbedömas som SF.

Bedömningen av IM och PB hade högre samstämmighet mellan metoderna än SF. Måttlig förekomst (++) av IM enligt metoden som lärs ut på SLU visade sig ha högre %-andel än riklig (+++) enligt Reckers metod. En förklaring till detta kan vara att även om 89 % av 100 räknade celler bedöms som IM betyder inte detta att det finns en riklig förekomst, då preparatet kan vara mycket cellfattigt och cellerna därmed väldigt utspridda. Det gör denna jämförelse något missvisande. Båda metoderna kom dock i de flesta fall fram till samma tolkning av löpcykelstadie och en tolkning som överensstämde med anamnesen.

5.1.2 Jämförelse av östradiolkoncentrationen

Östradiolkoncentrationen hos tikarna mättes med hjälp av en ELISA; Assay Genie Canine Estradiol (E2) ELISA Kit (Dublin, Irland). Det finns ingen publicerad valideringsstudie av denna ELISA.

Östradiol ska normalt sett vara som högst i proöstrus då hormonet har sin topp (Concannon 2011). I denna studie visade dock resultatet ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentration mellan olika cyklusstadier vilket var oförväntat. Det kan bero på felkällor såsom att proverna har bedömts till fel cyklusstadium eller att fel östradiolvärde uppmätts. Då längden på proöstrus och östrus varierar mycket tikt emellan, finns det många som är bedömda som östrus som anamnestiskt sett skulle kunna befinna sig i proöstrus. Östradiol toppar normalt i sen proöstrus, det vill säga i nära anslutning till östrus. Östradioltoppen varierar dock mellan tikt (Nelson & Couto 2020) vilket kan ha gjort att tidpunkten för toppen missats vid det enstaka provtagningstillfället. En annan förklaring kan ligga i att förhorningsgraden når sitt maximum en till sex dagar före LH-toppen, vilket inträffar någon dag efter östradiol-toppen (Concannon 2011). Det betyder att preparatet kan vara helt förhornat och bedömas som östrus innan östradiol haft sin topp. En möjlighet är även att ELISA-metoden som användes inte fungerar optimalt för hund och att den mäter in något annat också.

Trots de relativt höga östradiolvärdena i anöstrus sågs inga tecken på östradiolpåverkan hos tikarna, såsom svullen vulva eller hemorragisk flytning, eller på vaginalcytologiutstryket i form av hög andel förhornade celler. Liknande resultat sågs i en studie av Olson *et al.* (1982) och där diskuterades om receptorerna möjligen behöver tid på sig att reagera på de ökade koncentrationerna av östradiol. På katt har det visats att de cytologiska förändringarna i vagina kommer några dagar efter de hormonella (Holst *et al.* 2000). Då östradiol endast mättes vid en tidpunkt i denna studie finns ingen vetskap hur länge de varit höga. Höga koncentrationer av östrogen i anöstrus, ibland högre än proöstrus, har även påvisats i andra studier (Mellin *et al.* 1976; Graf 1978). I dessa studier har det dock ej varit specificerat att just östradiol-17 β var högt vilket betyder att det kan ha varit andra östrogener som var förhöjda som hade mindre påverkan på vaginalepitelet.

Hos de kastrerade tikarna varierade östradiolkoncentrationerna från 612 till 1236 pg/ml. Det är liknande nivå som de andra grupperna vilket visar att ett enskilt östradiolvärde ej kan användas för att skilja kastrerade tikt från tikt i anöstrus. Detta stämmer överens med resultatet från en studie av Frank *et al.* (2003), som diskuterar att det kan bero på att östradiol har samma produktionskälla hos dessa tikt; aromatisering av androstendion och testosteron i perifer vävnad (Nelson & Bulun 2001). Tikarna i anöstrus hade östradiolkoncentrationer med störst spridning

och de varierade från 375 till 3437 pg/ml. Provet med lägst östradiol hade en vaginalcytologibild av rikligt med SQ (anukleära superficialceller), men en av de kastrerade tikarna som också hade rikligt med dessa celler hade istället relativt högt östradiol, vilket innebär att det är svårt att dra någon slutsats kring kopplingen mellan SQ och östradiolkoncentrationen.

Resultatet visade ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentration mellan de friska tikarna och tikarna med pyometra och juvertumörer. Fyra av fem tikar med juvertumörer hade värden under 413 pg/ml vilket gör deras genomsnittliga värde lägst bland alla grupperna. Detta går emot resultatet från studien av Querioga *et al.* (2005) som uppmätte högre nivåer hos tikar med juvertumörer än hos friska hundar i anöstrus. En tik hade en mycket hög koncentration (1464 pg/ml) och ett komplext karcinom, men även en tik med låg koncentration hade ett komplext karcinom, så det är svårt att dra en koppling mellan högt östradiol och malignitet utifrån detta resultat. Antalet hundar i studien av Querioga *et al.* (2005) var dock betydligt högre, totalt 80 hundar med juvertumörer jämfört med fem i denna studie, vilket gör deras resultat mer tillförlitligt. Dessutom jämfördes östradiolvärdena från juvertumörerna ej med tikar i samma cykelstadie i denna studie tillskillnad från deras studie. Det är möjligt att olika löpcykelstadie, spridningen på typ av juvertumörer samt det låga antalet i vårt material påverkat resultaten.

Östradiolkoncentrationerna hos tikarna med pyometra varierade från 345 till 1378 pg/ml vilket är liknande nivåer som de friska tikarna. Detta stämmer med tidigare studiers resultat som visat att östrogennivåerna hos tikar med CEH-pyometra ej är högre än normalt (Hadley 1975; Hagman 2018). Det finns studier som har visat på signifikant högre nivåer vid CEH-pyometra (Ververidis *et al.* 2004) men detta kunde ej ses i denna studie. De två tikarna med pyometra och högst östradiolvärde bedömdes vara i metöstrus och anöstrus och den med lägst värde i anöstrus, vilket betyder att ingen koppling kan dras till löpcykelstadie. En av tikarna med pyometra befann sig i löp och denna hade en östradiolnivå på 603 pg/ml vilket är i nivå med de friska tikarna som befann sig i löp. I detta material finns därmed inga tecken på att östradiol är en bra indikator för juvertumörer eller pyometra. Tikarna som jämfördes var dock ej i samma fas i löpcykeln vilket annars hade varit önskvärt för att få en rättvisare jämförelse.

Det finns normalt en stor normalvariation i östradiol både mellan individer och inom samma individ (Frank *et al.* 2010) vilket kan förklara det spretiga resultatet i denna studie och gör det svårt att jämföra och dra slutsatser. En orsak till detta är att östradiol produceras även i binjurarna och många extraglandulära vävnader till exempel fettvävnad och huden (Nelson & Bulun 2001). Av den anledningen verkar inte östradiol ensamt vara tillförlitligt nog för att diagnostisera olika sjukdoms-

tillstånd, kategorisera hundar i olika löpcykelstadier eller skilja intakta från kastrerade tikar.

5.1.3 Frekvens förhornade celler på vaginalutstryken

Vid jämförelse av koncentrationen östradiol och procentandelen förhornade celler på vaginalutstryken (SF+SQ) räknade med Reckers metod sågs inget samband när resultaten bedömdes i grafer. Det betyder att i denna studie speglar ej cellbilden östradiolkoncentrationen i blodet. En anledning kan vara att Reckers metod gav en övertolkning av SF hos vissa tikar. I vissa fall var det svårt att avgöra om cellen hade förhorningslinjer eller var ihopskrynkad av ovarsam provhantering. Dessa celler kan då ha felbedömts som SF fast att de i själva verket var IM och det blir då fel när östradiol jämförs med icke förhornade celler. En annan anledning kan vara en suboptimal östradiolmetod. Östradiolmetoden kanske mäter in något annat också.

Resultatet visar ingen tydlig östradiolpåverkan i form av stor andel förhornade celler på vaginalutstryket hos tikarna med sjukdomstillstånden juvertumör och pyometra. Detta trots att Reckers metod sannolikt övertolkat andelen förhornade celler i preparaten. Även om tre av tikarna med dessa sjukdomstillstånd hade en östradiolkoncentration på >1000 pg/ml kunde ingen östrusbild ses på deras utstryk. I tabell 1 ses att endast en av åtta tikar med pyometra hade en östrusbild. Denna pyometra-tik var dock i lopp vid provtagningen vilket betyder att ingen koppling mellan högt östradiol och sjukdomstillståndet kan dras i detta fall. Vid SLU-bedömningen hade alla tikarna med juvertumörer och fem av åtta tikar med pyometra en anöstrusbild. Tikarna med pyometra visade dock på anöstrus med neutrofilinflammation och degenererade celler. Gemensamt för alla tikar med pyometra var att vaginalutstryken innehöll neutrofiler, såväl de öppna som de stängda pyometrorna, och en stor mängd degenererade celler.

Vaginalcytologibilden för tikarna med pyometra stämde på det stora hela överens med litteraturen. Degenererade neutrofiler, proteinhaltig debri samt intra- och extracellulära bakterier kan ses vid pyometra enligt Nelson & Couto (2020). Bakterieförekomst av intra och extracellulära bakterier analyserades ej i denna studie men hade varit intressant hos hundarna med pyometra. Huruvida det fanns makrofager, plasmaceller och lymfocyter, som beskrivs av Hagman (2018) är svårt att säga då de flesta celler var degenererade vilket gör att dessa kan ha tolkats som epitelceller. Enligt Llazani *et al.* (2021) ska det vid pyometra finnas flest PB av epitelcellerna men det sågs bara i ett prov. Resterande prover hade fler IM vilket kunde finnas i mindre mängd enligt Llazani *et al.* (2021). Det kunde ej ses fler PB vid öppen pyometra än vid stängd, såsom beskrivits av Llazani *et al.* (2021), men för att undersöka det vidare hade ett större antal hundar behövts.

Vaginalcytologiutstryken hos de kastrerade tikarna visade ingen östrusbild med Reckers metod och med definitionen att östrus är >90 % förhornade celler. Med metoden som lärs ut på SLU bedömdes alla som anöstrus utom två vaginalutstryk som var svårbedömda. Dessa två preparat var måttligt cellrika med celldebris och lösa cellkärnor. Det ena innehöll rikligt med SQ, måttligt med SF och IM och enstaka PB och neutrofiler vilket bedömdes som mest likt metöstrus, men skulle också kunna vara proöstrus. En förklaring kan vara att detta prov togs utan spekulum vilket kan göra att andra celler kommer med i cytologin och försvårar bedömningen (Bouchard *et al.* 1991). Östradiolnivån hos denna tik var lägst bland de kastrerade men skilde sig ej mycket från de andra. Det andra utstryket innehöll rikligt med SQ och enstaka SF, IM och PB och bedömdes då som mest likt östrus då SQ räknas som slutstadiet i förhorningen orsakad av östradiol (Olson *et al.* 1984; Moxon *et al.* 2010). Östradiolnivån hos denna tik var näst högst bland de kastrerade vilket möjligen skulle kunna förklara den höga förhorningsgraden. Helhetsbilden var dock ej typisk för östrus.

Vaginalcytologin visade ingen skillnad på kastrerade och anöstrala tikar. Majoriteten visade anöstrus-utstryk enligt metoden som lärs ut på SLU eller ej östrusbild enligt Reckers metod. I och med att östradiolnivåerna mellan kastrerade och anöstrala ej skilde sig heller är detta förklarligt. Detta stämmer även överens med studien av Rota *et al.* (2020) som inte såg någon östrogenpåverkan hos de kastrerade tikarnas vaginalutstryk. Ett av utstryken skiljde sig från de övriga och innehöll rikligt med SQ och enstaka SF och IM. Det var måttligt cellrikt och hade mycket celldebris, cellartefakter och vad som såg ut som lös cytoplasma som tolkades som SQ. Enligt Reckers cellbedömningsmetod innehöll preparatet 83 % SQ och 97 % förhornade celler vilket då tolkades som östrus. I en studie av Olson *et al.* (1982) uppvisades dock att tikar i anöstrus kan även de ha hög andel SF, upp till 60 %. Östradiolnivån hos denna tik var det lägsta av alla anöstrala tikar och tiken skiljde sig inte anamnestiskt från de andra anöstrala tikarna. En förklaring till detta utseende är därför svår att komma med men kan vara kopplat till hur provet är taget exempelvis om det var utan spekulum och andra celler följde med. Detta prov är från 2019 och finns ej dokumenterat exakt hur det togs. Större material samt större studiepopulation behövs för att dra slutsatser kring detta men det verkar som att en stor andel SQ och en mindre andel SF kan finnas i utstryk från friska tikar som ej löper.

Tikarna i gruppen ”i löp” förväntades ha ett proöstrus- och östrusutstryk och tikarna i gruppen ”ej i löp” förväntades ha ett anöstrus- eller metöstrusutstryk enligt kriteriet för löp i denna studie. Resultatet visade att alla utstryk förutom ett (25 av 26 = 96 %) från tikarna som var i löp tolkades som östrus- eller proöstrusutstryk med båda metoderna. Den som ej tolkades som löp med Reckers metod bedömdes till proöstrus med metoden som lärs ut på SLU och löpte i dag 14. Den som ej

tolkades som löp med metoden som lärs ut på SLU bedömdes till metöstrus och löpte i runt dag 11 vilket betyder att tiken nog var i övergången mellan faserna. Av tikarna som ej var i löp tolkades 95 % som ej östrusbild med Reckers metod och 86 % som anöstrus eller metöstrus med metoden som lärs ut på SLU, resterande som proöstrus och östrus. En förklaring till att anamnesen inte alltid stämde överens med vaginalcytologibilden kan vara att ägarna ej noterat att tiken är i löp och en del tikar visar endast subtila tecken eller inga tecken alls på att de är i löp, så kallade tysta löp. Ägarna tillfrågades ej vilka tecken på löp de sett hos sina tikar, men gissningsvis var det att tiken slickar sig mycket och att de sett hemorragisk flytning eller bloddroppar på golvet, men inte säkert blodet kom från vulva och tiken kan ha slickat sig av andra orsaker.

Enligt studien av Lindh *et al.* (2022) räcker det inte att enbart klassificera löpcykelstadium utifrån den kliniska och endokrinologiska bilden. Studiens resultat visade att i östrus hade de kliniska, endokrinologiska och vaginalcytologiska fynden bristfällig överensstämmelse med de histomorfologiska bilden av ovarie- och uterusvävnadsprov, som ansågs bäst representera tikens sanna löpcykelstadie. I studien poängteras svårigheten att klassificera löpcykelstadium då det finns individuella skillnader som inte alltid speglar den morfologiska statusen av reproduktionsorganen (Lindh *et al.* 2022).

Högst andel förhornade celler (SF+SQ) enligt Reckers metod återfanns i proverna som bedömdes som östrus och proöstrus. Det är i enlighet med studien av Concannon (2011) som skriver att förhorningsgraden är som högst en till sex dagar innan LH-toppen, som i sin tur inträffar någon dag efter östradioltoppen. Även prover från anöstrala tikar innehöll rikliga mängder förhornade celler enligt bedömningen med Reckers metod. Som tidigare nämnt överestimerade dock Reckers metod andelen SF. Detta gjorde i vilket fall att det var svårt att dra ett gränsvärde för anöstrus då andelen förhornade celler i preparaten från tikarna som ej visade tecken på löp sträckte sig upp till 97 %. I de utstryk som bedömdes som anöstrus, enligt metoden som lärs ut på SLU, var procentandelen förhornade celler, enligt Reckers metod, uppemot 87,5 % med flera värden på 80 och 70. Dessa preparat tolkades som anöstrus med metoden som lärs ut på SLU eftersom de endast innehöll enstaka förhornade celler och var måttligt cellfattiga med lösa cellkärnor, slemtrådar och celldebris.

5.1.4 Felkällor

Det finns ett antal felkällor i denna studies utförande som kan ha påverkat resultatets validitet. Även om Reckers metod gav en objektiv bedömning av cellernas utseende upptäcktes brister som gjorde att celler med stor cellkärna och förhorningslinjer bedömdes som SF fast att de i själva verket mest troligt var IM. Hur stor denna

övertolkning var är svårt att säga men effekten av det var ej särskilt stor i denna studie vid bedömning av östrus. Vid jämförelse av andelen förhornade celler och östradiol blir det dock missvisande. Bättre hade därför varit att jämföra östradiol med mängden förhornade celler enligt metoden som lärs ut på SLU men det var svårt att åskådliggöra i grafer.

En annan felkälla var att proverna togs med olika provtagningsteknik, material och av olika personer, även om vi försökte i den mån det gick att göra på samma sätt. De gamla proverna från 2019 finns ej dokumenterat hur de togs men proverna från 2022 togs i princip alla av undertecknad och med spekulum. Spekulum rekommenderas av bland annat Bouchard *et al.* (1991) för att undvika att få med celler från andra delar av vagina. När prover tas och hanteras på fel sätt kan det göra att de ej är representativa för de hormonella förändringarna (Goodman 2001), men då det finns flera olika tekniker rapporterade är det svårt att veta vad som är rätt sätt. Det finns inga studier publicerade än såvitt undertecknad sett som jämför tillförlitligheten av olika provtagningsmetoder för vaginalcytologi på hund.

Olika provtagningsteknik kan påverka till exempel celltätheten, cellernas mönster, hur många degenererade celler som finns och andra celler som kommit med från djupare lager. Vid bedömning av anöstrus lades stor vikt vid celltätheten men i vilken grad topsen fångat upp celler från slemhinnan samt sättet den rullats ut på glaset, har rimligen betydelse för celltätheten i preparatet. I en del fall fuktades topsen innan provtagning eller tiken hade mycket flytning vilket kan ha påverkat celltätheten. Provtagningstekniken kan också ha påverkat bedömningen av förhornade celler då antalet förhorningslinjer var avgörande i bedömningen. Om pinnen rullades ut lite ovarsamt och många av cellerna blev ihopskrynkade, kan de vikta linjerna tolkats som förhorningslinjer och andelen SF ha överskattats ytterligare.

En styrka i denna studie är att preparaten bedömdes av samma person och att det var blindat. Första bedömningen gjordes strikt efter en mall och sedan enligt metoden som lärs ut på SLUs protokoll. Vaginalcytologibedömningen med metoden som lärs ut på SLU var mer subjektiv än med Reckers metod. Å andra sidan görs en helhetsbedömning av utstryket vid metoden som lärs ut på SLU. En felkälla i avläsningen är att preparaten bedömdes av undertecknad som från början var en oerfaren vaginalcytologiavläsare. Enligt studien av Moxon *et al.* (2010) är skillnaden i bedömningen av ett preparat som avläses två gånger större hos en oerfaren avläsare än en erfaren. Samma cell kan därmed ha bedömts olika vid de olika avläsningstillfällena.

En förbättringspotential med studien kunde varit noggrannare anamnes med frågor om vilka tecken på löp ägaren sett. Även följdfrågor till djurägaren kunde ställts på

om den angivna tiden till senaste löp avser tiden från första dag med blodig flytning, från sista dag med flytning eller från dag 21 efter första dag med flytning. Detta för att minska risken för felklassificering och att indelningen löp/ ej i löp ska bli tydligare.

Att proverna togs vid olika tillfällen, några 2019 och några 2022, bör inte ha spelat så stor roll då blodproverna förvarades frysta och utstryken redan var färgade. Steroider anses generellt stabila och har visat sig vara oförändrade i fryst plasma i över 10 år (Kley *et al.* 1985). Gällande vaginalcytologi ska man dock inte vänta för länge fram till färgning och med proven från 2022 applicerades en maxgräns på 14 dagar.

Gällande östradiolanalysen är den främsta felkällan där att det ej finns någon publicerad valideringsstudie av ELISA-metoden som användes i denna studie. Detta öppnar upp för möjligheten att metoden ej fungerar optimalt för att analysera östradiol hos hund även om den enligt tillverkaren är lämpad för analys av östradiol i prover från hund. Metoden kanske mäter in något annat också som påverkar värdena.

6. Konklusion

Sammanfattningsvis tyder resultatet från denna studie på att vaginalcytologi ej lämpar sig som ensam diagnostisk metod vid juvertumörer men kan användas för att stärka misstanken vid pyometra hos tik. Proverna från tikar med juvertumörer och de kastrerade tikarna kunde ej skiljas från proverna från de intakta tikarna i anöstrus. Ingen tydlig östradiolpåverkan i form av stor andel förhornade celler på vaginalutstryket kunde ses hos tikarna med sjukdomstillstånden juvertumör och pyometra. Samtliga prover från tikarna med pyometra innehöll neutrofiler men detta ses även normalt i metöstrus. Dock kan en cellbild med rikligt med neutrofiler och bakterier stärka misstanken om att tiken har pyometra om den kliniska bilden stämmer in i övrigt. Värdet av vaginalcytologi vid juvertumör tycks däremot vara begränsat, dock litet material i denna studie.

Resultatet från ELISA-analysen för östradiol visade ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentrationen mellan tikarna med dessa sjukdomstillstånd och de friska tikarna enligt en envägs variansanalys. Inga tydliga skillnader sågs mellan de friska tikarna i löp och ej i löp heller. Komplicerande faktorer i jämförelsen mellan de friska och sjuka är att tikarna ej var i samma löpcykelstadie, det finns en stor normalvariation i östradiolkoncentrationen och hormonet kan produceras av fler vävnader och organ än ovarierna såsom binjuren, huden och fettvävnad.

Vid jämförelse av de två metoderna för vaginalcytologiavläsning (Reckers metod och metoden som lärs ut på SLU) framkom att Reckers metod i vissa vaginalutstryk överestimerade andelen förhornade celler då tolkningen baserades på förhorningslinjer oberoende av cellkärnans storlek. Detta är viktigt att känna till om man planerar att använda den metoden för avläsning av vaginalutstryk.

Framtida studier med ett större urval kan ge en djupare inblick i användbarheten av vaginalcytologi som ett diagnostiskt verktyg.

Referenser

- Albers-Wolthers, C.H.J., de Gier, J., Oei, C.H.Y., Schaefers-Okkens, A.C. & Kooistra, H.S. (2016). Validation of a noninvasive diagnostic tool to verify neuter status in dogs: The urinary FSH to creatinine ratio. *Theriogenology*, 86 (5), 1376–1381. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.081>
- Alhajj, M. & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. I: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/> [2022-10-21]
- Alm, H. & Holst, B.S. (2018). Identifying ovarian tissue in the bitch using anti-Müllerian hormone (AMH) or luteinizing hormone (LH). *Theriogenology*, 106, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.028>
- Antonov, A. (2017). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20 (3), 193–203. <https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53 Suppl 3, 53–62. <https://doi.org/10.1111/rda.13352>
- Axnér, E. (2019). Kompendium – Reproduktion hos hund. SLU, Institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för reproduktion [internt material].
- Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T. & Dinc, D.A. (2011). Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (15), 1962–1967. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1962.1967>
- Beauvais, W., Cardwell, J.M. & Brodbelt, D.C. (2012). The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs--a systematic review. *The Journal of Small Animal Practice*, 53 (6), 314–322. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2011.01220.x>
- Beijerink, N.J., Buijtels, J.J.C.W.M., Okkens, A.C., Kooistra, H.S. & Dieleman, S.J. (2007). Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, 67 (5), 1039–1045. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.003>
- Bell, E.T., Bailey, J.B. & Christie, D.W. (1973). Studies on vaginal cytology during the canine oestrous cycle. *Research in Veterinary Science*, 14 (2), 173–179.

- Bergeron, L.H., Nykamp, S.G., Brisson, B.A., Madan, P., Sears, W. & Gartley, C.J. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245 (12), 1360–1366. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1360>
- Blendinger, K., Bostedt, H. & Hoffmann, B. (1997). Hormonal state and effects of the use of an antiprogesterin in bitches with pyometra. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 51, 317–325.
- Bouchard, G.F., Solorzano, N., Concannon, P.W., Youngquist, R.S. & Bierschwal, C.J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, 35 (3), 603–611. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90456-N](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90456-N)
- Bugano, D.D.G., Conforti-Froes, N., Yamaguchi, N.H. & Baracat, E.C. (2008). Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 29 (4), 313–320.
- Buijtelts, J., Beijerink, N., Kooistra, H., Dieleman, S. & Okkens, A. (2006). Effects of gonadotrophin releasing hormone administration on the pituitary-ovarian axis in anoestrous vs ovariectomized bitches. *Reproduction in Domestic Animals*, 41 (6), 555–561. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00714.x>
- Canadas-Sousa, A., Santos, M., Leal, B., Medeiros, R. & Dias-Pereira, P. (2019). Estrogen receptors genotypes and canine mammary neoplasia. *BMC Veterinary Research*, 15 (1), 325. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2062-y>
- Chen, F.-P., Chien, M.-H., Chen, H.-Y., Huang, T.-S. & Ng, Y.-T. (2013). Effects of estradiol and progestogens on human breast cells: regulation of sex steroid receptors. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, 52 (3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.09.038>
- Christie, D.W., Bailey, J.B. & Bell, E.T. (1972). Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *The British Veterinary Journal*, 128 (6), 301–310. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)36935-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)36935-x)
- Concannon, P.W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124 (3–4), 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
- Dall, G.V. & Britt, K.L. (2017). Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. *Frontiers in Oncology*, 7, 110. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00110>
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Van Den Broeck, W. & Coryn, M. (2001). Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology*, 55 (7), 1509–1519. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00498-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00498-8)
- Fan, Y., Ren, X., Liu, X., Shi, D., Xu, E., Wang, S. & Liu, Y. (2021). Combined detection of CA15-3, CEA, and SF in serum and tissue of canine mammary gland

tumor patients. *Scientific Reports*, 11 (1), 6651. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85029-4>

- Fayrer-Hosken, R.A., Durham, D.H., Allen, S., Miller-Liebl, D.M. & Caudle, A.B. (1992). Follicular cystic ovaries and cystic endometrial hyperplasia in a bitch. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201 (1), 107–108.
- Frank, L.A., Mullins, R. & Rohrbach, B.W. (2010). Variability of estradiol concentration in normal dogs. *Veterinary Dermatology*, 21 (5), 490–493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00896.x>
- Frank, L.A., Rohrbach, B.W., Bailey, E.M., West, J.R. & Oliver, J.W. (2003). Steroid hormone concentration profiles in healthy intact and neutered dogs before and after cosyntropin administration. *Domestic Animal Endocrinology*, 24 (1), 43–57. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(02\)00204-7](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(02)00204-7)
- Goodman, M. (2001). Ovulation timing: Concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31 (2), 219–235. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50201-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50201-6)
- Graf, K.-J. (1978). Serum oestrogen, progesterone and prolactin concentrations in cyclic, pregnant and lactating beagle dogs. *Reproduction*, 52 (1), 9–14. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0520009>
- Hadley, J.C. (1975). Unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in the blood of bitches with false pregnancy and pyometra. *The Veterinary Record*, 96 (25), 545–547. <https://doi.org/10.1136/vr.96.25.545>
- Hagman, R. (2018). Pyometra in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48 (4), 639–661. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.03.001>
- Hatoya, S., Torii, R., Kumagai, D., Sugiura, K., Kawate, N., Tamada, H., Sawada, T. & Inaba, T. (2003). Expression of estrogen receptor α and β genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. *Neuroscience Letters*, 347 (2), 131–135. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00639-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00639-6)
- Hilton, H.N., Clarke, C.L. & Graham, J.D. (2018). Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 466, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.011>
- Holst, P.A. & Phemister, R.D. (1975). Temporal sequence of events in the estrous cycle of the bitch. *American Journal of Veterinary Research*, 36 (5), 705–706.
- Jitpean, S., Ambrosen, A., Emanuelson, U. & Hagman, R. (2016). Closed cervix is associated with more severe illness in dogs with pyometra. *BMC Veterinary Research*, 13 (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0924-0>
- Jitpean, S., Ström-Holst, B., Emanuelson, U., Höglund, O.V., Pettersson, A., Alneryd-Bull, C. & Hagman, R. (2014). Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Veterinary Research*, 10 (1), 6. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-6>

- Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V. & Olson, P.S. (2001). *Canine and Feline Theriogenology*. 1st ed. Philadelphia, PA: Saunders.
- Kley, H.K., Schlaghecke, R. & Krüskemper, H.L. (1985). [Stability of steroids in plasma over a 10-year period]. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, 23 (12), 875–878.
- Kustritz, M.V.R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66 (3), 567–574.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.003>
- Larsen, M.J., Thomassen, M., Gerdes, A.-M. & Kruse, T.A. (2014). Hereditary breast cancer: Clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 8, BCBCR.S18715. <https://doi.org/10.4137/BCBCR.S18715>
- Lindh, L., Kowalewski, M.P., Günzel-Apel, A.-R., Goericke-Pesch, S., Myllys, V., Schuler, G., Dahlbom, M., Lindeberg, H. & Peltoniemi, O.A.T. (2022). Ovarian and uterine changes during the oestrous cycle in female dogs. *Reproduction, Fertility and Development*, 35 (4), 321–337. <https://doi.org/10.1071/RD22177>
- Llazani, M., Qoku, A. & Dhaskali, L. (2021). Laboratory findings, vaginal cytology and histopathology in bitches with cystic endometrial hyperplasia – pyometra complex. *European Journal of Biology and Biotechnology*, 2 (3), 61–63.
<https://doi.org/10.24018/ejbio.2021.2.3.200>
- Marino, G. & Zanghì, A. (2013). Activins and inhibins: Expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: A review. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 42 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2012.01161.x>
- Mellin, T.N., Orczyk, G.P., Hichens, M. & Behrman, H.R. (1976). Serum profiles of luteinizing hormone, progesterone and total estrogens during the canine estrous cycle. *Theriogenology*, 5 (4), 175–187. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(76\)90250-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(76)90250-8)
- Moxon, R., Copley, D. & England, G.C.W. (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology*, 74 (3), 479–485.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.031>
- Nelson, L.R. & Bulun, S.E. (2001). Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45 (3), S116–S124.
<https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117432>
- Nelson, R.W. & Couto, C.G. (red.) (2020). *Small Animal Internal Medicine*. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Mosby.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M. & Castaño, M. (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Veterinary Pathology*, 37 (3), 239–247. <https://doi.org/10.1354/vp.37-3-239>
- Olson, P.N., Bowen, R.A., Behrendt, M.D., Olson, J.D. & Nett, T.M. (1982). Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus,

- proestrus and estrus. *Biology of Reproduction*, 27 (5), 1196–1206.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1196>
- Olson, P.N., Husted, P.W., Allen, T.A. & Neft, T.M. (1984). Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 14 (4), 927–946. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(84\)50090-4](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(84)50090-4)
- Pérez, C.C., Rodríguez, I., Dorado, J. & Hidalgo, M. (2005). Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. *Veterinary Record*, 156 (20), 648–650. <https://doi.org/10.1136/vr.156.20.648>
- Place, N.J., Hansen, B.S., Cheraskin, J.-L., Cudney, S.E., Flanders, J.A., Newmark, A.D., Barry, B. & Scarlett, J.M. (2011). Measurement of serum anti-Müllerian hormone concentration in female dogs and cats before and after ovariohysterectomy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23 (3), 524–527.
<https://doi.org/10.1177/1040638711403428>
- Post, K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Vétérinaire Canadienne*, 26 (3), 101–104.
- Queiroga, F.L., Pérez-Alenza, M.D., Silvan, G., Peña, L., Lopes, C. & Illera, J.C. (2005). Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94 (1–3), 181–187.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.014>
- Reckers, F., Klopfleisch, R., Belik, V. & Arlt, S. (2022). Canine vaginal cytology: A revised definition of exfoliated vaginal cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 834031. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834031>
- Rota, A., Corrà, M., Patuzzi, I., Milani, C., Masia, S., Mastroilli, E., Petrin, S., Longo, A., Del Carro, A. & Losasso, C. (2020). Effect of sterilization on the canine vaginal microbiota: a pilot study. *BMC Veterinary Research*, 16 (1), 455.
<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02670-3>
- Rutteman, G., Misdorp, W., Blankenstein, M. & van den Brom, W. (1988). Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *British Journal of Cancer*, 58 (5), 594–599. <https://doi.org/10.1038/bjc.1988.266>
- Saba, C.F., Rogers, K.S., Newman, S.J., Mauldin, G.E. & Vail, D.M. (2007). Mammary gland tumors in male dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21 (5), 1056–1059. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[1056:mgtimd\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[1056:mgtimd]2.0.co;2)
- Santen, R., Cavalieri, E., Rogan, E., Russo, J., Guttenplan, J., Ingle, J. & Yue, W. (2009). Estrogen mediation of breast tumor formation involves estrogen receptor-dependent, as well as independent, genotoxic effects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1155, 132–140. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2008.03685.x>
- Schutte, A.P. (1967a). Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *The Journal of Small Animal Practice*, 8 (6), 307–311. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1967.tb04555.x>

- Schutte, A.P. (1967b). Canine vaginal cytology—I Technique and cytological morphology. *Journal of Small Animal Practice*, 8 (6), 301–306. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1967.tb04554.x>
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2017). *Physiology of Domestic Animals*. 3rd ed. Oslo, Norway: Scandinavian Veterinary Press.
- Sontas, H.B., Dokuzeylu, B., Turna, O. & Ekici, H. (2009). Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Vétérinaire Canadienne*, 50 (10), 1054–1058.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S. & Goldschmidt, M.H. (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14 (3), 266–270. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2000\)014<0266:eosato>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2000)014<0266:eosato>2.3.co;2)
- Thomas, P.G. & Fontbonne, A. (2008). Drugs and reproduction. I: *Small Animal Clinical Pharmacology*. Elsevier. 528–545. <https://doi.org/10.1016/B978-070202858-8.50025-7>
- Verstegen, J., Dhaliwal, G. & Verstegen-Onclin, K. (2008). Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*, 70 (3), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.036>
- Ververidis, H.N., Boscos, C.M., Stefanakis, A., Saratsis, P., Stamou, A.I. & Krambovitis, E. (2004). Serum estradiol-17 β , progesterone and respective uterine cytosol receptor concentrations in bitches with spontaneous pyometra. *Theriogenology*, 62 (3–4), 614–623. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.011>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Ett centralt hormon i tikens löpcykel är östradiol och detta hormon är som högst när tiken löper. Höga nivåer av östradiol får vaginalslemhinnan att växa till och epitelcellerna att förhorns. Under förhorningsprocessen blir epitelcellerna större, mer kantiga i utseendet och cellkärnan krymper ihop för att tillslut lösas upp. Genom att ta ett cellprov från vaginalslemhinnan och bedöma cellerna i mikroskop kan man få ett indirekt mått på östradiolnivån och på så sätt bedöma när tiken har som störst chans att bli dräktig. Många studier har gjorts inom detta område på friska djur, färre studier har undersökt om vaginalcellprov även kan användas vid diagnostik av olika sjukdomstillstånd hos tik såsom livmoderinflammation eller juvertumör. Syftet med denna studie var att utreda användbarheten av vaginalcellprov som diagnostiskt verktyg vid olika sjukdomstillstånd såsom livmoderinflammation och juvertumörer samt att utvärdera det diagnostiska värdet av att analysera östradiol i blod. Syftet var även att jämföra två olika metoder för att utvärdera vaginalcellprov.

Prover i form av vaginalcellprov och blodprov togs från tikar med livmoderinflammation, juvertumörer, kastrerade tikar och friska tikar i olika stadier av löp-cykeln. Vaginalcellproven bedömdes med två olika metoder. Med den ena metoden räknades och klassificerades cellerna utifrån olika mått och preparaten delades in i löp eller ej löp. Med den andra metoden gjordes en uppskattning av antalet celler av varje celltyp samt en helhetsbedömning och preparaten delades in i förlöp, höglöp, efterlöp eller vilofas. Under vilofasen är tiken ej mottaglig för parning och på vaginalcellprov ses en låg grad förhornade celler. Blodproven analyserades med hjälp av ett test som kan detektera östradiol.

Resultatet från denna studie visade att vaginalcytologi ej lämpar sig som ensam diagnostisk metod vid juvertumörer men kan användas för att stärka misstanken vid livmoderinflammation hos tik. Ingen tydlig östradiolpåverkan i form av stor andel förhornade celler på vaginalcellproven kunde ses hos tikarna med dessa sjukdomstillstånd. Vaginalcellproven från tikar med juvertumörer kunde ej skiljas från proverna i vilofas. Samtliga prover från tikarna med livmoderinflammation innehöll vita blodkroppar men detta ses även normalt i efterlöpsstadiet vilket gör det ej specifikt för livmoderinflammation. Däremot kan det stärka misstanken om att tiken har livmoderinflammation om den kliniska bilden stämmer in i övrigt.

Vidare visade resultatet ingen signifikant skillnad i östradiolkoncentration mellan tikarna med dessa sjukdomstillstånd och de friska tikarna. KomPLICERANDE faktorer i jämförelsen är att tikarna ej var i samma löpCYKELstadiE, det finns en stor normal-variation i östradiolkoncentrationen, oklar prestanda hos östradiolmetoden och hormonet kan produceras av fler vävnader och organ än äggstockarna såsom bi-njuren, huden och fettvävnad.

Vid jämförelse av de två metoderna för vaginalcellprovavläsning framkom att den ena metoden i vissa vaginalutstryk överestimerade andelen förhornade celler, vilket är viktigt att känna till om man planerar att använda den metoden för avläsning av vaginalutstryk.

Framtida studier med ett större urval kan ge en djupare inblick i användbarheten av vaginalcellprov som ett diagnostiskt verktyg.

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. **Som student äger du upphovsrätten** till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Läs om SLU:s publiceringsavtal här:

- <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

JA, jag ger härmed min tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag ger inte min tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.