

Sammenligning og evaluering af metoder til bestemmelse af ovulationstidspunkt og det optimale parringstidspunkt hos hund

Novosticks, vulva turgor, vaginoskopi og vaginalcytologi



**Anne Schierup
VMF850**

April 2013

Veterinært speciale – 30 ECTS

Vejledere:

Hanne Gervi Pedersen, lektor og dyrlæge
Institut for Produktionsdyr og Heste, Faggruppe: Veterinær Reproduktion og Obstetrik

Mads Kjelgaard-Hansen, professor og dyrlæge
Institut for Klinisk Veterinær- og Husdyrsvidenskab, Hospital

Birgitte Schjøth, dyrlæge
Canicold Int. Hundesædbank

Forord

Dette veterinære speciale er udarbejdet ved Institut for Produktionsdyr og Heste, Faggruppe Veterinær Reproduktion og Obstetrik, Københavns Universitet. Rapporten sigter mod at kunne videregive information om metoder til bestemmelse af tævens ovulationstidspunkt og dermed det optimale parringstidspunkt.

I forbindelse med udarbejdelsen af specialet skal lektor og dyrlæge Hanne Gervi Pedersen samt professor Mads Kjelgaard-Hansen have stor tak for kyndig vejledning og support. En stor tak rettes også mod dyrlæge Birgitte Schjøth for uvurderlig hjælp under de kliniske undersøgelser. Tak til Dansk Kennel Klubs Sundhedsudvalg, som bevilgede økonomisk støtte til specialet.

Endelig takkes tæveejerne, som stillede op med deres hunde til dette studie, uden dem havde det ikke været muligt at gennemføre undersøgelserne.

Anne Schierup

16. april 2013

Resumé

Bestemmelse af tævens ovulationstidspunkt og det optimale tidspunkt for parring eller insemination er en udfordring for mange dyrlæger. Det optimale parringstidspunkt også kaldet fertilisationsperioden, referer til de ca. 3 døgn i tævens østralcyklus, hvor modnede *ova* er tilstede i *tuba uterina*. Denne periode er mellem Dag 2 og Dag 5 efter ovulationen, hvorfor en sikker identifikation af ovulationstidspunktet er helt afgørende for korrekt planlægning af parring eller insemination.

Kvantitativ måling af progesteronkoncentrationen i serum er den mest anvendelige metode i praksis, men indebærer oftest ventetid på svar fra et eksternt laboratorium, hvorfor det er relevant at undersøge, om der er alternative metoder, som kan give et hurtigere svar.

Der udbydes en metode, Novosticks, som tæveejeren selv kan udføre og aflæse hjemme.

Denne metode er meget interessant for opdrættere, men der foreligger ingen dokumentation for metodens sikkerhed. Formålet med dette studie var derfor at undersøge, hvor effektivt metoden Novosticks kan udpege tævens ovulationstidspunkt og det optimale parringstidspunkt. Derudover evalueredes og sammenlignedes tre kliniske metoder: subjektiv vurdering af *vulva turgor*, subjektiv vurdering af den vaginale *mucosa* ved vaginoskopi, samt differentialtælling af celletyper i exfoliativ vaginalcytologi. For disse tre metoder ønskedes det at belyse, i hvor høj grad disse er anvendelige i det praktiske arbejde med bestemmelse af ovulationstidspunktet og det optimale parringstidspunkt.

For 28 tæver af forskellige racer blev der derfor gennemført undersøgelser med de fire metoder igennem proøstrus og første del af østrus. Som referencestandard for bestemmelse af ovulationstidspunktet anvendtes et progesteronniveau på 5,44 ng/ml.

Den optimale parringsdag udpeget ved Novosticks-metoden faldt kun hos 39,3% af tæverne indenfor fertilisationsperioden (2-5 dage efter ovulationen), og kan derfor ikke anses som en sikker metode.

De tre kliniske metoder er til en vis grad anvendelige, men er på grund af en stor variation mellem tæver, ikke tilstrækkeligt sikre til en præcis bestemmelse af ovulationstidspunktet eller fertilisationsperioden. Den mest anvendelige af de tre synes at være den subjektive vurdering af den vaginale *mucosa* ved vaginoskopi.

Abstract

Determining the time of ovulation and the optimal time of mating or insemination is a challenge for many veterinarians. The optimal time of mating, also called the fertilization period, refers to the approx. 3 days of the reproductive cycle of the bitch, when mature *ova* are present in the *tuba uterina*. As this period is between Day 2 and Day 5 postovulation, an accurate identification of the time of ovulation is crucial in correct planning of mating or insemination.

A quantitative measurement of the serum progesterone concentration is the most useful method in small animal practice but often involves waiting for a test result from an external laboratory, and it is therefore relevant to investigate whether alternative methods could give a faster answer.

Novosticks is a commercially available method which the bitch owner can use and interpret at home. This method is of great interest to breeders but there is no documentation of the accuracy of this method. The aim of this study is to determine how efficiently the Novosticks method can identify the time of ovulation and the optimal time of mating. In addition, three clinical methods were evaluated and compared: subjective assessment of *vulva turgor*, subjective assessment of the vaginal *mucosa* by vaginoscopy, and differential counting of cell types in exfoliative vaginal cytology. In the case of these three methods an evaluation of their extent of usefulness in the practical work of determining the time of ovulation and the time of optimal mating was desired.

Examinations of 28 bitches of different breeds by the four methods were carried out through the period of proestrus and the first part of oestrus. A progesterone level of 5,44 ng/ml was used as a reference standard for the determination of the time of ovulation.

The optimal day of mating determined by the Novosticks method was within the fertilization period (Day 2-5 postovulation) in only 39,3% of the bitches, and the method thus cannot be considered accurate.

The three clinical methods are to some extent useful, but due to the considerable variation between bitches they are not sufficiently accurate for a precise identification of the time of ovulation or the fertilization period. The most useful of the three methods seems to be the subjective assessment of the vaginal *mucosa* by vaginoscopy.

Indholdsfortegnelse

1. Indledning.....	s. 2
1.2 Novosticks.....	s. 3
1.3 <i>Vulva turgor</i> , vaginoskopi og vaginalcytologi.....	s. 4
1.4 Formål.....	s. 5
2. Materiale.....	s. 6
2.1 Undersøgelhedsdesign.....	s. 6
3. Metoder.....	s. 7
3.1 Progesteronmåling.....	s. 7
3.2 Novosticks.....	s. 7
3.3 <i>Vulva turgor</i>	s. 7
3.4 Vaginoskopi.....	s. 8
3.5 Vaginalcytologi.....	s. 8
3.6 Statistik og datapræsentation.....	s. 9
4. Resultater.....	s. 10
4.1 Ovulationsdag.....	s. 10
4.2 Novosticks.....	s. 11
4.3 <i>Vulva turgor</i>	s. 12
4.4 Vaginoskopi.....	s. 13
4.5 Vaginalcytologi.....	s. 15
5. Diskussion.....	s. 17
5.1 Novosticks.....	s. 17
5.2 <i>Vulva turgor</i>	s. 17
5.3 Vaginoskopi.....	s. 18
5.4 Vaginalcytologi.....	s. 19
5.5 Generelt.....	s. 20
6. Konklusion.....	s. 21
7. Perspektivering.....	s. 22
8. Referenceliste.....	s. 24

Bilag 1: Oversigt over alle kliniske undersøgelsesresultater

Bilag 2: Oversigt over Novosticks resultater

Bilag 3: Producentens informationer om Novosticks

1. Indledning

Dyrlæger i klinisk smådyrspraksis står ofte overfor tæveejere, som ønsker en bestemmelse af det optimale parringstidspunkt i forbindelse med en planlagt parring eller insemination. Selvom tævens fertile periode i teorien er lang, fordi *spermatozoa* kan forblive befrugtningsdygtige i mindst 4-6 dage efter deponering (Doak *et al.* 1967), så er fertilisationsperioden, hvor der er fertiliserbare *ova* tilstede i *tuba uterina* kort. Dette skyldes, at ovulationstidspunkterne for de enkelte follikler kan være forskudt over 1-2 dage (Phemister *et al.* 1973; Concannon *et al.* 1977) eller endda 4 dage (Wildt *et al.* 1978), og at tæven ovulerer primære oocytter, som først efter 2-5 dages modning er fertiliserbare (Holst & Phemister 1971; Andersen & Simpson 1973; Tsutsui 1989). Ved forsøg med intrauterin insemination er det vist, at *ova* forbliver fertile i op til 8 dage efter ovulation, men at konceptionsraten falder ved insemination efter dag 6 efter ovulationen, og at resorptionsraten samtidig stiger (Tsutsui *et al.* 2009). Ved naturlig parring eller vaginal insemination begrænses fertilisationsperioden af lukningen af *cervix* 5 dage efter ovulationen (Tsutsui *et al.* 1989; Verstegen *et al.* 2001). På denne baggrund må det optimale parringstidspunkt sluttes at være Dag 2-5 efter ovulationen, hvilket især er relevant ved parring med en subfertil hanhund, eller ved insemination med frossen, optøet sæd, hvis levedygtighed kan være forringet (Jeffcoate & Lindsay 1989).

Endokrinologisk udløses ovulationen af hypofysens udskillelse af luteiniserende hormon (LH), som resultat af en faldende østrogenudskillelse og samtidig stigende progesteronudskillelse fra ovarierne (Concannon *et al.* 1979). Ovulationen sker mellem 1 og 3 døgn efter LH-toppen (Concannon *et al.* 1977; Wildt *et al.* 1978). Udskillelsen af LH sker over 24-40 timer (Concannon *et al.* 1977), hvorfor detektion af denne top ville kræve blodprøvetagning mindst en gang dagligt, og da en kvantitativ måling desuden kun kan udføres på særlige laboratorier, er denne metode ikke anvendelig i praktisk arbejde (Jeffcoate & Lindsay 1989; Jeffcoate & England 1997). Progesteronmåling er et brugbart alternativ til LH-måling (Jeffcoate & Lindsay 1989) og mere anvendeligt i praksis. I et studie med kvantitative målinger af progesteron og LH, og efterfølgende *ovariectomi* på fastsatte tidspunkter efter LH-toppen, fandtes en middelværdi (\pm SEM) på $5,44 \pm 0,93$ på tidspunktet for ovulationen (Concannon *et al.* 1977).

Bestemmelse af tidspunktet for ovulationen ved kvantitativ måling af progesteron kræver i praksis oftest blodprøvetagning med 2-3 dages interval, og indsendelse af blodprøven til et større laboratorie, hvilket giver ca. et døgn ventetid på svar (eller længere, f.eks. i forbindelse med weekend eller helligdage). Det er derfor relevant at se på, om der er alternative metoder, som kan give et hurtigere svar.

1.2 Novosticks

Der udbydes en metode, Novosticks, som hævder at kunne udpege ovulationstidspunktet og dermed det optimale parringstidspunkt gennem tests af vaginalsekretet vha. indikatorsticks, som indføres i tævens vagina (Novodog 2008). Det har ikke været muligt at få oplyst præcis hvad disse indikatorsticks måler, men ifølge producenten måler de ”direkte på enzymer der påvirkes når niveauet af glukose i tæven er stigende. Dermed måler den indirekte niveauet for Østrogen, da disse følges ad” (Novodog 2008). Ifølge producentens oplysninger giver indikatorsticken udslag (testpuden farves mørk) når østrogenniveauet er højt, hvorefter ovulationsdagen kan forventes ”indenfor de nærmeste døgn” (Novodog 2008) efter farveomslag på Novostick fra mørk til lyserød. I denne undersøgelse oversættes dette til 2 døgn efter farveomslaget. Det optimale parringstidspunkt angives som 2 dage efter ovulationen (Novodog 2008). Denne metode indebærer en stor fordel for tæveejeren, idet den kan udføres af ejeren selv, som dermed undgår den forholdsmæssigt store økonomiske og tidsmæssige belastning, som udgøres af gentagne dyrlægebesøg. I humane studier har man fundet, at behandling med østrogener giver en insulinsuppression og dermed forhøjet glukosekoncentration i plasma (Wynn & Doar 1969; Wynn *et al.* 1979). Det er imidlertid ikke undersøgt om det også resulterer i en høj glukosekoncentration i vaginalsekretet. Ved et studie af kompositionen af tævers vaginalslim er det tidligere fundet at glukose bundet til carboglutelin i vaginalslim hos beagler tilsyneladende frigives og konverteres til mælkesyre når østradiol-17 β -niveauet er højt (Vogel & van der Horst 1973). I et hollandsk studie opnåedes en høj drægtighedsrate efter insemination, når udslaget på indikatorpapir for glukose i urin var negativt efter kontakt med vaginalsekretet (Van der Holst & Best 1976). Novosticks´ effektivitet er dog indtil videre ikke videnskabeligt påvist, hvorfor hovedformålet med denne undersøgelse er at belyse, hvorvidt denne metode kan erstatte besøgene på en dyrlægeklinik.

1.3 *Vulva turgor*, vaginoskopi og vaginalcytologi

Udover Novosticks vurderes også tre kliniske metoder til bestemmelse af tævens ovulationstidspunkt og det optimale parringstidspunkt (vurdering af *vulva turgor*, vaginoskopi og vaginalcytologi), som ofte indgår i dyrlægens rutine, idet de er både hurtige og billige at udføre. Alle tre metoder afspejler østrogenniveauet, som stiger i proøstrus og derefter falder, samtidig med at progesteronniveauet stiger forud for ovulationstidspunktet (Concannon *et al.* 1975).

Vulva og *vagina* er målorganer for østrogen og observation af de morfologiske forandringer kan være brugbar til bestemmelse af cyklusstadiet og ovulationstidspunkt.

Subjektive vurderinger af *vulva turgor* er tidligere undersøgt i relation til LH-niveauet i plasma, hvor et distinkt fald i turgiditeten *vulva* af registreredes hos 100% af tæverne i studiet mellem 4 dage før og 3 dage efter LH-toppen, med et gennemsnit på $0,7 \pm 2,2$ dage før LH-toppen (Jeffcoate & England 1997). En tilsvarende stor variation rapporteres af Fáy *et al.* (2003) og Moxon *et al.* (2012), hvorimod Nishiyama *et al.* (2000) efter præcis måling af *vulvas* horisontale dimension fandt, at et fald i denne på minimum 15%, kunne anvendes som indikator for LH-toppen.

Det normale, endoskopiske udseende af *vagina* er detaljeret beskrevet (Lindsay 1983), og der er udviklet et scoringsystem til klassificering af observationer (Jeffcoate & Lindsay 1989). Jeffcoate & Lindsays (1989) undersøgelser viser, at der er en god korrelation mellem LH-toppen og de første observationer af aftagende ødem (crenulation men endnu ikke angulering). De fandt ligeledes en god korrelation mellem fertilisationsperioden og tidspunktet med angulering. I et senere studie viste de første observationer af crenulation uden angulering en middelværdi på $2,3 \pm 2,2$ dage før LH-toppen, og for anguleringstidspunktet $2,1 \pm 2,4$ dage efter LH-toppen (Jeffcoate & England 1997). Moxon *et al.* (2012) fandt også den subjektive vurdering af den vaginale *mucosa* anvendelig, og præsenterer desuden objektive teknikker til klassificering af ændringer i farvemætning og måling af folderens bredde.

En klassifikation af cellerne i exfoliativ vaginalcytologi præsenteredes i 1967 (Schutte 1967) og anvendes stadig i dag. Jeffcoate & England (1997) og Moxon *et al.* (2012) rapporterer om en maksimal andel af anukleære celler omkring ovulationsdagen, mens Linde & Karlsson (1984) og Jeffcoate & Lindsay (1989) refererer til superficialceller og anukleære celler som keratiniserede celler og angiver den maksimale grad af keratinisering som indikator for ovulationsdagen. I Linde & Karlssons studie (1984) fandt man at 100 % af tæverne havde

maksimal keratiniseringsgrad mindst 3 dage efter østrogenniveauet var på sit højeste, og hos 70,8 % sås den maksimale keratiniseringsgrad på tidspunktet, hvor progesteronniveauet var steget til det ovulatoriske niveau.

1.4 Formål

Formålet med studiet var at undersøge, hvor effektivt metoden Novosticks kan udpege tævens ovulationstidspunkt og det optimale parringstidspunkt. Endvidere ønskedes det undersøgt i hvor høj grad subjektive vurderinger af *vulva turgor* og vaginoskopi samt differentieltælling af celler i exfoliativ vaginalcytologi er anvendelige i det praktiske arbejde med bestemmelse af ovulationstidspunktet og det optimale parringstidspunkt.

2. Materiale

Da der ikke foreligger nogen tidligere undersøgelser af Novosticks, som kunne give estimater for sensitivitet og specificitet, var det ikke muligt at udregne en stikprøvestørrelse for denne undersøgelse. Antallet af tæver og undersøgelser i studiet blev derfor afgjort af de økonomiske ressourcer samt af de tidsmæssige rammer for dette speciale.

I studiet indgik 28 tæver af 14 forskellige racer, hvis ejere henvendte sig til en dyrlæge for bestemmelse af ovulationstidspunkt (og deraf udledt optimalt parrings-/insemineringstidspunkt) ved progesteronmåling. Alle tæverne var mellem 2 og 7 år gamle og havde haft minimum 2 uproblematiske løbetider forud for den indeværende løbetid.

Udover de 28 tæver i studiet indgik yderligere 5 tæver, som måtte ekskluderes fra studiet, da 3 af ejerne ikke kunne gennemføre alle de planlagte undersøgelser, og 2 af tæverne viste sig at have en anovulatorisk brunst.

Hver tæve blev undersøgt mellem 2 og 6 gange, hvilket gav i alt 127 kliniske undersøgelser (plus i alt 14 undersøgelser af de tæver, som siden blev ekskluderet).

2.1 Undersøgellesdesign

Alle undersøgelser og prøvetagning blev udført hos Canicold Hundesædbank under opsyn af dyrlæge Birgitte Schjøth.

Alle ejere blev informeret om symptomerne på 1. dag i proøstrus (vulvaødem og serohæmorrhagisk vaginalflåd). De blev ligeledes instrueret i brugen af Novosticks og udførte selv én test dagligt, hvis resultat blev noteret i et udleveret resultatskema. Klinisk undersøgelse med vurdering af *vulva turgor*, vaginoskopi, udtagelse af svaberprøve til vaginalcytologi samt udtagelse af blodprøve til progesteronmåling udførtes første gang på dag 7 efter observeret start på proøstrus og blev herefter gentaget hver 3. dag, indtil der kunne måles en progesteronkoncentration i serum på $> 1,5$ ng/ml. Herefter blev tæven undersøgt hver anden dag indtil progesteronkoncentrationen oversteg 10 ng/ml. Når det af praktiske årsager ikke var muligt at udføre undersøgelserne på den planlagte dag, udførtes de i stedet så tæt på den planlagte dag som muligt.

3. Metoder

3.1 Progesteronmåling

Tæverne i undersøgelsen fik udtaget en blodprøve ved hvert besøg i klinikken (3,5 ml blod i et serum gel blodprøverør, uden tilsætning, som efter minimum 15 minutters hvile blev centrifugeret ved 2000G i minimum 10 minutter). Serum blev derefter indsendt til KU SUND's Centrallaboratorie for kompetitiv chemiluminescent immunoassay på Immulite 2000®-systemet, som er vist at være en præcis og pålidelig metode til kvantitativ progesteronmåling på hundeserum (Chapwanya *et al.* 2008).

Når det i forbindelse med weekends og helligdage ikke var muligt at indsende prøven med det samme, blev denne opbevaret i køleskab (< 3 døgn) eller i fryser, indtil den kunne indsendes. Tæveejerne blev instrueret om, at tæven skulle være fastet i 12 timer inden blodprøvetagningen for at undgå lipæmiske prøver, da triglycerider i prøven giver falskt lave resultater (Siemens Diagnostics 2009).

3.2 Novosticks

Tæveejerne udførte selv testen med Novostick hjemme; en test dagligt fra starten af proøstrus indtil efter ovulation kunne påvises vha. den kvantitative progesteronmåling. De blev instrueret om den praktiske anvendelse af Novostick i overensstemmelse med anvisningerne på producentens hjemmeside, dvs. at indføre en stick i tævens vagina, og efter 10-15 sekunder tage den ud og registrere om der var farveomslag i indikatorfeltet.

3.3 Vulva turgor

Graden af *vulva turgor* blev af forfatteren vurderet ved inspektion og palpation ved hvert besøg i klinikken og tildelt en score (0-3), efter en modificering af metoden anvendt af Fáy *et al.* (2003):

Score 0: Ingen forstørrelse af *vulva* og ingen tegn på ødem.

Score 1: Let forstørrelse af *vulva* og svagt ødem.

Score 2: Væsentlig forstørrelse af *vulva* og tydeligt ødem.

Score 3: *Vulva* er stadig forstørret, men i aftagende grad. Aftagende ødem.

3.4 Vaginoskopi

I denne undersøgelse blev den vaginale *mucosa* inspiceret af forfatteren ved vaginoskopi ved hvert besøg i klinikken.

Vaginoskopien udførtes ved hjælp af et proktoskop monteret på en Welch Allyn lyskilde (ved enkelte tæver af små racer anvendtes i stedet et otoskop med lang øretragt). *Vulva* åbnedes digitalt og proktoskopet påført eksplorationsgel indførtes forsigtigt, med en vinkling på ca. 80 grader i forhold til horisontalplanet, så caudalt som muligt i vestibulum for at undgå clitorisfolden. Når proktoskopets spids nåede frem til den caudale del af *vagina* rettedes proktoskopet op til næsten horisontalt for herefter at følge *vaginas* forløb frem til den craniale del af *vagina*, hvor *mucosa* inspiceredes.

For registrering af observationerne anvendtes en modificeret version af Jeffcoate & Lindsay's vaginale *mucosa* scoring (VMS) system (Jeffcoate & Lindsay 1989):

Score 0: *Mucosa* er rød/lyserød, tør, relativt flad og uden tydelige folder.

Score 1: *Mucosa* er fugtig, lyserød og ødematøs, og de vaginale folder er tykke og afrundede. Evt. ses lidt blodtilblandet væske imellem folderne.

Score 2: *Mucosa* er bleg med aftaget ødem. De vaginale folder er nu mindre udfyldte men endnu uden skarpe kanter, og overfladen har et rynket udseende (crenulation). Evt. lidt blodtilblandet væske.

Score 3: Yderligere aftaget ødem. *Mucosa* er tør, bleg og rynket (crenulation), og folderne fremstår med skarpe kanter (angulering). Evt. lidt blodtilblandet væske.

3.5 Vaginalcytologi

Ved hvert besøg i klinikken blev der udtaget en svaberprøve fra *mucosa* i den craniale del af *vagina*, vha. en steril vatpind vædet med sterilt saltvand. Et spekulum blev indført på samme måde som beskrevet for proktoskopet ovenfor, og svaberprøven blev udtaget gennem dette spekulum, for at undgå kontamination med epithelceller fra *vestibulum*. Efter udtagelse blev svaberprøven udrullet på 5 objektglas, som efter tørring farvedes med Hemacolor.

Præparaterne blev efterfølgende mikroskoperet af forfatteren ved 10 x forstørrelse, og der optaltes 100 celler fra flere forskellige områder i det bedste af de 5 præparater. Cellerne klassificeredes i 5 grupper, efter metoden beskrevet af Schutte (1967): Parabasalceller, små intermediære celler, store intermediære celler, superficialceller med pyknotiske kerner, og anukleære superficialceller.

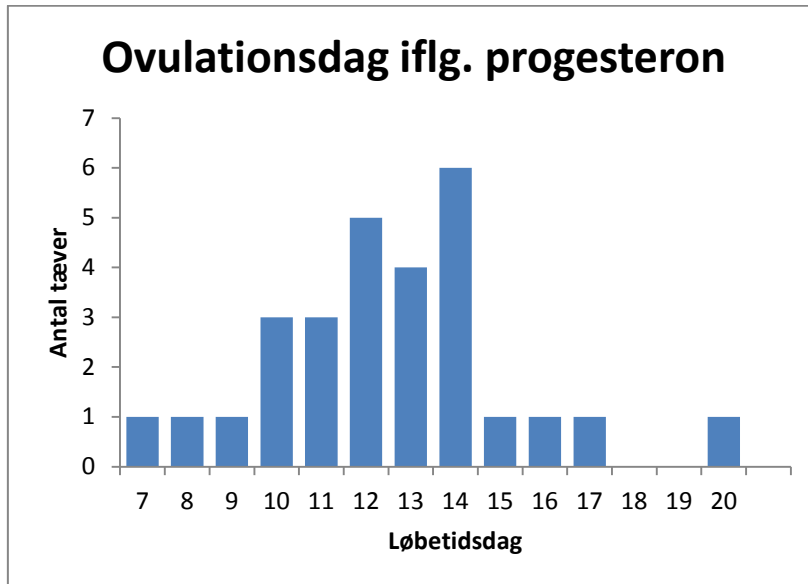
3.6 Statistik og datapræsentation

Som referencestandard for bestemmelse af ovulationstidspunktet anvendtes progesteronniveauet $5,44 \pm 0,93$ ng/ml, som tidligere er blevet kalkuleret på baggrund af forsøg (Concannon *et al.* 1977). De målte progesteronkoncentrationer i serum for hver af de 28 tæver i denne undersøgelse blev afbildet som en kurve, hvoraf dagen med en koncentration på 5,44 ng/ml kan aflæses. Denne således bestemte ovulationsdag kaldes herefter Dag 0 i præsentationen af data, undtagen i illustrationen af længden af proøstrus. Udregnede middelværdier præsenteres med angivelse af standardfejl (SE), varians, minimum- og maksimumværdier samt et 95% konfidensinterval for estimatet for middelværdien i populationen. Ved udregning af t-tests er valgt et signifikansniveau på 5%.

4. Resultater

4.1 Ovulationsdag

Resultaterne viser en stor variation mellem tæverne i længden af proøstrus, se figur 1.

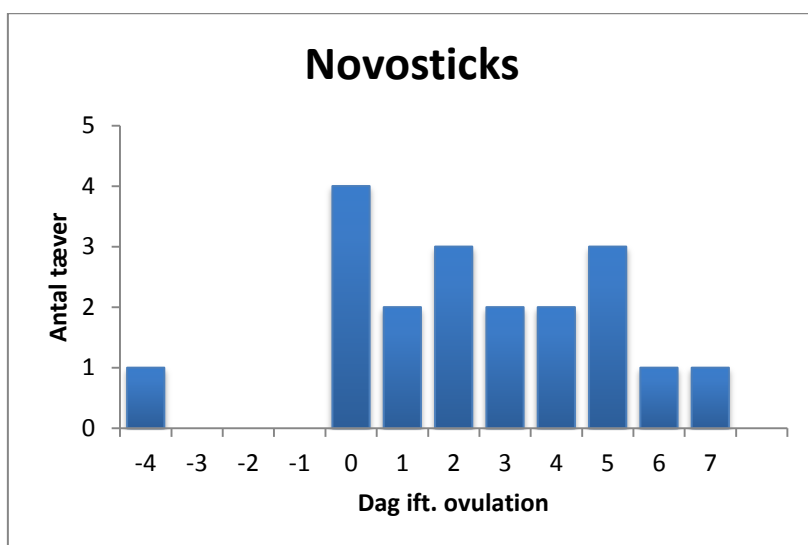


Figur 1: Ovulationsdag bestemt ved progesteronmåling i forhold til første dag i proøstrus (Dag 1). n = 28.

4.2 Novosticks

Af de 28 tæver i undersøgelsen gav Novosticks intet farveomslag hos 9 af tæverne (32,1%) (for de 5 af disse sås intet farveomslag fra lyserød til mørk, og for de resterende 4 intet farveomslag fra mørk til lyserød). For disse 9 tæver kunne metoden altså ikke udpege en ovulationsdag.

Fordelingen af den udpegede ovulationsdag (defineret som 2 dage efter farveomslag fra mørk til lyserød) for de 19 tæver (67,9%) med farveomslag ved testen, i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling, ses i Figur 2 og Tabel 1.



Figur 2: Novosticks' udpegede ovulationsdag i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 19.

Tabel 1: Statistiske værdier for Novosticks' udpegede ovulationsdag i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
19	2,42	0,61	7,15	-4	7	± 1,29 (1,13; 3,71)

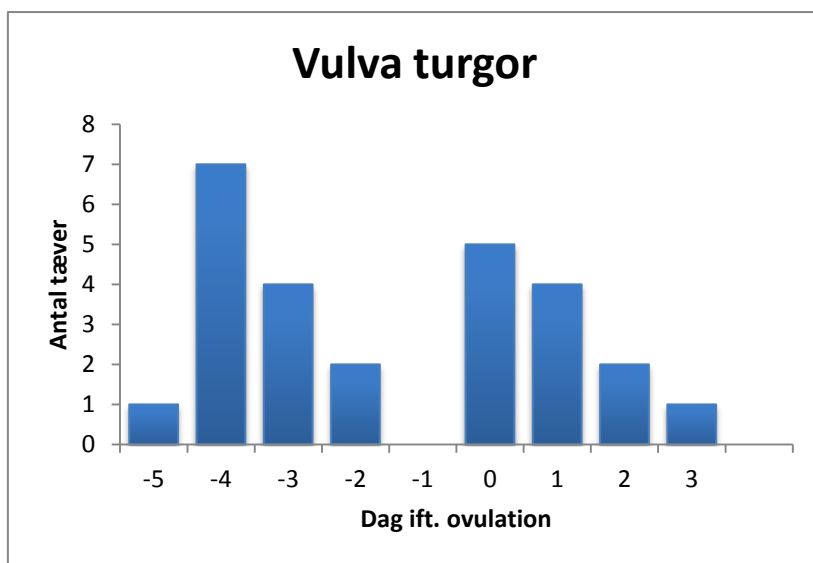
Kun hos 4 tæver (14,3%) udpegede Novosticks samme ovulationsdag som progesteronmålingen.

Det af Novosticks udpegede optimale parringstidspunkt er 2 døgn efter ovulationen, og sammenholdt med fertilisationsperioden (Dag 2-5) baseret på progesteronmålingen, faldt Novosticks' optimale parringsdag indenfor fertilisationsperioden hos 11 af de i alt 28 tæver (39,3%).

4.3 Vulva turgor

Kun hos 3 af de 28 tæver (10,7%) observeredes både score 1, 2 og 3 i løbet af deres undersøgelsesrække. Hos 13 tæver (46,4%) observeredes aldrig en score 1, og hos 14 tæver (50,0%) observeredes aldrig en score 2. Hos 2 tæver (7,1%) observeredes aldrig hverken score 2 eller 3 men kun score 1.

I figur 3 og tabel 2 ses fordelingen af de første observationer af score 3 (aftagende turgiditet) i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling.



Figur 3: Første observation af *vulva turgor* score 3 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 26.

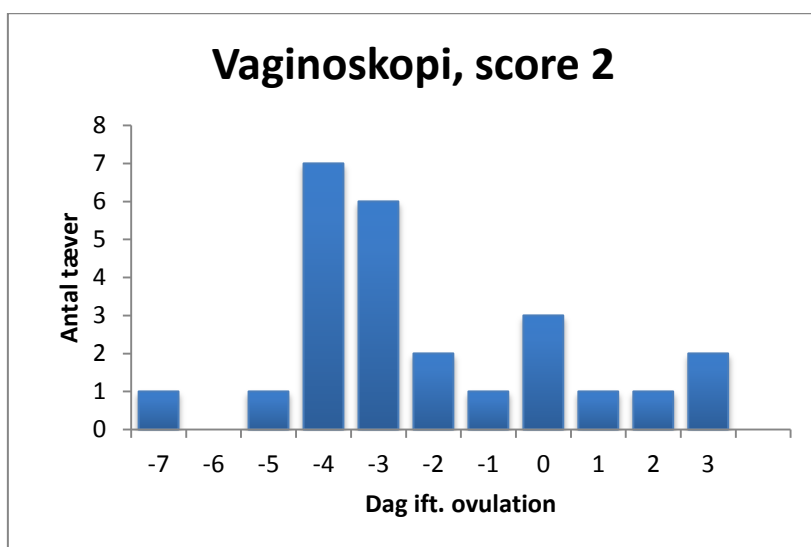
Tabel 2: Statistiske værdier for første observation af *vulva turgor* score 3 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
26	-1,46	0,47	5,86	-5	3	± 0,98 (-2,44; -0,48)

4.4 Vaginoskopi

Hos 14 af de 28 tæver (50,0%) observeredes både score 1, 2 og 3 i løbet af deres undersøgelsesrække. Hos 5 tæver (17,9%) observeredes aldrig en score 1, hos 3 tæver (10,7%) observeredes aldrig en score 2, og hos 6 tæver (21,4%) observeredes aldrig en score 3. Hos alle 28 tæver observeredes mindst 2 forskellige scores i løbet af deres undersøgelsesrække.

I Figur 4 og Tabel 3 nedenfor ses fordelingen af de første observationer af score 2 (crenulation uden angulering) i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling.

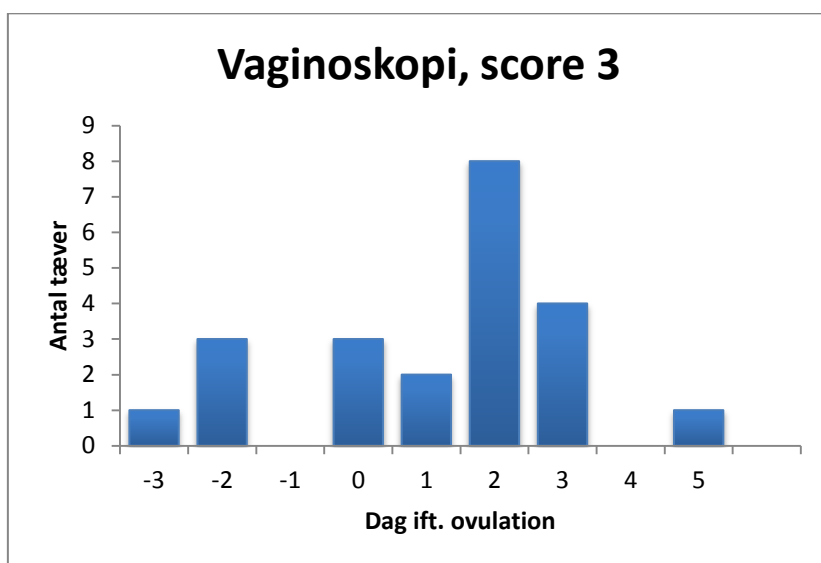


Figur 4: Første observation af vaginoskopi score 2 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 25.

Tabel 3: Statistiske værdier for første observation af vaginoskopi score 2 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
25	-2,16	0,51	6,47	-7	3	± 1,05 (-3,21; -1,11)

I Figur 5 og Tabel 4 ses fordelingen af de første observationer af score 3 (angulering) i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling.



Figur 5: Første observation af vaginoskopi score 3 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 22.

Tabel 4: Statistiske værdier for første observation af vaginoskopi score 3 i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

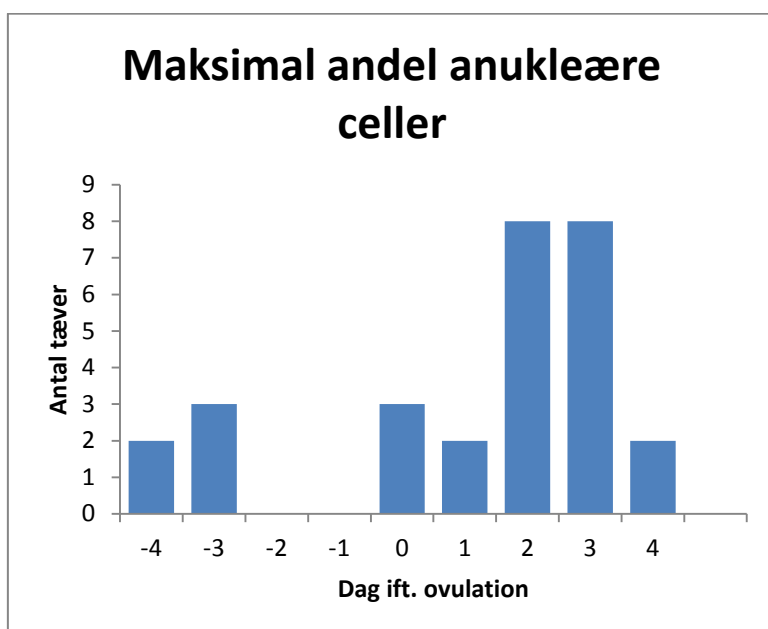
n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
22	1,18	0,43	4,06	-3	5	± 0,89 (0,29; 2,07)

4.5 Vaginalcytologi

Hos alle 28 tæver sås en gradvist faldende andel af non-superficialceller (ikke-keratiniserede celler), og tilsvarende gradvis stigning i andelen af superficialceller (keratiniserede celler) i løbet af deres undersøgelsesrække frem til de første dage efter ovulationsdagen.

Den maksimale andel af de 5 forskellige celletyper varierede meget, både mellem tæverne og på de forskellige undersøgelsesdage. Hos ingen af tæverne sås en maksimal andel på over 47% anukleære superficialceller, og hos de fleste en langt lavere. Hos 4 af tæverne (14,3%) sås to toppe i andelen af anukleære superficialceller i løbet af deres undersøgelsesrække.

I Figur 6 og Tabel 5 ses fordelingen af observationerne med maksimal andel af anukleære superficialceller i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling.



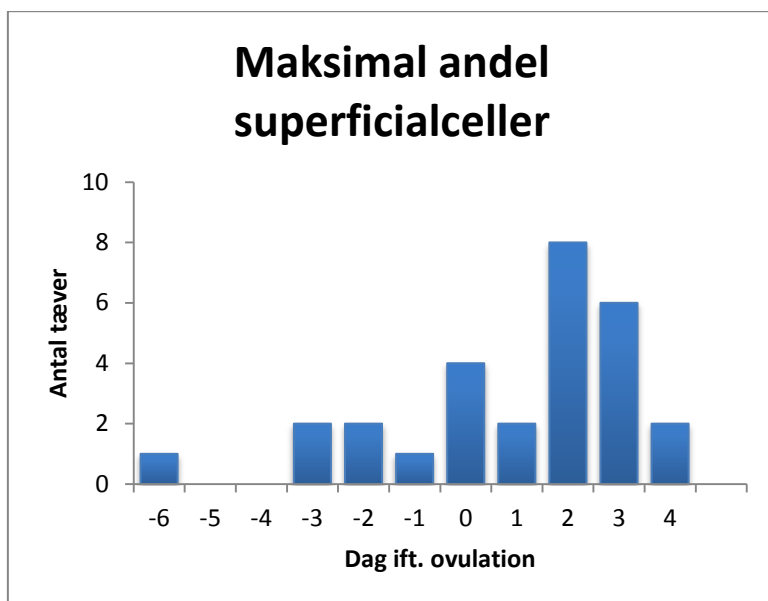
Figur 6: Observationer af maksimal andel af anukleære celler i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 28.

Tabel 5: Statistiske værdier for observationer af maksimal andel af anukleære celler i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
28	1,18	0,46	5,86	-4	4	± 0,94 (0,24; 2,12)

Af de 28 tæver kunne der hos de 27 (96,4%) findes en maksimal samlet andel af superficialceller (keratiniserede, med og uden kerner) på mellem 82% og 100%. Hos den sidste tæve var maksimum på 63%.

I Figur 7 og Tabel 6 ses fordelingen af observationerne med maksimal andel af superficialceller i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling.



Figur 7: Observationer af maksimal andel af superficialceller i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0). n = 28.

Tabel 6: Statistiske værdier for observationer af maksimal andel af superficialceller i forhold til ovulationsdagen bestemt ved progesteronmåling (Dag 0).

n:	Middelværdi:	Standardfejl (SE):	Varians:	Minimum:	Maksimum:	95% konfidensinterval:
28	0,96	0,46	5,81	-6	4	± 0,93 (0,03; 1,89)

5. Diskussion

5.1 Novosticks

Det ses af resultaterne for Novosticks, at kun 11 af de 28 tæver (39,3%) ville være blevet parret/insemineret indenfor fertilisationsperioden (Dag 2-5), såfremt man alene havde baseret det optimale parringstidspunkt på denne metode. Dette sammenholdt med at metoden for 32,1% af tæverne slet ikke kunne udpege en ovulationsdag, samt den store varians på den udpegede ovulationsdag, taler imod denne metodes anvendelighed. Desuden er den udregnede middelværdi ikke, som det kunne forventes, Dag 0, men derimod Dag 2,42, hvilket tyder på, at Novosticks har en tendens til at udpege en ovulationsdag, som ligger efter den faktiske. Der er ikke lavet andre undersøgelser af effektiviteten af Novosticks, men et hollandsk studie fra 1976 konkluderede, at lignende glukosetestes på vaginalslim med indikatorpapir kunne anvendes til bestemmelse af det optimale parringstidspunkt (Van der Holst & Best 1976). I dette studie sås høje drægtighedsrater efter insemination når glukosetesten var negativ. Dog fandt man her to farveomslag fra positiv til negativ, og anbefalede først insemination efter det andet farveomslag, som antoges at være sammenfaldende med ovulationen. Artiklen indeholder dog hverken nærmere informationer om timingen eller typen af inseminationen eller informationer om kvaliteten af den anvendte sæd. Da man i dette studie, på de samme tæver, tillige evaluerede adskillige andre metoder til bestemmelse af det optimale insemineringstidspunkt er det også uklart, på hvilket grundlag tidspunktet for inseminationen egentlig blev valgt. Selvom Vogel & van der Horsts studie (1973) sandsynliggør, at glukosens binding til carboglutelin i vaginalslimen brydes under indflydelse af østrogen, er det stadig usikkert hvorledes dette korrelerer med ovulationstidspunktet, og om Novosticks kan måle denne forhøjede glukosekoncentration.

5.2 Vulva turgor

I dette studie observeredes et fald i *vulva turgor* hos 92,9% af tæverne, med en middelværdi for første observation på 1,46 dage før ovulationen, men med en varians på 5,86 dage. Dette stemmer overens med konklusionerne fra andre studier (Jeffcoate & England 1997; Fáy *et al.* 2003; Moxon *et al.* 2012), hvor man ligeledes fandt, at selvom der ses en trend, så er denne metode ikke præcis nok til bestemmelse af ovulationstidspunktet eller det optimale parringstidspunkt.

Den store variation mellem tæverne gør denne parameter uegnet som generel indikator. Observationerne af *vulva turgor* viser desuden en tendens til variation mellem racer, selvom antallet af individer i hver race er for lille til at der kan drages en endegyldig konklusion. Dette kan dog muligvis være en del af forklaringen på, hvorfor et enkelt studie på 12 beagletæver, i modsætning til de øvrige studier, konkluderer, at en formindskning af vulvas horisontale mål på over 15% er et klinisk brugbart index til bestemmelse af optimalt parringstidspunkt (Nishiyama *et al.* 2000). Såvel Jeffcoate & England (1997) som Fáy *et al.* (2003) har dog alene anvendt subjektiv vurdering af turgiditeten, som det også er tilfældet i dette speciale, hvorimod Moxon *et al.* (2012) anvendte objektive målinger af vulvas højde og bredde på 9 tæver af retrievrracer uden at finde nogen korrelation med ovulationstidspunktet.

5.3 Vaginoskopi

For de første observationer af Score 2, dvs. crenulation uden angulering, sås i dette studie en middelværdi på Dag -2,16, hvilket støtter konklusionerne fra de tidligere studier af Jeffcoate & Lindsay (1989) og Jeffcoate & England (1997) om at de første observationer af denne score ses kort før tidspunktet for LH-toppen. Der sås i dette speciale dog en lille afvigelse i middelværdien, som i Jeffcoate & Englands studie (1997) kalkuleredes til 2,3 dage før LH-toppen og her til 2,16 dage før ovulationen, og en større varians (6,47 dage) end i Jeffcoate & Englands studie (1997), hvor man fandt en standardafvigelse på 2,2 dage, svarende til en varians på 4,84 dage. Forklaringen på disse uoverenstemmelser kan muligvis delvist tilskrives de to forskellige referencerammer (LH-toppen og ovulation). En anden årsag kan være forskellen i stikprøvestørrelse kombineret med den forholdsvis store variation mellem tæverne, som begge studier viser. Moxon *et al.* (2012) fandt, at alle 9 tæver i deres studie opnåede en Score 2 inden eller på ovulationstidspunktet, hvor der i dette speciale var 4 tæver (16,0%), som først opnåede en Score 2 i dagene 1-3 efter ovulationen, uden at der var nogle andre umiddelbare fællestræk mellem netop disse 4 tæver, som kunne forklare afvigelsen. Hos 3 af tæverne (10,7%) i dette speciale observeredes aldrig en Score 2, hvilket sandsynligvis kan forklares ud fra undersøgelsesdesignet, idet tæverne ikke blev undersøgt hver dag, så de kan have gennemløbet dette stadie på dage, hvor de ikke blev undersøgt.

For de første observationer af Score 3, dvs. angulering, sås i dette studie en middelværdi på Dag 1,18 med en varians på 4,06 dage. Jeffcoate & England (1997) rapporterede en middelværdi på 2,1 dage efter LH-toppen med en standardafvigelse på 2,4, svarende til en varians på 5,76. Der er altså her en bedre, men ikke fuldstændig, overensstemmelse mellem de to studiers resultater, hvor afvigelsen kan skyldes de samme årsager, som er nævnt ovenfor. Moxon *et al.* (2012) fandt, at alle 9 tæver i deres studie havde opnået en Score 3 inden eller på Dag 2 efter ovulationen, hvor der i dette speciale var 5 tæver (22,7%), som først opnåede en Score 3 i dagene 3-5 efter ovulationen. I dette tilfælde kan forklaringen dog formentlig findes i undersøgelsesdesignet, idet observationen af Score 3 registreredes efter 2-4 dage, hvor tæven af praktiske årsager ikke var blevet undersøgt, og det er derfor muligt, at den første observation af Score 3 ville have været registreret tidligere, hvis tæven var blevet undersøgt hver dag. Hos 6 af tæverne (21,4%) i dette speciale observeredes aldrig en Score 3, hvilket sandsynligvis skyldes, at undersøgelserne blev afsluttet efter progesteronkoncentrationen oversteg 10 ng/ml, og disse 6 tæver må antages at have progredieret til stadiet med angulering efter deres sidste undersøgelse. Ved udregning af t-test fandtes signifikant forskel på middelværdierne for tidspunktet for første observation af hhv. Score 2 og Score 3 ($p < 0,001$).

5.4 Vaginalcytologi

I dette studie sås en stor variation i andelen af anukleære superficialceller. Middelværdien for tidspunktet for den maksimale andel af disse var på Dag 1,18 med en varians på 5,86 dage. Dette stemmer ikke helt med fund i tidligere undersøgelser (Jeffcoate & England 1997; Moxon *et al.* 2012), hvor man fandt de maksimale andele af anukleære superficialceller hhv. 2,4 dage efter LH-toppen og på ovulationsdagen. Man fandt også betydeligt højere andele af denne celletype end der observeredes i dette speciale, men rapporterer om en stor varians mellem tæverne, hvilket også sås i denne undersøgelse og måske kan være en del af forklaringen på afvigelsen i middelværdi.

Den maksimale samlede andel af superficialceller (keratiniserede) sås i dette studie med en middelværdi på Dag 0,96 og en varians på 5,81 dage, hvilket nogenlunde svarer til tidligere fund (Jeffcoate & Lindsay 1989). Linde & Karlsson (1984) rapporterer om en maksimal keratiniseringsgrad på ovulationsdagen hos 70,8% af tæverne i deres forsøg, og hos de resterende tæver på Dag 2-4, og har dermed en lavere varians end i dette speciale og hos Jeffcoate & Lindsay (1989).

I dette studie, hvor tæverne ikke blev undersøgt hver dag, er der en vis usikkerhed i udpegelsen af dagen for den maksimale andel af en celletype, idet andelen kan have været højere på en af de dage, hvor tæven ikke blev undersøgt. Dette, sammen med den store varians mellem tæver, kan muligvis forklare afvigelserne fra de tidligere studiers resultater.

5.5 Generelt

Både Novosticks og de tre kliniske metoder afspejler østrogenkoncentrationen, som i andre forsøg har vist sig at variere en del (Concannon *et al.* 1975; Wildt *et al.* 1979), både over tid og mellem tæver. Dette kan måske forklare variationen i resultaterne.

Desuden bør det tages i betragtning, at de to tæver som blev ekskluderet fra dette studie pga. anovulatorisk brunst faktisk viste et billede for alle tre kliniske metoder, som var meget lig det, man så i en normal brunst, hvilket understreger nødvendigheden af at supplere disse metoder med progesteronmålinger for med sikkerhed at kunne konstatere, om ovulationen rent faktisk finder sted.

6. Konklusion

På baggrund af resultaterne i denne undersøgelse kan Novosticks-metoden ikke anbefales til bestemmelse af ovulationstidspunkt eller det optimale parringstidspunkt. Den af Novosticks udpegede optimale dag for parring/insemination faldt kun hos 39,3% af tæverne indenfor fertilisationsperioden, og hos 32,1% af tæverne gav indikatorstikken slet intet farveomslag og kunne dermed ikke udpege en ovulationsdag. Metoden er dermed ikke pålidelig nok til at kunne erstatte besøgene på en dyrlægeklinik.

Dette studies resultater tyder på, at *vulva turgor*, den subjektive vurdering af den vaginale *mucosa* ved vaginoskopi samt vaginalcytologi som klinisk observerbare afspejlinger af østrogenniveauet til en vis grad er anvendelige til bestemmelse af ovulationstidspunktet og det optimale parringstidspunkt. Disse tre metoder har den store fordel, at de er hurtige, billige og efter lidt træning forholdsvis nemme at udføre, og samtidig sætter dyrlægen i stand til at give tæveejeren sin vurdering indenfor kort tid. Den store variation mellem tæver gør dog, at disse metoder alene ikke i alle tilfælde giver en præcis bestemmelse. Det må derfor anbefales at kombinere anvendelse af en eller flere af disse metoder med måling af progesteronkoncentrationen i blodet.

Af de tre metoder synes vaginoskopi at være den mest anvendelige. Første observation af Score 3 havde den laveste varians af de undersøgte metoder, og kan med rimelighed antages at korrelere med tidspunktet for oocytmodning, dvs. lige før starten på fertilisationsperioden. Vaginalcytologi er også til en vis grad anvendelig, men på grund af den store variation i den maksimale andel af anukleære celler eller superficialceller kan denne top først med sikkerhed udpeges retrospektivt, dvs. når andelen igen formindskes. Faldet i *vulva turgor* kan være svært at konstatere pga. den store variation mellem tæver og muligvis mellem racer, og anses derfor som den mindst anvendelige af de tre metoder.

7. Perspektivering

En test til hjemmebrug som Novosticks ville være af meget stor værdi for hundeopdrættere i forhold til planlægning af parringer, da de gentagne besøg på dyreklinikken er en væsentlig økonomisk og tidsmæssig omkostning. Desuden kan det være svært at finde en dyrlæge med tilstrækkelig viden indenfor området, ligesom der kræves en stor fleksibilitet fra dyrlægens side, når tæven f.eks. skal undersøges eller insemineres i en weekend eller på helligdage. Hvis tidspunktet forpasses, går der lang tid, inden tæven kommer i løbetid igen, og der kan være (og er ofte) investeret megen tid og mange penge i den planlagte parring. Skal en hjemme-test være brugbar, kræver det naturligvis, at metoden er blevet efterprøvet, og fundet at have en høj sikkerhed i bestemmelsen af det optimale parringstidspunkt. En sådan undersøgelse har ikke tidligere været gennemført for Novosticks.

I forhold til vurderingen af de tre kliniske metoder *vulva turgor*, vaginoskopi og vaginalcytologi havde dette studie både styrker og svagheder i forhold til tidligere undersøgelser. Studiet var underlagt visse økonomiske og tidsmæssige begrænsninger. Det havde naturligvis været mere optimalt, hvis man kunne have undersøgt alle tæver hver dag, i stedet for hver 2-3 dag, idet man så med større præcision kunne have observeret, hvilken dag der skete en ændring fra et *vulva turgor*- eller vaginoskopi-stadie til et andet, og dagen med den maksimale andel af en celletype i den vaginale cytologi.

Dette var af hensyn til omkostningerne til progesteronmålingerne og af hensyn til tæveejerne, som skulle møde op på klinikken med deres tæve, desværre ikke muligt i dette studie. På den anden side stemmer undersøgelserne hver 2-3 dag meget godt overens med den situation, man som dyrlæge oplever i praksis, idet det er de færreste tæveejere, som vælger at få sin tæve undersøgt hver dag.

En vis bias i dataindsamlingen er svær helt at afvise. Det er således muligt, at de tæver, hvis ejere har valgt at lade dem indgå i studiet, er sværere at udpege det optimale parringstidspunkt for, end tæver, hvis ejere aldrig kontakter en dyrlæge for hjælp til dette. Der var da også flere af tæverne i studiet, som havde en anamnese om tidligere ufrugtbare parringer/insemineringer, på trods af tilsyneladende normalt forløbende løbetider. Endelig var det ikke muligt at ”blinde” klinikerne under de enkelte tævers undersøgelser, så et vist kendskab til tævens cyklusstadie og resultater fra tidligere undersøgelser var uundgåeligt, og kan således i teorien have haft en indflydelse på vurderingen af de subjektive parametre, selvom det så vidt muligt forsøgte undgået.

Dette studie havde også en væsentlig styrke i stikprøvestørrelsen og racefordelingen i stikprøven. De fleste tidligere studier er baseret på forholdsvis få hunde, ofte af samme eller lignende racer, hvilket kan skjule en racebetinget variation i resultaterne.

Det kunne være interessant i fremtidige studier at undersøge, om der kan dokumenteres forskelle mellem racer for metoderne til bestemmelse af ovulationstidspunktet og det optimale parringstidspunkt.

8. Referenceliste

Andersen, A.C. & Simpson, M.E (1973): *The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*. Geron-X, Inc., Los Altos.

Chapwanya, A., Clegg, T., Stanley, P. & Vaughan, L. (2008): Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology*. Vol. 70, pp. 795-799.

Concannon, P.W., Hansel, W. & Visek, W.J. (1975): The ovarian cycle of the bitch: Plasma estrogen, LH and progesterone. *Biology of Reproduction*. Vol. 13, pp. 112-121.

Concannon, P., Hansel, W. & McEntee, K. (1977): Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biology of Reproduction*. Vol. 17, pp. 604-613.

Concannon, P.W., Cowan, R. & Hansel, W. (1979): LH release in ovariectomized dogs in response to estrogen withdrawal and its facilitation by progesterone. *Biology of Reproduction*. Vol. 20, pp. 523-531.

Doak, R.L., Hall, A. & Dale, H.E. (1967): Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*. Vol. 13, pp. 51-58.

Fáy, J., Mező, T, Solti, L., Wölfling, A. & Abonyi-Tóth, Zs. (2003): Comparisons of different methods used for oestrus examination in the bitch. *Acta Veterinaria Hungarica*. Vol. 51, nr. 3, pp. 385-394.

Holst, P.A. & Phemister, R.D. (1971): The prenatal development of the dog: Preimplantation Events. *Biology of Reproduction*. Vol. 5, pp. 194-206.

Jeffcoate, I.A. & England, G.C.W. (1997): Urinary LH, plasma LH and progesterone and their clinical correlates in the periovulatory period of domestic bitches. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*. Vol. 51, pp. 267-275.

Jeffcoate, I.A. & Lindsay, F.E.F. (1989): Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and the endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*. Vol. 39, pp. 277-287.

Linde, C. & Karlsson, I. (1984): The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*. Vol. 25, pp. 77-82.

- Lindsay, F.E.F. (1983): The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. *Journal of Small Animal Practice*. Vol. 24, pp. 1-15.
- Moxon, R., Batty, H., Irons, G. & England, G.C.W. (2012): Periovarian changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology*. Vol. 78, pp. 1907-1916.
- Nishiyama, T., Narita, K., Tsumagari, S. & Takeishi, M. (2000): Shrinkage in the horizontal dimensions of the vulva (vulvar shrinkage) as an indicator of standing heat in the Beagle. *Journal of the American Animal Hospital Association*. Vol. 36, pp. 556-560.
- Novodog (2008): *Novosticks Instruktion* [online]. Novodog's hjemmeside [citeret 5. Juni 2012]. Tilgængelig på internet: [URL:http://www.novodog.dk](http://www.novodog.dk)
- Phemister, R.D., Holst, P.A., Spano, J.S. & Hopwood, M.L. (1973): Time of ovulation in the Beagle bitch. *Biology of Reproduction*. Vol. 8, pp. 74-82.
- Schutte, A.P. (1967): Canine vaginal cytology. I. Technique and cytological morphology. *Journal of Small Animal Practice*. Vol. 8, nr. 6, pp. 301-306.
- Siemens Diagnostics (2009): Indlægsseddel IMMULITE 2000 Progesterone.
- Tsutsui, T. (1989): Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*. Vol. 39, pp. 269-275.
- Tsutsui, T., Shimizu, T., Ohara, N., Hironaka, Y., Orima, H. & Ogasa, A. (1989): Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches insemination into unilateral uterine horn. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 51, pp. 257-263.
- Tsutsui, T., Takahashi, F., Hori, T., Kawakami, E. & Concannon, P.W. (2009): Prolonged duration of fertility of dog ova. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 44, Suppl. 2, pp. 230-233.
- Van der Holst, W. & Best, A.P. (1976): Een beschouwing over het meest geschikte tijdstip voor de dekking van de teef. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. Vol. 101, nr. 1, pp. 658-663.
- Verstegen, J.P., Silva, L.D.M. & Onclin, K. (2001): Determination of the role of the cervical closure in fertility regulation after mating or artificial insemination in Beagle bitches. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*. Vol. 57, pp. 31-34.

Vogel, F. & van der Horst, C.J.G. (1973): Investigations in the biochemical composition of dog's discharge, the hormonal composition of blood and ovary and dog's behavior during heat. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. Vol. 98, nr. 1, pp. 75-85.

Wildt, D.E., Chakraborty, P.K., Panko, W.B. & Seager, S.W.J. (1978): Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction*. Vol. 18, pp. 561-570.

Wildt, D.E., Panko, W.B., Chakraborty, P.K. & Seager, S.W.J. (1979): Relationship of serum estrone, estradiol-17 β and progesterone to LH, sexual behavior and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction*. Vol. 20, pp. 648-658.

Wynn, V. & Doar, J. (1969): Some effects of oral contraceptives on carbohydrate metabolism. *The Lancet*. Vol. 294, nr. 7624, pp. 761-766.

Wynn, V., Godsland, I., Nithyananthan, R., Adams, P.W., Melrose, J., Oakley, N.W. & Seed, M. (1979). Comparison of the effects of different combined oral-contraceptive formulations on carbohydrate and lipid metabolism. *The Lancet*. Vol. 313, nr. 8125, pp. 1045-1049.

Bilag 1

Tæve nr	Race	Løbetidsdag	Ovulationsdag	Dag ift. ovulation	Vulva turgor Score 0-3	Vaginuskopi Score 0-3	Vaginal cytologi, %				Superficialceller m. kernerester		Superficialceller i alt	Progesteron ng/mL
							Parabasalceller	Små intermediære celler	Store intermediære celler	Non-superficialceller i alt		Anukleære superficialceller		
1	Siberian Husky	7	13	-6	1	1	0	50	20	70	22	8	30	0,317
1	Siberian Husky	9	13	-4	3	2	0	15	39	54	36	10	46	0,772
1	Siberian Husky	12	13	-1	3	2	0	6	9	15	72	13	85	2,73
1	Siberian Husky	14	13	1	3	2	0	0	3	3	84	13	97	6,33
1	Siberian Husky	16	13	3	3	3	0	0	0	0	60	40	100	18,9
2	Siberian Husky	7	11	-4	1	2	6	16	42	64	33	3	36	0,550
2	Siberian Husky	10	11	-1	1	2	8	8	13	29	71	0	71	1,80
2	Siberian Husky	12	11	1	3	3	3	5	8	16	70	14	84	8,20
2	Siberian Husky	14	11	3	3	3	0	1	1	2	83	15	98	13,0
3	Siberian Husky	8	13	-5	1	1	36	53	11	100	0	0	0	<<0,20
3	Siberian Husky	10	13	-3	3	2	7	20	30	57	30	13	43	0,682
3	Siberian Husky	13	13	0	3	2	5	19	32	56	31	13	44	3,17
3	Siberian Husky	15	13	2	3	3	2	13	22	37	53	10	63	9,60
3	Siberian Husky	17	13	4	3	3	0	15	54	69	28	3	31	12,3
4	Shih Tzu	7	14	-7	2	1	10	15	20	45	43	12	55	0,370
4	Shih Tzu	10	14	-4	2	1	0	11	49	60	35	5	40	0,676
4	Shih Tzu	12	14	-2	2	1	0	2	26	28	68	4	72	1,78
4	Shih Tzu	14	14	0	2	1	0	0	14	14	71	15	86	3,71
4	Shih Tzu	16	14	2	3	3	0	3	3	3	77	20	97	12,8
5	Berner Sennen	7	20	-13	1	1	55	28	13	96	4	0	4	<<0,20
5	Berner Sennen	10	20	-10	2	1	4	20	33	57	32	11	43	<<0,20
5	Berner Sennen	13	20	-7	2	1	1	11	49	61	33	6	39	<<0,20
5	Berner Sennen	16	20	-4	3	2	0	6	31	37	58	5	63	<<0,20
5	Berner Sennen	19	20	-1	3	2	0	0	15	15	71	14	85	1,48
5	Berner Sennen	22	20	2	3	2	0	0	9	9	69	22	91	10,8
6	Siberian Husky	7	11	-4	1	1	0	6	23	29	57	14	71	0,607
6	Siberian Husky	10	11	-1	1	2	0	0	3	3	78	19	97	2,69
6	Siberian Husky	12	11	1	3	3	0	0	2	2	80	18	98	7,56
6	Siberian Husky	14	11	3	3	3	0	0	0	0	80	20	100	10,8
7	Welsh Springer Spaniel	7	7	0	1	1	0	0	11	11	83	6	89	3,90
7	Welsh Springer Spaniel	10	7	3	1	2	0	17	0	17	75	8	83	13,3
8	Cocker Spaniel	8	12	-4	2	1	2	72	26	100	0	0	0	0,391
8	Cocker Spaniel	11	12	-1	2	1	1	20	27	48	36	16	52	2,04
8	Cocker Spaniel	13	12	1	3	1	0	0	15	15	61	24	85	6,22
8	Cocker Spaniel	15	12	3	3	2	0	0	8	8	62	30	92	12,1
9	Broholmer	7	14	-7	1	1	78	19	3	100	0	0	0	1,33
9	Broholmer	10	14	-4	3	2	0	18	61	79	19	2	21	0,631
9	Broholmer	12	14	-2	3	2	0	0	23	23	64	13	77	1,66
9	Broholmer	14	14	0	3	2	0	0	14	14	70	16	86	3,63
9	Broholmer	16	14	2	3	3	0	0	15	15	62	23	85	9,33
9	Broholmer	18	14	4	3	3	0	0	15	15	65	20	85	13,8
10	Airedale Terrier	7	14	-7	1	1	0	5	38	43	52	5	57	0,288
10	Airedale Terrier	11	14	-3	1	2	0	0	20	20	75	5	80	1,95
10	Airedale Terrier	14	14	0	3	2	0	0	35	35	60	5	65	4,36
10	Airedale Terrier	16	14	2	3	3	0	0	6	6	90	4	94	12,5
11	Samojedhund	7	11	-4	1	1	0	26	43	69	27	4	31	0,686
11	Samojedhund	10	11	-1	1	1	2	13	30	45	51	4	55	2,89
11	Samojedhund	13	11	2	1	2	0	3	15	18	35	47	82	11,1
12	Samojedhund	6	12	-6	1	1	1	40	32	73	26	1	27	0,227
12	Samojedhund	9	12	-3	2	1	1	20	40	61	35	4	39	1,26
12	Samojedhund	12	12	0	2	1	0	2	17	19	66	15	81	4,56
12	Samojedhund	13	12	1	3	2	0	0	17	17	44	39	83	7,70
12	Samojedhund	17	12	5	3	3	0	5	17	22	65	13	78	14,4
13	Schæfer	7	14	-7	2	1	0	37	26	63	31	6	37	0,328
13	Schæfer	10	14	-4	3	2	0	4	21	25	57	18	75	1,21
13	Schæfer	12	14	-2	3	3	0	0	3	3	92	5	97	2,58
13	Schæfer	14	14	0	3	3	0	0	0	0	84	16	100	4,53
13	Schæfer	16	14	2	3	3	0	0	1	1	96	3	99	13,8
14	Alaskan Malamute	7	10	-3	2	1	0	13	50	63	37	0	37	1,50
14	Alaskan Malamute	10	10	0	2	1	0	1	8	9	73	18	91	4,73
14	Alaskan Malamute	13	10	3	3	3	0	5	10	15	79	6	85	11,8
14	Alaskan Malamute	15	10	5	3	3	0	4	36	40	55	5	60	11,2

Tæve nr	Race	Løbetidsdag	Ovulationsdag	Dag ift. ovulation	Vulva turgor Score 0-3	Vaginoskopi Score 0-3	Vaginal cytologi, %					Progesteron ng/mL		
							Parabasalceller	Små intermediære celler	Store intermediære celler	Non-superficialceller i alt	Superficialceller m. kernerester	Anukleære superficialceller	Superficialceller i alt	
15	Old English Sheepdog	7	10	-3	2	2	0	8	44	52	46	2	48	0,873
15	Old English Sheepdog	10	10	0	2	2	0	7	30	37	58	5	63	4,20
15	Old English Sheepdog	12	10	2	3	3	0	3	24	27	66	7	73	10,1
15	Old English Sheepdog	14	10	4	3	3	0	0	18	18	70	12	82	17,8
15	Old English Sheepdog	16	10	6	3	3	5	75	4	84	6	10	16	19,3
16	Samojedhund	8	8	0	3	2	1	2	25	28	71	1	72	3,02
16	Samojedhund	11	8	3	3	3	0	5	8	13	79	8	87	11,1
17	Finsk Lapphund	7	16	-9	1	1	23	48	18	89	10	1	11	<<0,20
17	Finsk Lapphund	10	16	-6	2	1	2	18	64	84	13	3	16	<<0,20
17	Finsk Lapphund	12	16	-4	3	2	0	6	41	47	45	8	53	0,274
17	Finsk Lapphund	15	16	-1	3	2	0	1	28	29	64	7	71	1,92
17	Finsk Lapphund	17	16	1	3	2	0	0	2	2	93	5	98	7,32
17	Finsk Lapphund	19	16	3	3	3	0	13	0	13	79	8	87	22,9
18	Welsh Springer Spaniel	7	14	-7	2	1	0	4	62	66	33	1	34	0,341
18	Welsh Springer Spaniel	10	14	-4	2	1	4	20	23	47	52	1	53	0,520
18	Welsh Springer Spaniel	12	14	-2	2	2	7	16	27	50	49	1	50	1,73
18	Welsh Springer Spaniel	14	14	0	3	3	0	0	18	18	78	4	82	3,56
18	Welsh Springer Spaniel	17	14	3	3	3	0	0	11	11	81	8	89	11,0
19	Fransk Bulldog	7	14	-7	1	1	8	15	28	51	45	4	49	<<0,20
19	Fransk Bulldog	10	14	-4	3	1	0	4	20	24	72	4	76	0,440
19	Fransk Bulldog	12	14	-2	3	1	0	0	9	9	89	2	91	1,46
19	Fransk Bulldog	14	14	0	3	2	0	0	3	3	89	8	97	3,95
19	Fransk Bulldog	16	14	2	3	2	0	1	2	1	99	27	100	12,0
20	Welsh Springer Spaniel	7	9	-2	2	2	0	0	13	13	78	9	87	2,82
20	Welsh Springer Spaniel	9	9	0	3	3	0	0	6	6	82	12	94	4,12
20	Welsh Springer Spaniel	11	9	2	3	0	0	0	0	0	86	14	100	10,1
21	Broholmer	7	13	-6	2	1	0	1	22	23	65	12	77	0,366
21	Broholmer	10	13	-3	3	2	0	0	4	4	83	13	96	0,513
21	Broholmer	13	13	0	2	3	0	0	5	5	87	8	95	3,80
21	Broholmer	15	13	2	3	2	0	8	8	8	82	10	92	8,98
21	Broholmer	17	13	4	3	3	0	0	6	6	82	12	94	14,3
22	Siberian Husky	7	12	-5	1	1	0	3	7	10	77	13	90	0,487
22	Siberian Husky	10	12	-2	3	3	0	0	5	5	65	30	95	1,26
22	Siberian Husky	12	12	0	3	3	0	1	4	5	75	20	95	5,21
22	Siberian Husky	14	12	2	3	3	0	0	6	6	50	44	94	7,86
22	Siberian Husky	16	12	4	3	3	0	0	0	0	45	55	100	14,6
23	Siberian Husky	7	10	-3	1	1	2	11	12	25	71	4	75	0,472
23	Siberian Husky	10	10	0	3	2	0	0	7	7	85	8	93	3,19
23	Siberian Husky	12	10	2	3	3	0	0	3	3	83	14	97	11,4
24	Engelsk Bulldog	7	12	-5	2	1	15	15	41	71	26	3	29	0,393
24	Engelsk Bulldog	9	12	-3	3	2	2	5	22	29	67	4	71	0,861
24	Engelsk Bulldog	11	12	-1	3	1	0	6	7	13	84	3	87	2,27
24	Engelsk Bulldog	13	12	1	3	2	2	4	8	14	80	6	86	7,56
24	Engelsk Bulldog	15	12	3	3	2	0	20	20	40	56	4	60	12,6
25	Schæfer	7	15	-8	2	1	0	2	4	13	17	9	83	0,377
25	Schæfer	9	15	-6	2	1	0	0	5	5	81	14	95	0,812
25	Schæfer	11	15	-4	3	2	0	0	3	3	80	17	97	1,60
25	Schæfer	13	15	-2	3	3	0	0	0	0	75	25	100	1,72
25	Schæfer	15	15	0	3	3	0	0	5	5	60	35	95	5,04
25	Schæfer	16	15	1	3	2	0	0	1	1	64	35	99	6,65
25	Schæfer	19	15	4	3	3	0	6	22	28	59	13	72	16,6
26	Alaskan Malamute	7	12	-5	3	2	0	0	14	14	80	6	86	1,08
26	Alaskan Malamute	9	12	-3	3	0	0	0	2	2	84	14	98	3,86
26	Alaskan Malamute	13	12	1	3	3	6	69	11	86	6	8	14	6,10
26	Alaskan Malamute	15	12	3	3	3	11	20	3	56	87	7	13	10,8
27	Cocker Spaniel	7	13	-6	2	1	0	0	0	0	86	14	100	0,469
27	Cocker Spaniel	10	13	-3	3	2	0	0	1	1	74	25	99	1,25
27	Cocker Spaniel	13	13	0	3	1	0	0	0	0	70	30	100	4,85
27	Cocker Spaniel	15	13	2	3	3	0	0	0	0	65	35	100	10,1
28	Siberian Husky	7	17	-10	1	1	10	10	20	40	50	10	60	0,312
28	Siberian Husky	10	17	-7	1	2	0	6	11	17	60	23	83	0,498
28	Siberian Husky	13	17	-4	1	2	0	2	5	7	63	30	93	1,03
28	Siberian Husky	15	17	-2	3	2	0	0	4	4	76	20	96	2,12
28	Siberian Husky	17	17	0	3	2	0	1	3	4	81	15	96	5,07
28	Siberian Husky	19	17	2	3	3	0	1	10	11	72	17	89	12,0

Bilag 2

Tæve nr	Novosticks omslag (mørk->lys)	Ovulationsdag iflg. Novosticks	Optimal parringsdag iflg. Novosticks
1	11	13	15
2	14	16	18
3	intet omslag til mørk	N/A	N/A
4	15	17	19
5	intet omslag til mørk	N/A	N/A
6	5	7	9
7	6	8	10
8	13	15	17
9	12	14	16
10	13	15	17
11	14	16	18
12	17	19	21
13	12	14	16
14	intet omslag til mørk	N/A	N/A
15	intet omslag til mørk	N/A	N/A
16	11	13	15
17	14	16	18
18	16	18	20
19	14	16	18
20	intet omslag til lys	N/A	N/A
21	intet omslag til lys	N/A	N/A
22	16	18	20
23	10	12	14
24	intet omslag til lys	N/A	N/A
25	15	17	19
26	intet omslag til mørk	N/A	N/A
27	15	17	19
28	intet omslag til lys	N/A	N/A



Novosticks - indikerer bedste tidspunkt for parring.

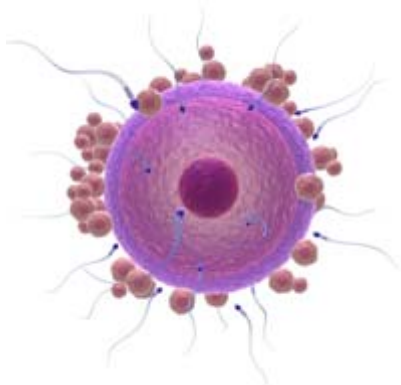
Novosticks er udviklet for opdrættere og hundeejere, der planlægger et kuld hvalpe, og dermed står foran at skulle parre deres tæve. Det er ofte svært at vurdere hvor langt tæven er inde i løbetiden, og hvornår det mest gunstige tidspunkt for parring er til stede. De fleste tævehunde har ægløsning mellem 10. og 14. dagen efter løbetidens start - altså knap 2 uger efter at tæven starter blødningen. Dette gælder dog langt fra alle tæver, og kan for nogle være allerede på 5. dagen og for andre helt frem til 21. dagen.

Det optimale parringstidspunkt er 2 døgn efter ægløsningen, hvilket kan være svært at ramme uden en indikation. Andre tests kan være både stressende og ubehagelige for tæven. Dog kan gentagne blodprøver for at teste progesteronindholdet give en mere præcis indikation.

Med Novosticks kan du selv teste hvornår det mest optimale tidspunkt for parring finder sted. Novosticks er billigt, nemt og fuldstændig uden ubehag for din tæve.

Du kan bruge Novosticks hvis:

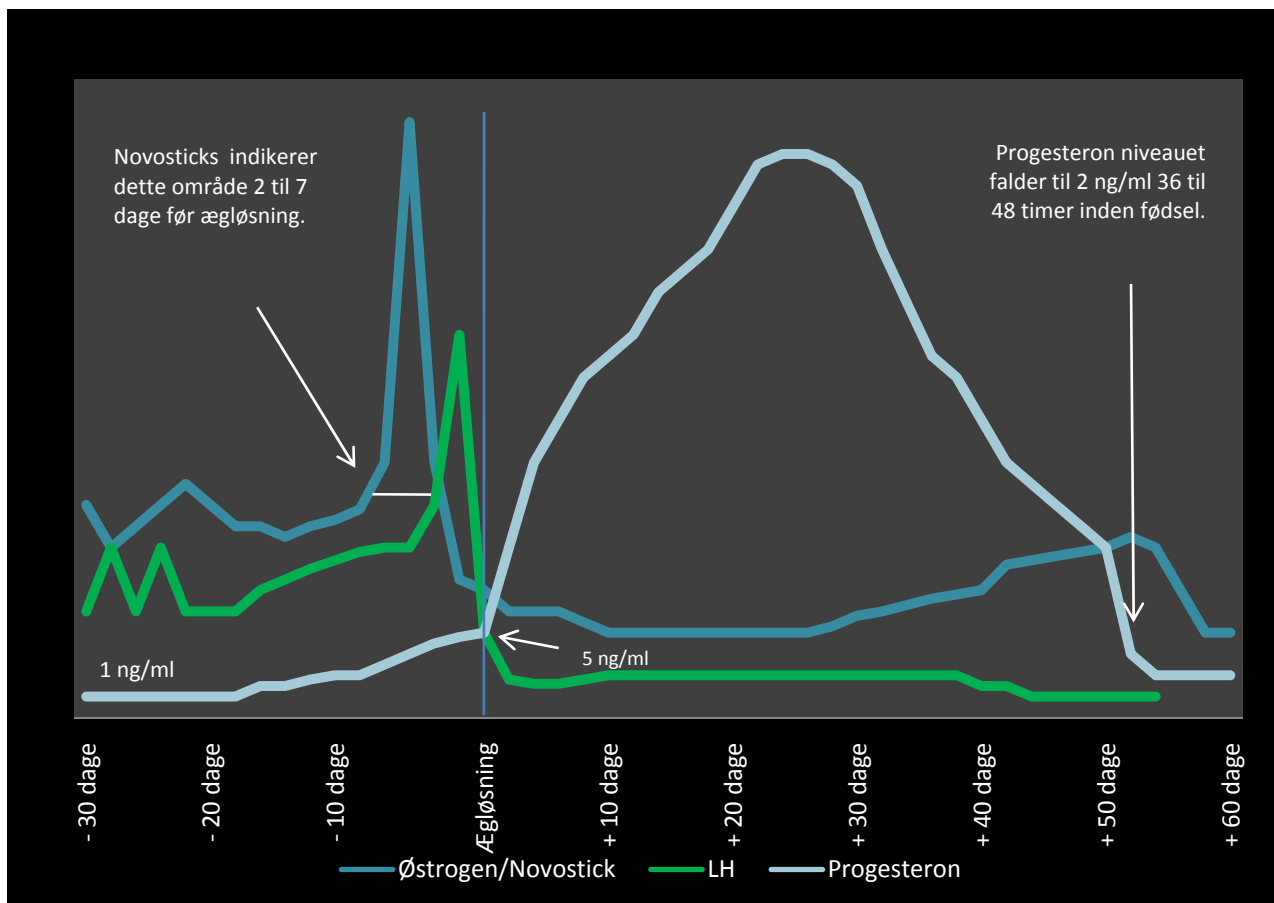
- du ønsker så stort et kuld som muligt.
- du skal rejse langt med din tæve.
- tidligere løbetider har været uregelmæssige (korte/lange, meget/lidt udflåd).
- tæven ikke har været parringsvillig i tidligere løbetider med parringsforsøg.
- tæven skal parres med en urutineret hanhund.
- tævens alder (eller andre forhold) betinger, at det er sidste mulighed for at få hvalpe.
- du ved at inseminering bliver nødvendig.



Hvordan virker det?

Novosticks måler direkte på enzymer der påvirkes når niveauet af glukose i tæven er stigende. Dermed måler den indirekte niveauet for Østrogen, da disse følges ad.

På nedenstående skema fremgår det af den blå linje hvornår tævens indhold af Østrogen stiger i forhold til selve ægløsningen.



Der er flere hormoner, der medvirker til at regulere tævens løbetidscyklus og efterfølgende drægtighed.

Østrogen: stimulerer æggestokkene til at producere æg.

Luteiniserende Hormon LH: stimulerer æggestokkene til at frigive ægget.

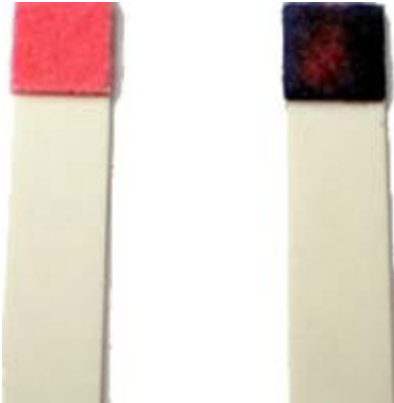
Progesteron: Fastholder drægtighed.

Hunde har ægløsning når niveauerne for østrogen og LH er faldende og progesteron er stigende. Vær opmærksom på, at fersk sæd er levedygtigt i 5 til 7 dage.

Sådan bruges Novosticks korrekt - Vejledning.

1. Tør området omkring kønsåbningen og rengør for snavs, blod og udfald.
2. Åben kønsåbningen og før forsigtigt Novostick'en med den lyserøde indikator sidelæns 2 til 3 cm. ind i skeden.

3. Lad Novostick'en sidde i 10 til 15 sekunder.
4. Fjern Novostick'en og vær opmærksom på om den er blevet fugtig af væske fra skeden.
5. Læs resultatet med det samme og sammenlign med resultaterne på billederne nedenfor, hvis du er usikker.



Novostick'en til venstre indikerer, at Østrogen niveauet er lavt idet den har ikke skiftet farve.

Novostick'en til højre har skiftet farve, og er blevet mørk, hvilket indikere at Østrogen niveauet er højt.

Vær opmærksom på.

Ovenstående graf viser, at Novosticken giver udslag, når Østrogen niveauet er højt. Et par dage før selve ægløsningen falder Østrogen niveauet, hvor Novosticken ikke giver udslag eller kun et meget lille udslag.

Et eksempel på processen kunne være således:

1. Begynd at test tæven fra starten af løbetiden.
2. På et tidspunkt giver Novosticken udslag som følge af forhøjet Østrogen niveau. Du ved nu, at tæven vil have ægløsning indenfor 2 til 7 dage.
3. Østrogen niveauet falder og Novosticken giver ikke udslag eller kun svagt udslag. Du ved nu at ægløsning er nært forstående indenfor de nærmeste døgn.
4. Det optimale parringstidspunkt er ca. 2 døgn herefter.

Sådan opbevares Novosticks korrekt - Vigtigt.

For at sikre dine Novosticks tester korrekt, er det vigtigt, at de ikke udsættes for fugt eller sollys.

Vær også opmærksom på, at du ikke rører ved/sætter dine fingre på den lyserøde "testpude".

Der er begrænset holbarhed på Novostick. Korrekt opbevaring forlænger dog denne.

Du kan forvente ca. 1 års funktionalitet. Novodog stiller dog ikke garanti for dette.

Du bør altid opbevarer dine Novosticks i original emballage.