

KATRIN RÖTTGER

**UNTERSUCHUNGEN ZUR DURCHFÜHRUNG DER
EXFOLIATIVEN VAGINALZyTOLOGIE BEI DER HÜNDIN**

-
EIN BEITRAG ZUR STANDARDISIERUNG DIESER
DIAGNOSTISCHEN METHODE



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-
Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**UNTERSUCHUNGEN ZUR DURCHFÜHRUNG DER EXFOLIATIVEN
VAGINALZYTOLOGIE BEI DER HÜNDIN
- EIN BEITRAG ZUR STANDARDISIERUNG DIESER
DIAGNOSTISCHEN METHODE -**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Katrin Röttger

Tierärztin aus Ahaus

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in: Prof. Dr. A. Wehrend

Prof. Dr. C. Herden

Tag der Disputation: 13. Juli 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
2	Literatur	2
2.1	Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Vestibulovaginalkanals bei der geschlechtsreifen Hündin	2
2.2	Physiologische Veränderungen am Vaginalepithel der Hündin	4
2.2.1	Anöstrus.....	4
2.2.2	Proöstrus.....	4
2.2.3	Östrus	6
2.2.4	Metöstrus	7
2.3	Pathologische Veränderungen am Vaginalepithel der Hündin.....	8
2.3.1	Vaginitis	8
2.3.2	Vaginaltumore.....	10
2.3.3	Ovarialzysten	15
2.4	Methoden zur Untersuchung von Veränderungen des Vaginalepithels	17
2.4.1	Exfoliative Vaginalzytologie.....	17
2.4.2	Vaginoskopie	27
2.4.3	Endoskopie	28
2.5	Progesteronkonzentration während des Zyklus bei der Hündin.....	29
3	Material und Methoden	31
3.1	Tiere	31
3.2	Methoden.....	33
3.2.1	Vorunteruntersuchung.....	33
3.2.2	Exfoliative Vaginalzytologie.....	36
3.2.3	Beurteilung des Zyklusstandes	37
3.2.4	Probenentnahme	39

Inhaltsverzeichnis

3.2.5	Probenaufbereitung.....	41
3.2.6	Endokrinologische Untersuchung	42
3.2.7	Lichtmikroskopische Auswertung der Vaginalzytologien.....	42
3.3	Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlich behandelten Vaginalzytologien.....	51
3.4	Statistische Analysen	52
4	Ergebnisse.....	56
4.1	Einfluss der Entnahmelokalisation.....	56
4.1.1	Zytologische Auswertung.....	56
4.1.2	Zykluseinteilung	69
4.1.3	Zykluseinteilung mit Berücksichtigung der Progesteronwerte	70
4.2	Einfluss von trockenen und feuchten Tupfern.....	82
4.2.1	Zytologische Auswertung.....	82
4.2.2	Zykluseinteilung	98
4.3	Einfluss von unterschiedlichen Fixierungsmethoden	100
4.3.1	Ergebnisse der zytologischen Auswertung	100
4.3.2	Zykluseinteilung	116
4.3.3	Zellgrößen im Vergleich	117
4.4.	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern ...	118
4.4.1	Zyklusbeurteilung nach Entnahme von zwei unterschiedlichen Orten .	118
4.4.2	Zyklusbeurteilung nach Entnahme mit unterschiedlichen Tupfern	119
4.4.3	Zyklusbeurteilung nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden	120
5	Diskussion.....	121
5.1	Diskussion der Fragestellung	121
5.2	Diskussion der Methodik	123
5.3	Diskussion der Ergebnisse	127

5.3.1	Einfluss der Entnahmelokalisationen	127
5.3.2	Einfluss von trockenen und feuchten Tupfern	135
5.3.3	Einfluss von unterschiedlichen Fixierungsmethoden.....	137
5.3.4	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei mehreren Untersuchern	139
5.4	Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis.....	142
6	Zusammenfassung	144
7	Summary.....	148
8	Anhang.....	152
9	Literaturverzeichnis	161

Abkürzungsverzeichnis

A	Fläche	NG	Neutrophile Granulozyten
Abb.	Abbildung	ng	Nanogramm
AÖ	Anöstrus	Ö	Östrus
BZ	Basalzellen	p	Signifikanzwert
ca.	circa	PÖ	Proöstrus
cm	Zentimeter	PZ	Parabasalzellen
Ery	Erythrozyten	r	Radius
et al.	et alii	r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
Hrsg.	Herausgeber	SA	Standardabweichung
IZ	Intermediärzellen	Sch	Schollen
KZ	Keratinisierte Zellen / Keratinocyten	SZ	Superficialzellen
LH	Luteinisierendes Hormon	x_a	Arithmetischer Mittelwert
ml	Milliliter		
mm	Millimeter		
MÖ	Metöstrus	%	Prozent
μm	Mikrometer	®	Warenzeichen
n	Menge		

1 Einleitung

Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin stellt ein weit verbreitetes Untersuchungsverfahren im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung dar (DREIER, 1975/a; LINDE und KARLSSON, 1984; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; SODERBERG, 1986/a; TAMMER et al., 1994; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). Sie findet Einsatz bei einer Vielzahl von Indikationen, da die Abstrichbilder des Vaginalepithels Rückschlüsse auf physiologische und pathologische Befunde im Genitaltrakt der Hündin zulassen.

Die häufigste Anwendung findet die exfoliative Vaginalzytologie im Rahmen der Deckzeitpunktbestimmung und der Zyklusbestimmung bei der Hündin.

Die Vaginalzytologie eignet sich ferner für die Detektion von unterschiedlichen Gynäkopathien. Sie kann für den Nachweis einer unvollständigen Kastration (MILLER, 1995) und zur Diagnostik von hormonell aktiven Ovarialzysten angewandt werden (FAYRER-OSKEN et al., 1992; WEHREND, 2007). Auch eine offene Pyometra sowie eine Vaginitis können mit Hilfe einer Vaginalzytologie leichter diagnostiziert werden (DREIER, 1975/a; JOHNSON, 1991; WEHREND, 2007).

Im Gegensatz zur Situation in der Humangynäkologie, in der Entnahme, Behandlung und Auswertung von Zytologien aus dem weiblichen Genitale stark schematisiert sind um Fehldiagnosen zu vermeiden, existieren solche Angaben in der caninen Reproduktionsmedizin nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen, ob Entnahme, Behandlung und Aufarbeitung Einfluss auf die diagnostische Aussage caniner exfoliativer Vaginalzytologien besitzen.

Des Weiteren ist zu untersuchen, ob sich eine Zytologie, die aus dem Vestibulum entnommen wurde, in gleicher Weise eignet für die Zyklusbestimmung wie die exfoliative Zytologie aus der Vagina.

2 Literatur

2.1 Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau des Vestibulovaginalkanals bei der geschlechtsreifen Hündin

Die Vagina reicht bei der Hündin vom äußeren Muttermund, *Ostium uteri externum*, bis zur Mündung der Harnröhre, *Ostium urethrae externum*. Der Scheidenvorhof, *Vestibulum*, beginnt caudal der Harnröhrenöffnung und schließt mit den *Labia vulvae* ab. An der Grenze zwischen Vagina und Vestibulum befindet sich bei der Hündin das Hymen in Form einer quergestellten Schleimhauerhebung (SMOLLICH und MICHEL, 1992; SALOMON et al., 2005). Das Hymen ist nur im Jungfernstadium vorhanden und bei der Hündin selten gut ausgebildet (DYCE et al., 1991).

Der Wandaufbau in Vagina und Vestibulum ähnelt sich stark und besteht aus Schleimhaut (*Tunica mucosa* und *Lamina propria*), Muskelschicht (*Tunica muscularis*) und einer sich nach außen anschließenden lockeren Bindegewebsschicht (*Adventitia*).

Die Schleimhaut der Vagina unterliegt in ihrem Aufbau sehr stark den zyklischen hormonellen Schwankungen. Das in der Follikelphase produzierte Östrogen führt zu einer Proliferation der Zellen (LINDE und KARLSSON, 1984; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; DYCE et al., 1991). Gleiches gilt für die Schleimhaut des Vestibulums, wenn auch in weniger ausgeprägter Form (SMOLLICH und MICHEL, 1992).

Die Schleimhaut ist in allen Zyklusphasen in verstreichbare Längsfalten gelegt. Diese lassen während des Partus eine enorme Dehnbarkeit der Wand zu. Im Östrus der Hündin entsteht durch die starke Epithelproliferation eine deutlich stärkere Fältelung der Schleimhaut. Die Oberfläche der Schleimhaut ist bei der Hündin im Proöstrus und im Östrus verhornt und liegt als *Epithelium stratificatum squamosum cornescens* vor, im Metöstrus und im Anöstrus ist die Schleimhaut unverhornt (LIEBICH, 1999).

Die *Lamina propria* im Vestibulovaginalkanal reicht mit flachen Papillen in den Epithelsaum hinein, wobei die Papillen im Vestibulum stärker ausgeprägt sind. Die bindegewebige Grundlage bildet ein kollagenfaserreiches Gitter mit zahlreichen elastischen Faserelementen (SMOLLICH und MICHEL, 1992; LIEBICH, 1999). Sie erlauben die Weitung und Retraktion der bindegewebigen Anteile der Scheidenwand während und unmittelbar nach der Geburt. Die subepitheliale Lage der *Lamina*

propria weist eine Vielzahl verschiedener Abwehrzellen auf. Besonders zahlreich liegen neutrophile Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen vor, wobei sowohl die Zellanzahl als auch das Verhältnis der Zellen zueinander stark vom Zyklus abhängig sind (SMOLLICH und MICHEL, 1992; LIEBICH, 1999). Auch Lymphknötchen sind häufig in der Lamina zu finden, besonders zahlreich liegen sie in *der Lamina propria* des Vestibulums vor (LIEBICH, 1999).

In der *Lamina propria* des Vestibulums sind tubulöse Drüsen, *Glandulae vestibulares minores*, lokalisiert, die bei der Hündin am Boden des Vestibulums in zwei nach vorne divergierenden Reihen liegen (RIECK und KRATZHELLER, 1955). Diese produzieren Sekret, das den Begattungsakt erleichtert und gleichzeitig im Proöstrus und Östrus stimulierend auf Rüden wirkt.

Die Venen der Vestibulumwand, welche zwischen Schleimhaut und Muskelschicht liegen, stellen ein engmaschiges Netz von kavernösen Hohlräumen dar (NITSCHKE, 1970). Diese bilden bei der Hündin in den Lateralwänden die *Bulbi vestibuli*, welche makroskopisch als dunkle Stellen in der Wand erkennbar sein können (DYCE et al., 1991; SMOLLICH und MICHEL, 1992).

Die unter der Schleimhaut liegende *Tunica muscularis* besteht aus einer inneren, spiralig angeordneten glatten Muskelschicht und einer äußeren Längsmuskelschicht. Das intermuskuläre Bindegewebe der Vagina besteht zu einem großen Teil aus einem elastisch-kollagenen Fasernetz, welches den inneren Kreismuskel und den äußeren Längsmuskel miteinander verbindet. Es dient der Stabilität, Plastizität und Kontraktilität der Scheidenwand (SMOLLICH und MICHEL, 1992; KÖNIG und LIEBICH, 2005). In der Wand des Vestibulums setzt sich die *Tunica muscularis* auf gleiche Art und Weise fort.

Im peritonäalen Teil der Beckenhöhle ist die Vagina von der lockeren *Tunica serosa* überzogen, retroperitonäal sind Vagina und Vestibulum durch die *Tunica adventitia* vom anderen Gewebe abgegrenzt.

2.2 Physiologische Veränderungen am Vaginalepithel der Hündin

Keine der zyklischen Veränderungen in der Histologie des Genitaltraktes des Hundes sind ausgeprägter als die des Vaginalepithels. (EVANS und COLE, 1931).

2.2.1 Anöstrus

Im Anöstrus ist das Vaginalepithel niedrig und umfasst nur drei bis vier Zellschichten (RIECK und KRATZHELLER, 1955). Das einschichtige *Stratum germinativum* (Basalschicht) liegt mit iso- bis hochprismatischen Zellen direkt der Basalmembran an. Es schließt sich das ein- bis zweischichtige *Stratum granulosum* und anschließend das einschichtige *Stratum superficiale* an (RIECK und KRATZHELLER, 1955; LIEBICH, 1999). ARNOLD (1994) beschrieb das Vaginalepithel als zweischichtig, wobei die lumenseitige Lage mehrschichtig erscheint.

Vaginoskopisch stellt sich die Schleimhaut im Vaginalkanal im Anöstrus in rosaroter Farbe und leicht glänzend dar. Vaginalfluor und eine deutliche Fältelung der Schleimhaut sind nicht zu erkennen (GOODMAN, 1972; DREIER, 2010).

In der Vaginalzytologie dominieren Parabasalzellen das Bild. Parabasalzellen sind rund bis ovoid und glattrandig. Das Zytoplasma ist homogen und die Zellkerne erscheinen ebenmäßig. Die durchschnittliche Größe dieser Zellart liegt zwischen 10 . 25 µm (DREIER, 1975/a; HOLST und PHEMISTER, 2001). In Einzelfällen können auch Basalzellen abschilfern und sich dadurch in der Zytologie präsentieren (RIECK und KRATZHELLER, 1955; KLÖTZER, 1974; JOHNSTON et al., 2001; DREIER, 2010). Dies sind die kleinsten Zellen. Sie besitzen eine runde Form und Zytoplasma ist nur in geringem Maße zu sehen. Ihre Größe beträgt zwischen 10 - 20 µm (DREIER, 2010).

Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten sind nur selten im anöstrischen Zellbild zu finden. Mit Beginn des Proöstrus kommt es immer zu einer Abwesenheit der neutrophilen Granulozyten (RIECK und KRATZHELLER, 1955).

2.2.2 Proöstrus

Mit Größenzunahme der Follikel und die dadurch ansteigende Östrogenkonzentration im Blut proliferieren alle Schichten des Vaginalepithels

(SCHUTTE, 1967/b; SOKOLOWSKI et al., 1973; GUYANT, 1988; WRIGHT und PARRY, 1989; TAMMER et al., 1994; FELDMAN und NELSON, 2004). Die Anzahl der Zellschichten steigt und die intraepithelialen Drüsen nehmen an Volumen zu (LEISER, 1990). Der Sinn dieser physiologischen Veränderung ist ein natürlicher Schutz der Vagina bei einem eventuell standfindenden Deckakt (GUYANT, 1988; JEFFCOATE und LINDSAY, 1989; GOODMAN, 1992).

Zu erwähnen sind die oberflächlichen Epithelzellen des *Stratum superficiale*, die aufgrund der Dickenzunahme des Epithels und der dadurch entstehenden mangelhaften Blutversorgung eine Keratinisierung vollziehen und so das *Stratum corneum* bilden. RIECK und KRATZHELLER (1955) sprachen hier sogar von mehr als 20 Zellschichten allein im *Stratum corneum*. TAMMER et al. (1994) beschrieben neben einer östrogenbedingten Zunahme der Epithelschichten von vier bis sechs Lagen auf mehr als 20 Lagen auch ein Größenwachstum der Zellen.

Aufgrund der beginnenden Ödematisierung der Schleimhaut durch den steigenden Östrogengehalt präsentiert sich diese bei einer vaginoskopischen Untersuchung mit Längs- und Querfalten und je nach Ausprägungsgrad auch mit Sekundärfalten (DREIER, 2010). Während der Epithelproliferation werden die Zellkerne der oberen Zellschichten pyknotisch und lösen sich in den verhornten Zellen vollständig auf (ALLEN, 1985). Aus der *Lamina propria* treten transepithelial Erythrozyten per Diapedese in das Lumen der Vagina über (SCHUTTE, 1967/b; BELL und CHRISTIE, 1971/a; ARNOLD, 1994; TAMMER et al., 1994; LIEBICH, 1999). Die Anzahl der intraepithelialen neutrophilen Granulozyten nimmt in dieser Zyklusphase ab (SIMMONS, 1970; SMOLLICH und MICHEL, 1992). DORE (1978) beschrieb das Auftreten von neutrophilen Granulozyten während des gesamten Proöstrus als physiologisch.

In der Vaginalzytologie beherrschen Intermediärzellen das Bild. Intermediärzellen sind polygonal, besitzen einen deutlichen Zellkern, der oft in der Peripherie liegt und haben eine Größe von 20 . 60 µm (DREIER, 1975/a; DREIER, 2005). Einige Autoren unterscheiden zwischen großen und kleinen Intermediärzellen, wobei die großen Intermediärzellen einen Durchmesser von 30 µm überschreiten (SCHUTTE, 1967/a; HOLST und PHEMISTER, 2001).

Im frühen Proöstrus sind neben Intermediärzellen meistens auch noch einige wenige Parabasalzellen erkennbar (SCHUTTE, 1967/b). Im weiteren Verlauf des Proöstrus

kommt es durch die proliferierende Verhornung zum Anstieg der noch kernhaltigen Superficialzellen und der großen Intermediärzellen. Vereinzelt können in dieser Phase auch bereits Schollen vorhanden sein (SCHUTTE, 1967/b; BELL und CHRISTIE, 1971/b; ARNOLD, 1994; TAMMMER et al., 1994). Superficialzellen sind polygonale Zellen mit durchsichtigem Zytoplasma und unterschiedlich stark aufgeworfenen Zellrändern (BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a). Der Zellkern ist pyknotisch und hat einen maximalen Durchmesser von weniger als 5 µm. Schollen haben das gleiche Erscheinungsbild wie die Superficialzellen, besitzen jedoch keinen Zellkern mehr.

2.2.3 Östrus

Vor der Ovulation fällt der Östrogenspiegel im Plasma und die Progesteronkonzentration nimmt deutlich zu. Durch die fehlenden Östrogene nimmt die Ödematisierung der Vaginalschleimhaut ab und verliert an Volumen. Dadurch sind in der vaginoskopischen Untersuchung zusätzlich zu den Längs- und Querfalten noch Sekundärfalten erkennbar (DREIER, 2010), die das typische „Kopfsteinpflaster“ in der Vaginoskopie erscheinen lassen. Die Schleimhaut erscheint in der Vaginoskopie trocken und blass. Auch eine übermäßige Zellproduktion im *Stratum germinativum* nimmt aufgrund des sinkenden Östrogenspiegels ab. In der Lutealphase kommt es zur Desquamation der Zellen des *Stratum corneum* (RIECK und KRATZHELLER, 1955). Die Keratinisierung und das Abschilfern ist in dieser Zyklusphase am stärksten ausgeprägt (WRIGHT und PARRY, 1989; PÉREZ et al., 2005). Abgeschilferte Zellen stellen sich in der Vaginalzytologie meist als Superficialzellen mit pyknotischem Kern und im späteren Östrusverlauf ohne Kern, als so genannte Schollen, dar. Die Zellgrenzen der Superficialzellen sind in den ersten Östrustagen klar abgrenzbar. Dieses Phänomen verschwindet zum Ende dieser Zyklusphase. Dann liegen die Zellen oft in einer Ansammlung in Form von Nestern zusammen (OLSON et al., 1984; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984).

Die maximale Kornifikation tritt drei bis sechs Tage nach dem LH-Peak auf, wobei der Anteil der verhornten Zellen dann mindestens 90 % der Zellen im Vaginaausstrich betragen kann (HOLST und PHEMISTER, 2001). MESTRE et al.

(1990) stellten fest, dass die maximale Kornifikation des Vaginalepithels zwei Tage nach dem Östradiol-Peak auftritt.

Bei einigen Hündinnen treten auch im Östrus vereinzelt Erythrozyten im Zellausstrich auf (BARRETT, 1976). Neutrophile Granulozyten sind meistens erst postovulationem sichtbar und sind ein Anzeichen für den absinkenden Östrogeneinfluß (BARRETT, 1976).

2.2.4 Metöstrus

Im sich anschließenden Metöstrus nimmt die Epithelhöhe weiter ab (SOKOLOWSKI et al., 1973). Die Schleimhaut im Vaginalkanal ist im Metöstrus aufgrund der geringen Östrogenkonzentration nur noch in den ersten Tagen ödematisiert. Sie bekommt eine rosarote Farbe. In der Vaginoskopie erscheint sie glänzend und nur Längsfalten sind in den ersten Tagen dieser Zyklusphase zu erkennen (DREIER, 2010).

In der ersten Hälfte des Metöstrus wird von durchschnittlich sieben Zellschichten, in der zweiten Metöstrusphase wird nur noch von durchschnittlich drei Epithelschichten gesprochen (DORE, 1978). Unverhornte Zellen bilden die Deckschicht des Epithels. Charakteristisch für die ersten Tage im Metöstrus ist eine hohe Anzahl von neutrophile Granulozyten im Vaginalabstrich (SCHUTTE, 1967/b; KLÖTZER, 1974; BARRETT, 1976; ARNOLD, 1994). Diese wandern aus der *Lamina propria* kommend in den Epithelsaum und in das Lumen ein (SMOLLICH und MICHEL, 1992). GÜNZEL und KOIVISTO (1984) und POST (1985) charakterisierten über das Auftreten von neutrophilen Granulozyten den Beginn des Metöstrus.

In der Zytologie kommt es zu einem abrupten Wandel im Zellbild (OLSON et al., 1984). Der Wechsel von einem östrischen Zellbild in ein metöstrisches Zellbild vollzieht sich innerhalb von 24 bis 48 Stunden (PÉREZ, 2005). In der Vaginalzytologie sind nur noch in den ersten Tagen Superfizialzellen zu finden. Die relative Anzahl der Parabasalzellen und der kleinen Intermediärzellen steigt rapide an (HOLST und PHEMISTER, 2001). Im frühen Metöstrus kommt es zu einem Zellmischbild aus Superfizialzellen, Intermediärzellen und Parabasalzellen (GÜNZEL und KOIVISTO, 1984). SIMMONS (1970) beschrieb im Metöstrus das Vorkommen von Detritus. Die unverhornten Zellen bilden im Verlaufe des Metöstrus schnell die

Mehrzahl der vorhandenen Zellen in der Vaginalzytologie. Die tieferen Epithelschichten, folglich Intermediärzellen und Parabasalzellen, dominieren den weiteren Verlauf dieser Zyklusphase (SCHUTTE, 1967/b; BELL und CHRISTIE, 1971/b; BARRETT, 1976; DORE, 1978; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; OLSON et al., 1984; ALLEN, 1985; ARNOLD, 1994)

Aus der Submukosa wandern in den ersten Tagen des Metöstrus die neutrophilen Granulozyten in die Vaginalschleimhaut ein. Ein Teil der Blutzellen dringt dabei in die Epithelzellen ein (RIECK und KRATZHELLER, 1955). Es entstehen die so genannten Metöstruszellen, eine typische Zellart für den Metöstrus. HOLST und PHEMISTER (2001), FELDMAN und NELSON (200) und GÜNZEL und KOIVISTO (1984) beschrieben sie als große Intermediärzellen, in deren Zytoplasma ein oder mehrere neutrophile Granulozyten eingeschlossen sind. Für SCHUTTE (1967/a) und WRIGHT und PARRY (1989) handelte es sich bei den Metöstruszellen um modifizierte Parabasalzellen mit eingeschlossenen oder mit ihnen assoziierten neutrophilen Granulozyten.

Einige Autoren nennen zusätzlich Schaumzellen als typische Zellen im Metöstrus. RIECK und KRATZHELLER (1955) beschrieben die Schaumzellen als Intermediärzellen mit Vakuolen im Zytoplasma. Für WRIGHT und PARRY (1989) und FELDMAN und NELSON (2004) handelte es sich dabei um modifizierte Parabasalzellen.

2.3 Pathologische Veränderungen am Vaginalepithel der Hündin

2.3.1 Vaginitis

Vaginitiden kommen sowohl bei kastrierten als auch bei unkastrierten Tieren vor. Sie werden als die häufigste vaginale Erkrankung betrachtet (SODERBERG, 1986/b; JOHNSON, 1991).

Die Vaginitis der Hündin wird in zwei unterschiedliche Formen unterteilt: die juvenile Vaginitis bei der jungen Hündin und die Scheidenentzündung der adulten Hündin (SCHANEN und FEHR, 1998).

2.3.1.1 Vaginitis der adulten Hündin

Der Vaginitis der adulten Hündin liegt häufig eine infektiöse Ursache zugrunde (JOHNSON, 1991; SCHANEN und FEHR, 1998). SODERBERG (1986/b) bezeichnete diese Form eher als Folge- oder Begleiterkrankungen anderer Grunderkrankungen, die der vaginalen Bakterienflora eine Proliferation ermöglichen. Zu diesen Grunderkrankungen zählen anatomische Anomalien (FELDMAN und NELSON, 2004), Vaginaltumoren (SODERBERG, 1986/b; SCHANEN und FEHR, 1998), Fremdkörper (SODERBERG, 1986/b; SCHANEN und FEHR, 1998), Harntrakterkrankungen und systemische Erkrankungen (GUYANT, 1988; KYLES et al., 1996). Eine Infektion mit Caninen Herpesviren kann ebenso verantwortlich sein für eine Vaginitis (HASHIMOTO et al., 1983). Auch ein Trauma, wie es im Zusammenhang mit dem Deckakt oder bei Dystokien auftreten kann, vermag die Ursache für eine Vaginitis sein. Ebenso kann die offene Form der Pyometra Auslöser für eine pathologische Verschiebung der Vaginalflora sein (SODERBERG, 1986/b; ARNOLD, 1994; SCHANEN und FEHR, 1998).

Eine sekundäre Vaginitis liegt dann vor, wenn diese Erkrankung bei Hündinnen infolge einer Kastration auftritt (SODERBERG, 1986/b; KYLES et al.; 1996). Hier kommt es aufgrund des fehlenden Östrogeneinflusses zu einer Schrumpfung des Vaginalepithels und einer ausbleibenden Keratinisierung des Epithels, was wiederum zu einer Abwehrschwäche der Vaginalflora führen kann (BARNER, 2007).

Scheidenausfluss ist als klinisches Leitsymptom zu nennen, wobei dieser sowohl mukösen, purulenten oder blutigen Charakter aufweisen kann (SODERBERG, 1986/b; SCHANEN und FEHR, 1998).

Da auch Uteruserkrankungen zu Vaginalausfluß führen können, müssen diese differentialdiagnostisch von den Vaginitiden abgegrenzt werden. Eine diagnostische Hilfestellung für die Unterscheidung zwischen Uteruserkrankung und Vaginitis kann die vaginalzytologie sein (SODERBERG, 1986/b; JOHNSON, 1991). Vaginalepithelzellen mit oder ohne Kern kommen im Rahmen einer Vaginitis häufig in größeren Anhäufungen vor (BURKE, 1986). Die Mehrheit der Epithelzellen besteht bei der Vaginitis aus nichtverhornten Zellen (JOHNSON, 1991). Neutrophile Granulozyten können intakt oder degeneriert vorliegen und sind die Zellart, die am stärksten vertreten ist in der Zytologie einer an Vaginitis erkrankten Hündin (OLSON

et al., 1984; BURKE, 1986; JOHNSON, 1991; WEHREND, 2007). Bakterien sind sowohl frei als auch im phagozytierten Zustand vorhanden (OSLON, 1984; BURKE, 1986; GUYANT, 1988; FELDMAN und NELSON, 2004). Bei einer chronischen Vaginitis können sich in der Vaginalzytologie zusätzlich Makrophagen und Lymphozyten präsentieren (GUYANT, 1988).

Auf eine offene Pyometra dagegen deuten eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in Verbindung mit Endometriumzellen hin (GUYANT, 1988; ALLEN, 1994).

2.3.1.2 Juvenile Vaginitis

Diese Form der Vaginitis ist eine plurikausale Erkrankung, deren Ätiologie nicht vollständig geklärt ist. Es werden immunologische, alimentäre und hygienische Komponenten in Betracht gezogen (ARNOLD, 1994; SCHANEN und FEHR, 1998). ARNOLD (1994) erwähnte ursächlich eine Unterversorgung mit Vitamin A und JOHNSON (1991) beschrieb eine Unreife des Reproduktionstraktes verbunden mit einer noch geringen Östrogenisierung der Vaginalschleimhaut als Grund für die juvenile Vaginitis. ARBEITER und GEIGENMÜLLER (1969) gingen davon aus, dass es sich um eine Infektion handelt, da wiederholt in Zwingerhaltung alle Hündinnen eines kompletten Wurfes erkrankten.

Vaginalzytologisch zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Vaginitis der adulten Hündin.

In den meisten Fällen der juvenilen Vaginitis kommt es zur Selbstheilung nach der ersten Läufigkeit, da das Vaginalepithel eine östrogenbedingte Keratinisierung durchläuft und somit die lokale Abwehr gesteigert wird (ARNOLD, 1994; SCHANEN und FEHR, 1998, FELDMAN und NELSON, 2004).

2.3.2 Vaginaltumore

Der prozentuale Anteil der Vaginaltumoren an der Gesamtheit der caninen Tumoren ist mit 2 . 3 % relativ gering (KANG und HOLMBERG, 1983; SCHANEN und FEHR, 1998). Zu 73 % liegen die Neoplasien im Vestibulovaginalkanal in benignen Form vor

(THACHER und BRADLEY, 1983). SCHANEN und FEHR (1998) sprachen sogar von einem Anteil benigner Tumoren von 80 %.

Zu den häufigsten benignen Tumorarten in der Vagina der Hündin zählen Leiomyome und Fibrome (ARBEITER, 1961; HOLLER und HOLZMANN, 1982; THACHER und BRADLEY, 1983). KANG und HOLMBERG (1983) erwähnten zusätzlich noch die Fibroleiomyome. ARNOLD (1994) bezeichnete dagegen Lipome als die am häufigsten auftretende Neoplasieform und MANOTHAIUDOM und JOHNSTON (1991) zählten die Leiomyome und die transmissiblen venerischen Tumoren zu den häufigsten Neoplasien im Vaginaltrakt der Hündin.

Die häufigste maligne Neoplasie ist das Leiomyosarkom (THACHER und BRADLEY, 1983; MANOTHAIUDOM und JOHNSTON, 1991).

Zu den typischen Symptomen einer vaginalen Neoplasie zählen Vaginalfluor und eine Vulvaschwellung. Erst im fortgeschrittenen Stadium können auch Tenesmus und Dysurie auftreten. Adspektion und Palpation stellen wichtige Hilfsmittel zur Diagnostizierung eines Tumors dar. In einigen Fällen ist die Neoplasie bereits bei der vaginoskopischen Untersuchung sichtbar (SCHANEN und FEHR, 1998). Ist die gewebige Masse in der Rima vulvae für den Besitzer erkennbar, so ist dies ein häufiger Vorstellungsgrund beim Tierarzt (THACHER und BRADLEY, 1983).

In der Vaginalzytologie kann vom Zellbild selten auf einen Tumor geschlossen werden, da die Tumoren in den meisten Fällen benigne und langsam wachsend sind und nur wenig Zellmaterial abschilfern (WEHREND, 2007). Lediglich der übertragbare venerische Tumor (Sticker-Sarkom) zeigt im Zytologiebild ein typisches Zellbild (McENTEE und NIELSEN, 1976; ERÜNAL-MARAL et al., 2000). FELDMAN und NELSON (2004) vertraten dagegen die Meinung, dass Tumoren, welche in den Vaginalkanal hineinwachsen, immer Zellen abschilfern und somit in der Zytologie diagnostiziert werden können.

2.3.2.1 Leiomyom

Das Leiomyom ist eine gutartige Neoplasie der glatten Muskelzellen von fester, knotiger Konsistenz (McENTEE und NIELSEN, 1976; THACHER und BRADLEY, 1983; WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999). Das Leiomyom hat mit 2,4 % ein relativ

häufiges Vorkommen unter allen caninen Neoplasien (KANG und HOLMBERG, 1983).

Es handelt sich um eine solitäre oder multiple extra- oder intraluminale Neubildung (KANG und HOLMBERG, 1983). ARBEITER (1961) beschrieb sie als gut abgesetzt und verschieblich. Sie haben eine gräulich-weiße Farbe und sind derb und wenig vaskuliert (SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005). In den meisten Fällen liegen die Leiomyome gestielt vor (KANG und HOLMBERG, 1983). Sie wachsen manchmal polypenartig (SCHANEN und FEHR, 1998).

Vom Dach des Vestibulums ausgehend verursachen extraluminale Leiomyome oft eine Vorwölbung des Perineums (ARBEITER, 1961; KANG und HOLMBERG, 1983). Intraluminale Leiomyome gehen von der Vaginal- oder Vestibularwand aus und ragen bei entsprechender Größe aus der Rima vulvae hervor.

Da die Entstehung der Leiomyome wahrscheinlich auf die Wirkung von Östrogenen zurückzuführen ist, lässt sich diese Tumorart ausschließlich bei unkastrierten Hündinnen diagnostizieren (THACHER und BRADLEY, 1983). Als Ursache werden Ovarialzysten, östrogenproduzierende Eierstockstumoren und zystische Hyperplasien des Endometriums in Betracht gezogen (HERRON, 1983; KANG und HOLMBERG, 1983; WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999) und als Präventionsmaßnahme nannten dem zu Folge KANG und HOLMBERG (1983) die Ovariohysterektomie.

Nach erfolgreicher chirurgischer Entfernung der Leiomyome ist nur in seltenen Fällen mit einem Rezidiv zu rechnen (HERRON, 1983; KANG und HOLMBERG, 1983; THACHER und BRADLEY, 1983).

2.3.2.2. Fibrom

Fibrome gelten als gutartige Geschwülste des kollagenen Bindegewebes, welche von ihrer Umgebung abgesetzt, selten jedoch abgekapselt sind (SANDERSLEBEN, 1989). Sie treten multipel oder solitär auf und weisen eine weißlich-gelbe Farbe auf (McENTEE und NIELSEN, 1976; WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999). Oft wachsen sie polypenartig in den Vaginalkanal hinein (SCHANEN und FEHR, 1998). Fibrome in tieferen Gewebsschichten können in Form von multifokal aufschießenden Knoten in unterschiedlichen Größen wachsen (ARBEITER, 1961).

In der Histopathologie kann von einem faserreichen, zellarmen Tumortyp, *Fibroma durum*, und einem faserarmen, zellreichen Typ mit weicher Konsistenz, *Fibroma molle*, unterschieden werden (SANDERSLEBEN, 1989).

Die Pathogenese der Fibrome ist ähnlich wie die der Leiomyome (SANDERSLEBEN, 1989).

2.3.2.3. Lipom

Lipome als Geschwülste des Fettgewebes besitzen oft ein traubenartig Aussehen, sind gut abgesetzt und treten häufig solitär auf (ARBEITER, 1961). Sie können intra- und extraluminal wachsen. THACHER und BRADLEY (1983) beobachteten häufig ein perivaginales und perianales Wachstum. ARBEITER (1961) nannte die Klitorisgrube als vermehrt auftretenden Entstehungsort der Lipome.

2.3.2.4 Leiomyosarkom

Hier handelt es sich um die bedeutendste maligne Neoplasie im Vestibulovaginalkanal Vulva bei der Hündin (THACHER und BRADLEY, 1983). Das Leiomyosarkom ist in seiner phänotypischen Form sehr variabel und kann aussehen wie ein Leiomyom (McENTEE und NIELSEN, 1976). Aber auch dunkel verfärbte und durchlöcherichte oder nekrotische Leiomyosarkome wurden beobachtet (THACHER und BRADLEY, 1983).

2.3.2.5 Transmissibler venerischer Tumor (Sticker Sarkom)

Der Transmissible venerische Tumor, auch Sticker Sarkom genannt, gehört zu den häufigsten Neoplasien beim Hund (DE BRITO et al., 2006).

Das Sticker Sarkom tritt sowohl an den Schleimhäuten der Genitalien beider Geschlechter als auch an den Kopfschleimhäuten auf, wobei der prozentuale Anteil der erkrankten Hündinnen größer ist als Anteil der betroffenen Rüden (ERÜNALMARAL et al., 2000; SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005; PARK et al., 2006). Das Sticker Sarkom wird durch den Deckakt oder durch Sozialkontakt in Form von Lecken von Tier zu Tier übertragen (VON HOLDT und OSTRANDER, 2006). ALLEN (1994) mutmaßte, dass ein übertragbares Virus für die Entstehung dieser Tumorart

verantwortlich sei. Eine mögliche Übertragung des Tumors durch Implantation von Tumorzellen setzt kleine Läsionen der Schleimhäute voraus (LAGING und KRÖNING, 1989; ERÜNAL-MARAL et al., 2000).

Der Transmissible venerische Tumor gehört zu den Rundzelltumoren. Makroskopisch zeigen Sticker Sarkome ein mehrlappiges Wachstum. Erst zwei bis vier Monaten nach Infektion erhalten die Neoplasien die typische blumenkohlartige Struktur (ERÜNAL-MARAL, 2000). Sie sind langsam wachsend, besitzen eine brüchige Konsistenz, ulzerieren oft und werden als leicht blutend beschrieben (HERRON, 1983; LAGING und KRÖNING, 1989; ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Es kann zum Absondern von serosanguinösen oder blutigen Flüssigkeiten kommen (SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005), welches dann auch häufig der Vorstellungsgrund in der Tierarztpraxis ist, da die Hunde folglich Ausfluss aus Penis oder Vulva zeigen können.

Typisch für das Sticker Sarkom ist eine schnelle Wachstumsperiode mit einer sich anschließenden Ruhephase, in der der Tumor nicht weiter an Größe zunimmt (HERRON, 1983; YANG, 1988; PARK et al., 2006). Zwei bis drei Wochen nach Zellimplantation beginnt die Vermehrung der Zellen.

Das Sticker Sarkom geht gewöhnlich aus der Submukosa der Vaginalwand hervor und kann einen Durchmesser von bis zu 15 cm erreichen (LAGING und KRÖNING, 1989; SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005).

Der Transmissible venerische Tumor kann mit Hilfe der Vaginalzytologie diagnostiziert werden (GUYANT, 1988; KUSTRITZ, 2006). Die leicht abschilfernden Zellen liegen in der Zytologie immer getrennt voneinander, aber dennoch in großen Zellgruppen vor. Der Zellkern ist rund und das Verhältnis Zellkern zu Zytoplasma ist zugunsten des Kerns verschoben. Das Zytoplasma weist eine Basophilie auf und schließt in vielen Fällen Vakuolen ein (GUYANT, 1988; ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Entzündungszellen können zwischen den Tumorzellen präsent sein. Andere diagnostische Methoden können die Feinnadelaspiration, die Abklatschzytologie oder die Biopsieentnahme aus Tumorgewebe oder bereits infiltrierten Lymphknoten sein (SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005).

Metastasen sind sehr selten und können nur bei 5 % der betroffenen Hunde nachgewiesen werden (LAGING und KRÖNING, 1989). Sie treten vermehrt auf bei Hunden mit schlechter Kondition (PAKR et al., 2006). Betroffene Organe bei der

Metastasierung sind Milchdrüse und Uterusgekröse sowie Augen, zentrales Nervensystem, Tonsillen, Lippen, Zunge und Muskulatur (HERRON, 1983; SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005).

HERRON (1983) diskutierte über eine mögliche Ausbildung einer Immunität bei betroffenen Hunden.

Auch in der Therapie bildet der Transmissible venerische Tumor bei den Vaginalneoplasien eine Ausnahme. Der Tumor kann sowohl chirurgisch als auch kryochirurgisch sowie mittels Radiotherapie oder Chemotherapie behandelt werden (ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Für die Chemotherapie gibt es verschiedene Protokolle, in denen unterschiedliche Behandlungsschemata mit Vincristin beschrieben werden (HERRON, 1983; ERÜNAL-MARAL et al., 2000). Da das Sticker-Sarkom hervorragend auf eine Vincristin-Behandlung anspricht, ist diese Therapie der Goldstandard (SUTTER-STEINMANN und PARVIS, 2005). Die chirurgische Entfernung hielt HERRON (1983) aufgrund der guten Therapiemöglichkeit mit Vincristin nicht mehr für notwendig.

Unter experimentellen Bedingungen haben tumorassoziierte Antigene bei gesunden Tieren eine Immunantwort hervorgerufen, die zwei bis drei Monate nach der Implantation zu einer T-Zell-vermittelten Tumorregression führen kann (YANG, 1988). PARK et al. (2006) erwähnen auch die Möglichkeit der selten auftretenden spontanen Rückbildung nach mehreren Monaten, ohne dass ein therapeutisches Eingreifen erforderlich ist.

2.3.3 Ovarialzysten

Bei der Hündin werden Follikelzysten, Luteinzysten und Germinal-Einschlußzysten (Serosa-Einschlußzysten) beschrieben, wobei die Follikelzysten den größten Prozentsatz ausmachen (WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999). Zysten können sich auch paraovariell befinden und Überreste vom Mesonephron sein und in der Diagnostik mit Ovarialzysten verwechselt werden (FAULKNER und JOHNSON, 1980).

AKIHARA et al. (2007) definierten zusätzlich Zysten, die vom Rete ovarii ausgehen. Bei einer Untersuchung von AKIHARA et al. (2007) an 109 Ovarialzysten von Hündinnen lagen doppelt so viele Germinal-Einschlußzysten wie Follikelzysten vor.

Anovulatorische Follikel führen in vielen Fällen zu Follikelzysten. Als Ursachen für die ausbleibende Ovulation werden eine mangelhafte Haltung oder Fütterung, Uteruserkrankungen oder primäre hypophysäre Störungen genannt, da sie in letzter Konsequenz alle zu einer ungenügenden Ausschüttung von Luteinisierungshormon aus der Adenohypophyse führen können (WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999). Die Zysten treten solitär oder multipel auf, sind dünnwandig und mit einer klaren Flüssigkeit gefüllt.

Luteinzysten produzieren Progesteron und führen somit zu einem verlängerten Metöstrus (FELDMAN und NELSON, 2004). Sie sind sonographisch darstellbar und können sowohl an einem als auch an beiden Ovarien vorliegen.

Germinal-Einschlußzysten entstehen aus Teilen der Ovarserosa, die durch die Ovulation oder durch ein Trauma versprengt wurden in das Ovargewebe. Die Zysten treten meistens multipel auf (WEISS und KÄUFER-WEISS, 1999).

Östrogenproduzierende Zysten verursachen bei Hündinnen aufgrund der vermehrten Hormonausschüttung ein typisches ~~släufigkeitsbild%~~ (ROWLEY, 1980). Die Vulva ist ödematisiert, Rüden bekunden Interesse und die vaginalzytologie zeigt ein Bild mit mehr als 80 % verhornten Zellen (FAYRER-HOSKEN et al., 1992). Durch eine anhaltende Östrogenausschüttung kann es bei der Hündin zu einer glandulär-zystischen Endometriumhyperplasie oder zu einer Östrogenintoxikation kommen (FAYRER-HOSKEN et al., 1992; STRATMANN und WEHREND, 2007).

FAYRER-HOSKEN et al. (1992), TRASCH et al. (2006) und STRATMANN und WEHREND (2007) präferierten einen Therapieversuch mit GnRH-Analoga. Zeigte die hormonelle Behandlung nach 72 Stunden keinen Erfolg, so hielten FAYRER-HOSKEN et al. (1992) einen weiteren konservativen Versuch für aussichtslos, wo hingegen STRATMANN und WEHREND (2007) nach ausbleibenden klinischen Veränderungen nach sieben Tagen die doppelte Dosis verabreichten.

Bei ausbleibender Heilung ist eine Ovariohysterektomie unausweichlich, um die Folgen einer anhaltenden Östrogenproduktion und eine dadurch entstehende Östrogenintoxikation zu vermeiden (FAYRER-HOSKEN et al., 1992; STRATMANN und WEHREND, 2007). Um die Zuchttauglichkeit zu erhalten, kann als Alternative zur Ovariohysterektomie eine chirurgische Entfernung ausschließlich der Zysten durchgeführt werden. VADEN (1978) führte eine Keilresektion am betroffenen Ovar durch. FAYRER-HOSKEN et al. (1992) punktierten die Zysten und spülten den

entstandenen Hohlraum anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung. STRATMANN und WEHREND (2007) punktierten eine solitäre Zyste unter Eröffnung der Bursa ovarica. Anschließend wurde überschüssige Zystenwand chirurgisch entfernt und die Bursa wieder verschlossen.

Es konnte sowohl bei der Operationsmethode nach VADEN (1978) als auch bei STRATMANN und WEHREND (2007) von einer erfolgreichen Trächtigkeit nach chirurgischem Eingriff berichtet werden.

Die oben beschriebenen Methoden sind nur dann zulässig, wenn am Uterus keinerlei Anzeichen einer glandulär-zystischen Endometriumhyperplasie zu erkennen sind (STRATMANN und WEHREND, 2007). SHILLE et al. (1984) behaupteten sogar, dass nur eine Uterusbiopsie Aussage über die zukünftige Fertilität geben kann.

2.4 Methoden zur Untersuchung von Veränderungen des Vaginalepithels

2.4.1 Exfoliative Vaginalzytologie

Bei der exfoliativen Vaginalzytologie werden die Zellen nicht aus dem Zellverband herausgelöst sondern sie exfolieren, das heißt, sie schilfern selbständig von der Schleimhaut ab und werden vom Tupfer bei der Entnahme aufgenommen.

Das Zellbild, welches man durch einen Abstrich der Vaginalschleimhaut im Ausstrich erhält, spiegelt den Zyklusstand der Hündin wieder (SCHUTTE, 1967/a; CHRISTIE und BELL, 1970; BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a; DORE, 1978; LINDE und KARLSSON, 1984; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; SODERBERG, 1986/a; TAMMER et al., 1994; PÉREZ et al., 2005; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008; GROPPETTI et al., 2010). Dabei handelt es sich um ein minimal invasives Verfahren, welches von einem Großteil der Hunde problemlos geduldet wird.

2.4.1.1 Indikationen

Die Abstrichbilder des Vaginalepithels lassen sowohl Rückschlüsse auf ein physiologisches Epithel als auch auf pathologische Befunde zu (DREIER, 1975/a,

WRIGHT und PARRY, 1989; WRIGHT, 1990; TAMMER et al., 1994; KUSTRITZ, 2006; WEHREND, 2007).

Die häufigste Indikation für die Durchführung der Vaginalzytologie ist die Zyklusbestimmung bei der Hündin (DREIER, 1975/a und b; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007). Typische Veränderungen in der Zellmorphologie lassen Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Zyklusphasen zu (SCHUTTE, 1967/a und b; CHRISTIE und BELL, 1970; BELL et al., 1973; DORE, 1978; ALLEN, 1985; JEFFCOATE und LINDSAY, 1989; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990; WRIGHT, 1990; TAMMER et al., 1994; ARNOLD et al., 1996; PÉREZ et al., 2005; DURRANT et al., 2006; WEHREND, 2007; GROPPETTI et al., 2010). Durch Östrogeneinfluß kommt es im Proöstrus und Östrus zu einer Proliferation des im Met- und Anöstrus nur drei- bis vierschichtig vorliegenden Vaginalepithels. Das führt dazu, dass im Östrus fast ausschließlich verhornte Superfizialzellen mit pyknotischem Kern und kernlose Zellen, sogenannte Schollen, vorliegen (SCHUTTE, 1967/a; DREIER, 1975/a; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990; WEHREND, 2007). Zu den Beurteilungsmerkmalen eines gefärbten Ausstrichs gehören die Klassifizierung der Zellen nach Größe und Form, das Verhältnis Kern zu Zytoplasma sowie die Anordnung und die prozentuale Verteilung der Zellen. Zusätzlich wird der Ausstrichhintergrund und das Vorkommen von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten bewertet (DREIER, 1975/a; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990; EHLERS, 2000). Auch Hündinnen, die keine offensichtlichen Anzeichen einer Läufigkeit präsentieren, wie zum Beispiel Vulvaschwellung, serosanguinösen Ausfluss und Attraktivität für Rüden, können mit der Vaginalzytologie während einer sogenannten Stillen Hitze detektiert werden, da die hormonelle Aktivität der Ovarien physiologisch abläuft und die Veränderungen am Epithel nachgewiesen werden können (GOODMAN, 1992; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). SIMMONS (1970) ging davon aus, dass 5 -10 % aller Hündinnen eine Stille Hitze haben.

Ein anderes Einsatzgebiet der Vaginalzytologie ist die korrekte Bestimmung des Zeitpunktes für die Gabe eines Gestagens zur Läufigkeitsunterdrückung. Die Medikamentenapplikation darf nur im Anöstrus erfolgen und dieser kann mit der exfoliativen Vaginalzytologie bestimmt werden (TAMMER et al., 1994, WEHREND, 2007; TRASCH, 2008).

Die Vaginalzytologie eignet sich ebenfalls zur Abklärung einer unvollständigen Kastration von Hündinnen (Ovarian-Remnant-Syndrom, ORS). Tiere, die trotz eines operativen Eingriffs noch hormonell aktives Ovarrestgewebe besitzen, können relativ kurz nach der Operation bereits wieder Läufigkeitssymptome zeigen (WALLACE, 1991; MILLER, 1995). Die Zeit bis zur ersten wieder auftretenden Läufigkeit variiert bei den betroffenen Hündinnen sehr stark und kann einige Wochen und bis zu einem Jahr dauern (WALLACE, 1991; WEHREND, 2007). Obwohl die Östrogenkonzentration bei einem Ovarian-Remnant-Syndrom selten über dem Basalniveau von vollständig ovariectomierten Tieren liegt, lassen sich im zytologischen Zellbild betroffener Hündinnen sowohl Intermediärzellen als auch Superficialzellen und Schollen, abhängig von der entsprechenden Zyklusphase, finden (WALLACE, 1991; WEHREND, 2007).

Auch bei Verdacht auf Ovarialzysten kann eine Zytologie angefertigt werden (FAYRER-HOSKEN et al., 1992). Endokrin aktive Follikelzysten produzieren kontinuierlich Östrogen. So entstehen persistierende Zellbilder mit einem typischen Läufigkeitszellbild (DREIER, 1975/a; FAYRER-HOSKEN et al., 1992; WEHREND, 2007).

Neutrophile Granulozyten in vermehrter Anzahl im Vaginalabstrich lassen auf eine Vaginitis oder auf eine Pyometra mit geöffneter Zervix schließen. Für eine Pyometra, die konservativ behandelt werden soll mit Aglepriston, ist eine Vaginalzytologie unabdinglich. Lässt sich an ihr ein Ovarialzystensyndrom diagnostizieren, ist von dieser Therapiemethode abzuraten, da die Heilungsaussichten ohne Behandlung der Zysten sehr niedrig einzuschätzen sind (TRASCH et al., 2006; WEHREND, 2007).

Befinden sich im Abstrich noch 28 Tage post partum Entzündungszellen, spricht man von einer Uterusinvolutionsstörung (WEHREND, 2007).

Für die Deckhygiene ist ein erhöhter Keimgehalt in der Vaginalzytologie von Interesse, da eine übermäßige Keimbeseidlung eine der häufigsten Sterilitätsursachen bei der Hündin ist (ARBEITER, 1975; DREIER, 1975/a und b).

2.4.1.2 Entnahmetechnik

Es werden verschiedene Methoden für die Entnahmetechnik der Vaginalzytologie beschrieben (Tabelle 1, Tabelle 2). Die Zytologie wird häufig im Vaginalkanal

entnommen, bevorzugt am Scheidendach, was eine Verunreinigung mit sich am Vaginalboden befindlichem Schleim verhindert. Die Entnahme erfolgt im Regelfall mit Tupferträgern mit einem Wattekopf (CHRISTIE et al., 1972; TAMMER et al., 1994; EHLERS, 2000; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007). Es wird regelmäßig in der Literatur beschrieben, dass der Wattekopf vor Einführung in die Vagina mit steriler physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet wird (BARRETT, 1976; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; EHLERS, 2000; JOHNSON, 2006). SIMMONS (1970) empfahl einen feuchten Tupfer nur bei Hündinnen mit trockener Vaginalschleimhaut und ohne Vaginalausfluss zu verwenden.

In verschiedenen Publikationen wird wiederholt von einer Entnahme mit Drahtöse oder Spatel berichtet (DREIER, 1975/a; MILLS et al., 1979; OLSON et al., 1984; TAMMER et al., 1994). Auch eine Entnahme per Aspiration mittels Pipette und Kochsalzlösung wird beschrieben (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; JOHNSON, 2006).

Ein Großteil der Autoren führt zur Probenentnahme vorher ein Spreiz- oder Röhrenspekulum in die Vagina ein (MILLS et al., 1979; OLSON et al., 1984; TAMMER et al., 1994; WEHREND, 2007). Dadurch erhält der Tupfer ausschließlich Kontakt mit der Vaginalschleimhaut und die Auswertung des Zytologiebildes wird nicht durch ortsfremde, keratinisierte Zellen aus der Vulva erschwert. Es erfolgt bei Entnahme mit einem Spekulum keine Kontamination des Tupfers mit Bakterien durch kaudal gelegene Abschnitte (TAMMER et al., 1994).

Nach der Probengewinnung wird der Watteträger auf einem entfetteten Objektträger in drei Bahnen ausgerollt (BELL et al., 1973; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; OLSON et al., 1984; TAMMER et al., 1994; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007), um eine Beschädigung der Zellen zu vermeiden und ein paralleles Anbringen der Zellen auf dem Objektträger zu gewährleisten. Gleichzeitig ist so eine komplette Ausnutzung der gesamten Tupferoberfläche gesichert.

Tabelle 1: Unterschiedliche Entnahmekarten von Zellen im Rahmen der exfoliativen vaginalzytologie der Hündin.

Technik, Hilfsmittel	Autor
Drahtöse	<ul style="list-style-type: none"> - RIECK und KRATZHELLER (1955) - DREIER (1975/a) - MESTRE et al. (1990) - TAMMER et al. (1994) - TRASCH (2008)
Wattetupfer - trocken	<ul style="list-style-type: none"> - SIMMONS (1970) - CHRISTIE et al. (1972) - BELL et al. (1973) - DORE (1978) - BRUNNER (1983) - WOLLINGER (1984) - LINDE und KARLSSON (1984) - WRIGHT (1990) - TAMMER et al. (1994) - HOLST und PHEMISTER (2001) - WEHREND (2007)
- angefeuchtet mit 0,9%iger Kochsalzlösung	<ul style="list-style-type: none"> - SIMMONS (1970) (nur bei trockener Vaginalschleimhaut) - BARRETT (1976) - BRUNNER (1983) (nur bei trockener Vaginalschleimhaut) - GÜNZEL und KOIVISTO (1984) - GOODMAN (1992) - HOLST und PHEMISTER (2001) (nur bei trockener Vaginalschleimhaut) - HIEMSTRA et al. (2001) - JOHNSON (2006)

Literatur

Technik, Hilfsmittel	Autor
Aspiration von Zellmaterial	<ul style="list-style-type: none"> - SIMMONS (1970) (nur bei trockener Vaginalschleimhaut) - BRUNNER (1983) (nur bei trockener Vaginalschleimhaut) - ALLEN (1985) - GÜNZEL-APEL et al. (1999) - JOHNSON (2006)

Tabelle 2: Verschiedene Entnahmeorte von Zellen im Rahmen der exfoliativen Vaginalzytologie der Hündin.

Entnahmeort	Autor
Vestibulum	<ul style="list-style-type: none"> - SCHUTTE (1967/a) - BELL et al. (1973) - DREIER (1975/a und b) - GUYANT (1988) - PÉREZ et al. (2005)
Vagina	<ul style="list-style-type: none"> - SCHUTTE (1967/a) - SIMMONS (1970) - DREIER (1975/a und b) - BRUNNER (1983) - LINDE und KARLSSON (1984) - GÜNZEL und KOIVISTO (1984) - ALLEN (1985) - MESTRE et al. (1990) - TAMMER et al. (1994) - GÜNZEL-APEL et al. (1999) - HOLST und PHEMISTER (2001) - FÁY et al. (2003) - WEHREND (2007)

2.4.1.3 Vorkommende Zellen

Basalzellen

Die Basalzellen besitzen eine zylindrische Form und der randständige Kern zeigt eine deutliche Chromatinstruktur (DREIER, 1975/a). Die Größe dieser Zellart liegt bei 10 - 20 μm . Die Zellen sind rund bis ovoid und glattrandig (RIECK und KRATZHELLER, 1955; MANEKE, 2002). Basalzellen färben sich basophil an (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER, 1975/a).

Da die Zellen der Basalmembran direkt aufsitzen (WRIGHT und PARRY, 1989), vertraten GUYANT (1988) und JOHNSON (2006) die Meinung, dass diese Zellart nicht abgeschilfert wird und somit nicht in der exfoliativen Vaginalzytologie vorliegen kann. WRIGHT und PARRY (1989) und MANEKE (2002) konnten dagegen in verschiedenen Untersuchungen Basalzellen in den Vaginalzytologien detektieren.

Parabasalzellen

Die Parabasalzellen ähneln in ihrer Form und Kernbeschaffenheit den Basalzellen, sind aber mit 15 - 25 μm im Durchmesser etwas größer (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER, 1975/a). MANEKE (2002) erhielt bei ihren Untersuchungen der Parabasalzellen einen Mittelwert von 23,81 μm . Die Parabasalzellen gehören zum Stratum germinativum und werden von diesem abgeschilfert (FELDMAN und NELSON, 2004). Die Form der Parabasalzellen ist rund bis leicht oval mit großem blasigen Kern und wenig Zytoplasma (SCHUTTE, 1967/a; BELL et al., 1973; GUYANT, 1988; WRIGHT und PARRY, 1989; ALLEN, 1994; FELDMAN und NELSON, 2004; JOHNSON, 2006). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist hoch (WRIGHT und PARRY, 1989; JOHNSON, 2006). Der Kern zeigt eine intakte Kernstruktur und weist einen Durchmesser von 6 - 16 μm auf (BELL et al., 1973). Der Kern ist in der Zelle zentral positioniert (DREIER, 1975/a). Das Zytoplasma färbt sich deutlich basophil an (DREIER, 1975/a; FELDMAN und NELSON, 2004)

Intermediärzellen

Die Intermediärzellen entstammen dem Stratum spinosum superficiale.

Die durchschnittliche Größe liegt bei 20 - 30 µm, wobei die Intermediärzellen in Größe und Form stark variieren können (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER, 1975/a; MANEKE, 2002). Intermediärzellen werden als doppelt so groß wie Parabasalzellen beschrieben (JOHNSON, 2006). Während DREIER (1975/a) und FELDMAN und NELSON (2004) die Zellart als rund bis oval und glattrandig beschrieben, galten für BELL et al. (1973) nur Zellen mit polygonalem Rand als Intermediärzellen.

Der Kern ist blasig und ist mit einem Durchmesser von 7 - 11 µm kleiner als der der Parabasalzellen (SCHUTTE, 1967/a; MANEKE, 2002; FELDMAN und NELSON, 2004). Trotz seiner abnehmenden Größe ist der Zellkern in seinem Aufbau immer noch physiologisch intakt und liegt in den meisten Fällen in der Peripherie der Zelle (BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a). Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis ist zugunsten des Zytoplasmas verschoben.

In ihrer Anfärbbarkeit gleichen die Intermediärzellen den Basal- und Parabasalzellen, folglich färben sie sich basophil an (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER, 1975/a).

Einige Autoren unterteilen die Intermediärzellen in kleine und große Intermediärzellen. Die kleinen Intermediärzellen zeigen sich in der Zytologie mit runden Zellgrenzen, einem blasigen Kern und sind dabei nur wenig größer als Parabasalzellen. Die großen Intermediärzellen werden dagegen als wesentlich größer, polygonal mit eckigen und teilweise aufgefalteten Zellrändern beschreiben. Der Zellkern ist auch bei den oberflächlichen Intermediärzellen noch intakt (SCHUTTE, 1967/a; WRIGHT und PARRY, 1989; HOLST und PHEMISTER, 2001).

Superfizialzellen

Die Superfizialzellen gehören mit ihrem Durchmesser von 35 - 60 µm zu den größten Zellen des Vaginalepithels (DREIER, 1975/a; WRIGHT und PARRY, 1989; FELDMAN und NELSON, 2004). MANEKE (2002) erhielt im Rahmen ihrer Messungen der Superfizialzelllänge einen Mittelwert von 47,93 µm.

HOLST und PHEMISTER (2001) teilten die Superfizialzellen den verhornten Epithelzellen zu, im Gegensatz dazu die Basal-, Parabasal- und Intermediärzellen, die zu den unverhornten Epithelien gezählt wurden.

Superfizialzellen können mit einem Kern vorliegen, der ebenso intakt ist wie auch bei den Basal-, Parabasal- und die Intermediärzellen. Bei diesen Kernen liegt die Chromatinstruktur gut erkennbar vor (DREIER, 1975/a). Der Kern in den Superfizialzellen kann aber auch bereits durch Pyknose oder Karyorrhesis verändert sein und dadurch seine Größe stark reduzieren, was zu einer weiteren Verschiebung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses zugunsten des Zytoplasmas führt. Die durchschnittliche Länge eines pyknotischen Kernes liegt zwischen 5 - 6 µm (SCHUTTE, 1967/a; BELL et al., 1973). Für BELL et al. (1973) gehörten auch die Zellen zu den Superfizialzellen, die nur eine nukleäre Membran besitzen.

Der Kern war für JOHNSON (2006) bei den Superfizialzellen nur in pyknotischer Form vorhanden. Für BELL et al. (1973) war der Kern der Superfizialzellen dadurch gekennzeichnet, dass er keinen normalen Kernaufbau mehr vorweisen kann.

Superfizialzellen zeigen eine scharfe Umrandung und liegen immer in eckiger Form vor (WRIGHT und PARRY, 1989; ALLEN, 1984; FELDMAN und NELSON, 2004). JOHNSON (2006) beschrieb die Superfizialzellen als eckig, dünn und gefaltet.

Das Zytoplasma ist homogen, klar und durchsichtig (BELL et al., 1973). Die Anfärbbarkeit der Superfizialzellen variiert, je nach Keratinisierungsgrad, zwischen azidophil und basophil (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER, 1975/a).

Zusätzlich können die Superfizialzellen in untere und obere Superfizialzellen unterteilt werden (DREIER; 1975/a).

Schollen

Die Schollen entsprechen in ihrer Form und Größe den Superfizialzellen. Schollen werden als kernlose Superfizialzellen definiert, die vollständig verhornt oder keratinisiert sind (CHRISTIE et al., 1972; ALLEN, 1994; FELDMAN und NELSON, 2004; DREIER, 1975/a; HOLST und PHEMISTER, 2001; MANEKE, 2002).

Die Schollen färben sich azidophil an. Das Zytoplasma der Schollen ist klar und durchsichtig (BELL et al., 1973).

Metöstruszellen

Diese Zellart kann nur im Metöstrus in der Vaginalzytologie nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um große Intermediärzellen (GUYANT, 1988; FELDMAN und NELSON, 2004) beziehungsweise um modifizierte Parabasalzellen (SCHUTTE, 1967/a; WRIGHT und PARRY, 1989), in deren Zytoplasma neutrophile Granulozyten eingeschlossen sind.

Schaumzellen

Ebenso wie die Metöstruszellen sind die Schaumzellen eine typische Zellart für den Metöstrus. FELDMAN und NELSON (2004) beschrieben sie als Parabasal- oder Intermediärzellen mit deutlichen Vakuolen im Zytoplasma. RIECK und KRATZHELLER (1955) und GUYANT (1988) definierten sie als Intermediärzellen, die durch Vakuolen ein schaumartiges Aussehen erhalten.

Erythrozyten

Erythrozyten können im Vaginalzytologiebild des Proöstrus und vereinzelt auch im Östrus und Metöstrus auftreten. Die Blutzellen gelangen per Diapedesis in die Vagina. Verantwortlich dafür ist eine erhöhte Östrogenkonzentration im Blut der Hündin (HOLST und PHEMISTER, 2001). Die Erythrozyten allein sind kein sicherer Indikator für den Proöstrus, da bei einigen Hunden auch rote Blutkörperchen im Östrus oder zu Beginn des Metöstrus auftreten können (HOLST und PHEMISTER, 2001).

Bei einem Großteil der Hündinnen sind im Ausstrich im Proöstrus sehr viel mehr Erythrozyten vorhanden als im Östrus (DREIER, 1975/a; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; HOLST und PHEMISTER, 2001).

Neutrophile Granulozyten

Physiologisch treten neutrophile Granulozyten zu Beginn des Metöstrus auf (DREIER, 1975/a; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; HOLST und PHEMISTER, 2001). Auch andere Zellen des weißen Blutbildes liegen in seltenen Fällen vor. Im Proöstrus treten bei gesunden Hündinnen nur sehr selten neutrophile Granulozyten in der Vaginalzytologie auf. Im Östrus ist diese Zellart abwesend. Die Begründung liegt

darin, dass die Zellen zu groß sind, um per Diapedese das proliferierte Vaginalepithel in Richtung Vaginallumen zu durchdringen (HOLST und PHEMISTER, 2001).

Wenn neutrophile Granulozyten in Proöstrus, Östrus oder Anöstrus vorliegen, deutet dieses immer auf eine Entzündung im Urogenitaltrakt hin (HOLST und PHEMISTER, 2001).

2.4.2 Vaginoskopie

Für die vaginoskopische Untersuchung muss der Untersucher geübt sein und er benötigt ein geeignetes Instrumentarium (BAIER und RÜSSE, 1962; GOODMAN, 1992; FELDMAN und NELSON, 2004).

Beurteilt werden Quellungsstatus, Farbe und Feuchtigkeit der Scheidenschleimhaut, da diese in engem Zusammenhang mit den Östrogen- und Progesteronkonzentrationen im Blut stehen (WOLLINGER, 1984; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990).

In der Läufigkeit kommt es durch den steigenden Östrogengehalt zu einer Proliferation der Schleimhaut. Dadurch erhält die Schleimhaut ein makroskopisch blasses Aussehen und legt sich durch die Volumenausbreitung in Falten (JEFFCOATE und LINDSAY, 1989; FELDMAN und NELSON, 2004). Das Einführen des Spekulum zu einem Zeitpunkt in Ovulationsnähe wird erschwert durch die vorliegende Trockenheit der Schleimhaut, welche ebenfalls durch die Schleimhautproliferation zustande kommt (ARBEITER, 1975; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990). BAIER und RÜSSE (1962) hingegen behaupteten, dass im Östrus die Schleimhautoberfläche schleimig und schlüpfrig ist und dass somit das Spekulum problemlos eingeführt werden kann. Es können die Längs- und Querfalten der Schleimhaut im Östrus beobachtet werden, die ihre Gestalt mit steigender Östrogenkonzentration verändern und aufgrund der zunehmenden Epitheldicke so genannte Sekundärfalten bilden. Es entsteht die sBlockmalzformation%(ARBEITER, 1975; TAMMER et al.; 1994; EHLERS, 2000). Von einer maximalen Schleimhautproliferation wird zwei bis drei Tage nach dem LH-Peak gesprochen, folglich im postovulatorischen Östrus (GOODMAN, 1992). Nimmt die Östrogenkonzentration ab und die Progesteronkonzentration im Blut zu, tritt das so genannte sVerwelken%der Schleimhaut ein (ARBEITER, 1975; DREIER, 1975/b).

Durch das Zurückgehen der Ödematisierung kommt es zu einer maximalen Verwinklung der Schleimhaut und die Falten erscheinen scharfrandiger mit spritz erscheinenden Kanten (LINDSAY und CONCANNON, 1986). Zum Ende des Östrus wirkt die Schleimhaut auf den Untersucher sehr viel flacher als gegen Östrusmitte (LINDSAY und CONCANNON, 1986).

Auch für die Diagnostik von pathologischen Veränderungen in Form von Tumoren oder anderen physiologischen und pathologischen Veränderungen am Schleimhautepithel der Vagina kann die Vaginoskopie genutzt werden (BAIER und RÜSSE, 1962; SCHANEN und FEHR, 1998).

2.4.3 Endoskopie

Eine zusätzliche Methode für die visuelle Betrachtung der Vaginalschleimhaut ist die Vaginoskopie mit Hilfe eines Endoskops (LINDSAY, 1983; SODERBERG, 1986/a; GOODMAN, 1992; WATTS et al., 1997; BECCAGLIA et al., 2007). Sie erlaubt eine gute Zyklusdiagnostik und es lassen sich sowohl Vaginopathien als auch kongenitale Anomalien darstellen (LULICH, 2006). Das Vestibulum und die Vagina können auf Fremdmaterial, Schleimhautläsionen, Hyperämie, Blut, Sekret oder anatomische Anomalien, wie zum Beispiel ektopische Ureter, untersucht werden (LULICH, 2006). In Bezug auf die Deckzeitpunktbestimmung führte LINDSAY (1983) eine Untersuchungsreihe durch, die ergab, dass die endoskopischen Ergebnisse mit denen der Vaginalzytologie korrelierten. WATTS et al. (1997) führten mehrere Untersuchungen an Hündinnen sowohl in verschiedenen Zyklusstadien als auch post partum durch. Sie legten den Schwerpunkt ihrer Arbeit eher auf die Betrachtung des Uterus und der Uterusschleimhaut, betonten aber, dass auch pathologische Veränderungen im Vaginaltrakt mit dieser Methode sehr gut erkannt werden können. Die Untersuchung wird mit einem starren Endoskop durchgeführt, welches in die Vagina eingeführt wird und eine Betrachtung von Vestibulum, Vagina, Zervix und eventuell Uterus ermöglicht. LULICH (2006) führte diese Untersuchung sowohl mit einem starren als auch mit einem flexiblen Endoskop durch. LULICH (2006) riet zu einer Durchführung der Endoskopie unter Vollnarkose, wobei die Hündin in Rücken- oder Seitenlage positioniert werden sollte. Andere Autoren hingegen führten diese Untersuchung auch am wachen, stehenden Hund durch (WATTS et al., 1997).

Komplikationen bei der Durchführung treten nur dann auf, wenn Verklebungen oder großvolumige Zysten im Vaginalkanal vorliegen (WATTS et al., 1997). Besonders im Anöstrus ist größte Vorsicht bei der endoskopischen Untersuchung geboten, da die Schleimhaut in dieser Zyklusphase sehr dünn ist und es sonst zu Perforationen im Vaginalkanal kommen kann. Im Proöstrus und im Östrus kann eine Ödematisierung der Vaginalschleimhaut die Sicht auf zu untersuchende Strukturen behindern oder sogar vollständig einschränken (WATTS et al., 1997).

Nach einer endoskopischen Untersuchung sollte für drei bis fünf Tage ein Breitband-Antibiotikum zur Vermeidung einer iatrogen bedingten Infektion verabreicht werden (LULICH, 2006). Komplikationen im Anschluss der Untersuchung können eine Vaginitis oder Endometritis sein (WATTS und WRIGHT, 1995).

2.5 Progesteronkonzentration während des Zyklus bei der Hündin

Progesteron wird bei der Hündin bereits in geringen Mengen vor der Ovulation in den Granulosazellen der Follikel produziert. Nach erfolgter Ovulation werden große Mengen des Steroidhormones in den Gelbkörpern gebildet und die Progesteronkonzentration im Plasma steigt deutlich an (CONCANNON et al., 1977; GOODMAN, 1992). Aus diesem Grund kann die Progesteronkonzentration im Rahmen der Deckzeitpunktbestimmung als Indikator für eine bevorstehende oder erfolgte Ovulation genutzt werden (GÜNZEL et al., 1986; JEFFCOATE und LINDSAY, 1989; WRIGHT, 1990; GOODMAN, 1992; JOHNSON, 2008). Progesteron ist für die Trächtigkeit der Hündin essentiell und die Konzentration ist im Metöstrus bei graviden und nichtgraviden Tieren nicht signifikant different (CONCANNON et al., 1990).

Die Angaben und Interpretation der Progesteronkonzentrationen im Plasma der Hündin sind zahlreich und nicht immer deckungsgleich. Progesteronkonzentrationen zwischen 1 und 2 ng / ml sind kennzeichnend für den Proöstrus (MESTRE et al., 1990; JOHNSTON et al., 2001; GROPPETTI et al., 2010). Allgemein ist eine Progesteronkonzentration zwischen 2 ng / ml und 15 ng / ml typisch für den Östrus (JOHNSTON et al., 2001). Auch SEKI et al. (2010) orientierten sich an 2 ng / ml und bezeichnen diese Grenze als initialen Anstieg von Progesteron im Plasma. Eine

Progesteronkonzentration über 8 ng / ml nannten TAMMER et al. (1994) als optimalen Zeitpunkt für eine Belegung der Hündin und es kann von einer erfolgten Ovulation ausgegangen werden (JEFFCOATE und LINDSAY, 1989). GÜNZEL et al. (1986) und JOHNSON (2008) definierten eine Progesteronkonzentration von 5 ng / ml als Schwellenwert für eine erfolgte Ovulation. HASE et al. (2000) haben in einer Studie herausgefunden, dass die Progesteronkonzentration bei der Hündin am Tag der Ovulation bei durchschnittlich 2,34 ng / ml liegt. GOODMAN (1992) beschrieb eine Progesteronkonzentration von 2,5 . 5 ng / ml bei erfolgter Ovulation. Nach WRIGHT (1990) findet die Ovulation bei einer Progesteronkonzentration zwischen 4 und 10 ng / ml statt. GÜNZEL-APEL et al. (2006) fanden heraus, dass am Tag der Ovulation die Progesteronkonzentration im Mittel bei 9,42 ng / ml liegt. Die starken Abweichungen unterschiedlicher Autoren schoben HASE et al. (2000) auf die unterschiedlichen Messmethoden.

Nach erfolgter Ovulation steigen die Progesteronkonzentrationen stark an und Serumkonzentrationen von über 15 ng / ml sprechen für den Zyklusabschnitt des frühen Metöstrus (GOODMAN, 1992; JOHNSTON et al., 2001). Unter endokrinen Gesichtspunkten spricht man solange von Metöstrus, bis die Progesteronkonzentration auf das Basalniveau von unter 1 ng / ml gesunken ist (JOHNSTON et al., 2001; ÖZYURTLU et al., 2006). Es schließt sich die hormonell inaktive Zyklusphase, der Anöstrus, an, in der die Progesteronplasmakonzentration unter 1 ng / ml liegt (JOHNSTON et al., 2001; ÖZYURTLU et al., 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die Untersuchungen standen 332 Hündinnen aus dem Patientengut der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung. Die Proben wurden in der Zeit von März bis Dezember 2008 entnommen (Tabelle 3). Es wurden bei allen Hündinnen nur Daten erhoben, Untersuchungen durchgeführt und Proben entnommen, die im Rahmen der tierärztlichen Behandlung der Tiere notwendig waren.

Bei allen Tieren wurde vor der allgemeinen und der speziellen gynäkologischen Untersuchung ein standardisierter Vorbericht aufgenommen, der sowohl das Alter als auch die Rasse berücksichtigte.

Die vorgestellten Hündinnen wurden anhand der folgenden Parameter in die entsprechende Zyklusphase unterteilt (Tabelle 3):

- Verhalten der Hündin, Attraktivität für Rüden
- Befunde der Vaginoskopie
- Befunde der Vaginalzytologie
- Progesteronkonzentration im Plasma

Tabelle 3: Verteilung aller untersuchten Hündinnen auf die unterschiedlichen Zyklusphasen.

Zyklusphase	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus	Gesamt
Anzahl der Hündinnen	81	139	63	49	332

Das Lebensalter der Hündinnen lag zwischen 1 und 13 Jahren. Der arithmetische Mittelwert betrug 4,52 Jahre \pm 2,58.

Material und Methoden

Das Gesamtkollektiv der Patientinnen setzte sich aus unterschiedlichen Rassen zusammen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Rasseverteilung der Hündinnen

Rasse	Anzahl (n)	Prozentzahl bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (%)
Golden Retriever	38	11,5
Deutscher Schäferhund	35	10,5
Mischling	24	7,2
Labrador Retriever	20	6,0
Beagle	19	5,7
Rhodesian Ridgeback	19	5,7
Bobtail	12	3,6
Irish Setter	11	3,3
Border Collie	9	2,7
Boxer	8	2,4
Sheltie	8	2,4
Jack Russel Terrier	7	2,1
Elo	7	2,1
Collie	6	1,9
Französische Bulldogge	6	1,9
Berner Sennenhund	5	1,5
Rottweiler	5	1,5
Andere	93	28,0
Gesamt	332	100

3.2 Methoden

Es war Ziel der Untersuchung, folgende Fragen zu beantworten:

- Gibt es Unterschiede in der Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie bei Entnahme der Proben an den Lokalisationen Vagina und Vestibulum (Experiment I)?
- Gibt es Unterschiede in der Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Entnahme mit trockenen Tupfern und angefeuchteten Tupfern (Experiment II)?
- Gibt es Unterschiede in der Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie bei unterschiedlicher Behandlung der Objektträger nach Ausrollen des Tupfers mit Zytologiespray oder einer Lufttrocknung ohne Fixierung (Experiment III)?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Größe und Darstellbarkeit der Zellen nach unterschiedlicher Behandlung der Ausstriche mit Zytologiespray oder nach Lufttrocknung (Experiment IV)?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der Auswertbarkeit und Diagnoserichtigkeit bei exfoliativen Vaginalzytologien, die mit unterschiedlichen Methoden entnommen und behandelt und von verschiedenen Personen untersucht wurden (Experiment V)?

Die Beantwortung der Fragen soll dazu beitragen, die Entnahmebedingungen, die Behandlung und die Aufarbeitung der caninen exfoliativen Vaginalzytologie zu verbessern und zu standardisieren.

3.2.1 Vorunteruntersuchung

Bei Erstvorstellung in der Klinik wurde bei jeder Hündin eine ausführliche Anamnese erhoben, in der allgemeine sowie reproduktionsmedizinische Angaben erfasst wurden (Tabelle 5). Die Angaben beruhten auf Informationen von Besitzern und Haustierärzten.

Tabelle 5: Anamnestisch erhobene Daten

Besitzerangaben
Name der Hündin
Signalement, Geburtsdatum
Gewicht
Allgemeine Erkrankungen
Frühere gynäkologische Erkrankungen
Verhalten / Futter- und Wasseraufnahme
Läufigkeiten
- Anzahl der bisherigen Läufigkeiten
- Datum der letzten Läufigkeit, Verlauf
Lactatio sine graviditate (regelmässig / unregelmässig)
Läufigkeitsunterdrückung
Nidationsverhütung
Bisherige Geburten, Verlauf, Anzahl der Welpen

Nach Erhebung der Anamnese wurde die Hündin einem standardisierten Untersuchungsverfahren unterzogen. Der klinischen Allgemeinuntersuchung folgte direkt im Anschluss die gynäkologische Untersuchung, in deren Rahmen die entsprechenden Tupferprobenentnahmen erfolgten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Untersuchungsprotokoll zur Dokumentation der Ergebnisse aus der allgemeinen und gynäkologischen Untersuchung.

<p><u>Allgemeine Untersuchung</u></p> <p>Allgemeinbefinden</p> <p>Vitalparameter (Puls, Atmung, Innere Körpertemperatur)</p> <p>Auskultation Herz</p> <p>Auskultation Lunge</p> <p>Lymphknoten</p> <p><u>Spezielle gynäkologische Untersuchung</u></p> <p>Adspektion</p> <p>- Abdomen (normal, umfangsvermehrt, stark umfangsvermehrt)</p> <p>- Labien (normal, ödematisiert, Auffälligkeiten, Sekretaustritt aus der Rima vulvae)</p> <p>Palpation Uterus</p> <p>Vaginoskopie (Schleimhaut / Zervix)</p> <p>Exfoliative Vagninalzytologie</p>
--

Bei Hündinnen, die zur Deckzeitpunktbestimmung vorgestellt wurden, folgte im Anschluss an die Untersuchung in vielen Fällen eine Bestimmung der Progesteronkonzentration im Plasma. Diese Untersuchung unterblieb jedoch, wenn die Besitzer keine Progesteronbestimmung wünschten.

3.2.2 Exfoliative Vaginalzytologie

Die exfoliativen Vaginalzytologien aus der Vagina wurden nach Einführen eines Röhrenspekulums mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers (Heinz Herenz, Hamburg) am stehenden Hund entnommen. Bei einer Versuchsgruppe (Experiment I) erfolgte zusätzlich eine Tupferprobenentnahme aus dem Vestibulum. Vor Entnahme wurde die Vulva mit einem schleimhautschonenden Desinfektionsmittel (Spitacid[®], Ecolab, Düsseldorf) gereinigt.

Unmittelbar nach Entnahme erfolgte ein Ausrollen der Tupfer auf entfetteten Objektträgern (76 x 26 mm, iDL, Nidderau) in drei Bahnen. Zum Anfärben der Proben wurde eine Eosin-Thiazin-Schnellfärbung (Hemacolor[®], Merck, Darmstadt) durchgeführt (Tabelle 7). Das Färbeset besteht aus drei verschiedenen Lösungen. Das Prinzip der Färbung basiert auf einer Wechselwirkung der Desoxyribonukleinsäure-Komplexe mit den Farbreagenzen, welche zu einer dunkelvioletten Färbung des Zellkernes führen. Das Zytoplasma erscheint rosa bis hellviolett. Die Objektträger wurden dazu mehrmals in die Behältnisse mit den entsprechenden Lösungen eingetaucht.

Tabelle 7: Durchführung der Hemacolor[®]-Färbung zur Färbung der exfoliativen Zytologien aus Vagina und Vestibulum.

Bezeichnung der Lösung	Funktion der Lösung	Anzahl der Tauchvorgänge
Lösung 1	Fixierlösung	5 x 1 Sekunde
Lösung 2	Farbreagenz (Eosin), rot	10 x 1 Sekunde
Lösung 3	Farbreagenz (Azur), blau	10 x 1 Sekunde

Die gefärbten Ausstriche wurden anschließend mit Eindeckmittel (Entellan[®], Merck, Darmstadt) und Deckgläschen (24 x 50 mm, iDL, Nidderau) konserviert.

3.2.3 Beurteilung des Zyklusstandes

Die Zuordnung der Hündin zu einem Zyklusstadium erfolgte anhand folgender Kriterien:

- Verhalten der Hündin, Attraktivität für Rüden

Proöstrus: Die Rüden zeigen vermehrtes Interesse an der Hündin. Diese reagiert aber meistens in den ersten Tagen des Proöstrus mit starker Ablehnung.

Östrus: Im Östrus ist die Hündin deckbereit und zeigt bei bestimmten Reizen Lordose und Schwanzstellreflex.

Metöstrus: Eine sexuelle Akzeptanz seitens der Hündin ist zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden.

Anöstrus: Die Hündinnen sind uninteressant für Rüden und dulden im Normalfall keine Deckversuche.

- Befunde von Adspektion und Vaginoskopie

Proöstrus: Im Proöstrus ist ein Auftreten von blutigem Vaginalfluor aus der Rima vulvae zu beobachten und eine Ödematisierung der Vulva tritt auf. Durch den steigenden Östrogeneinfluss nimmt die Ödematisierung der Vaginalschleimhaut zu und es entstehen deutliche Längs- und Querfalten der Schleimhaut.

Östrus: Die Ödematisierung der Vulva ist hochgradig ausgeprägt. Der Vaginalausfluss bekommt ein fleischwasserfarbendes Aussehen. Die Schleimhäute im Vaginalkanal erscheinen trocken und haben eine blasse Farbe. Es sind zusätzlich Sekundärfalten in der Schleimhaut sichtbar.

Metöstrus: Die Vulva ist nur in den ersten Tagen noch geringgradig ödematisiert. Vaginaler Ausfluss wird bei einigen Hündinnen noch in den ersten Tagen des Metöstrus beobachtet. Im fortgeschrittenen Metöstrus ist kein vaginaler Ausfluss mehr vorhanden.

Anöstrus: Die Vulva ist nicht ödematisiert. Die Schleimhaut der Vagina ist feucht, rosarot und ohne deutliche Längs- und Querfalten. Ausfluss ist nicht erkennbar.

- Befunde der Vaginalzytologie

Proöstrus: Im Verlauf des Proöstrus nimmt die Anzahl der zytoplasmareichen Zellen im Vaginalabstrich zu. Bei einem Großteil der Hündinnen sind in der Zeit des Proöstrus Erythrozyten im Ausstrich zu finden.

Östrus: Im Zellbild dominieren zytoplasmareiche Zellen, welche meist kernlos vorliegen. Sind mehr als 90% der vorhandenen Zellen im Abstrich Superfizialzellen oder Schollen, dann spricht man von einem östrischen Zellbild. Zum Zeitpunkt der Ovulation liegen die Zellen in Gruppen (Nesterbildung) zusammen.

Metöstrus: In den ersten Tagen treten vermehrt neutrophile Granulozyten auf. Das Zellbild im Vaginalabstrich dominieren Intermediärzellen und Parabasalzellen. Nur in den ersten Tagen im Metöstrus liegt ein Zellmischbild vor und es sind noch vereinzelt Superfizialzellen vorhanden.

Anöstrus: Im Ausstrich kommen nur Parabasalzellen und Intermediärzellen vor. Insgesamt ist in dieser Zyklusphase nur wenig Zellmaterial im Ausstrich vorzufinden.

- Progesteronkonzentration im Plasma

Proöstrus: 1 . 2 ng / ml

Östrus: 2 . 15 ng / ml

Metöstrus: > 15 ng / ml

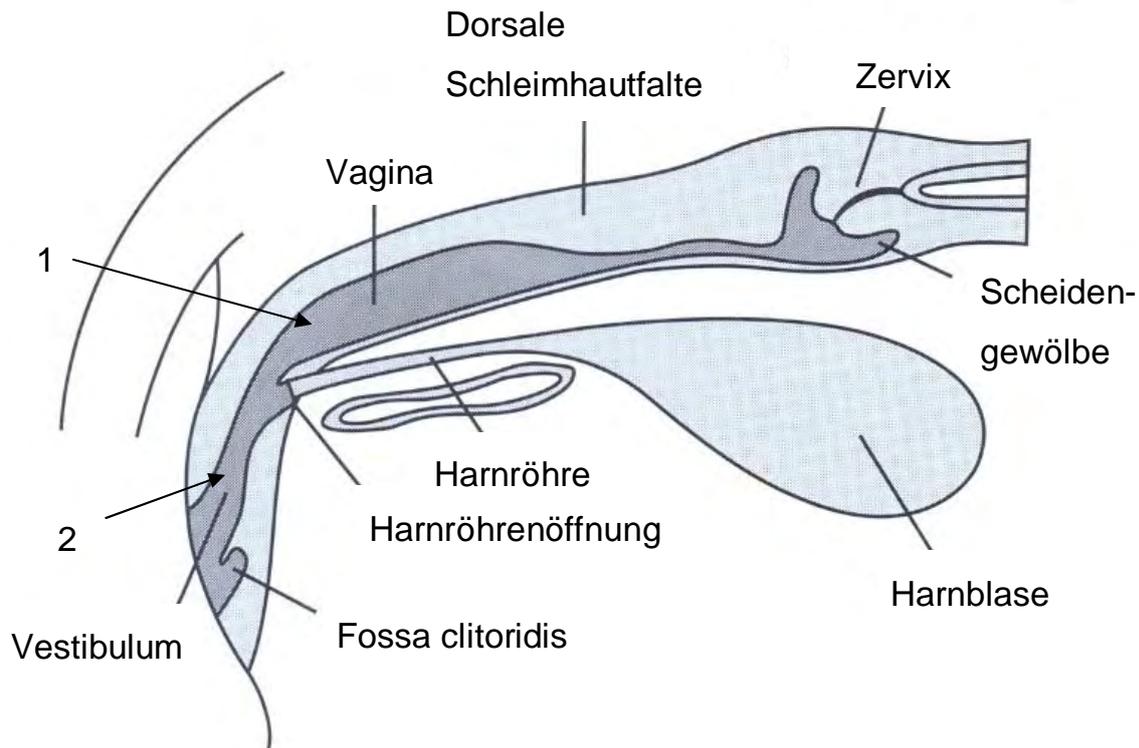
Anöstrus: < 1 ng / ml

3.2.4 Probenentnahme

Alle Abstriche wurden am stehenden Hund entnommen. Nach feuchter Reinigung der Rima vulvae wurde ein der Körpergröße des Hundes entsprechend langes Röhrenspekulum (WDT, Garbsen) in die dorsale Kommissur der Vulva eingeführt. Das Spekulum wurde zuerst fast senkrecht in dorsale Richtung vorgeschoben und dann weiter nach kranial eingebracht. Ohne Kontakt zu den Labien wurde ein trockener, steriler Wattetupfer durch das Röhrenspekulum in das Vaginallumen geführt, mit dem unter drehenden Bewegungen am Vaginaldach die Probenentnahme erfolgte.

Experiment I

Den 120 Tieren aus der Gruppe I wurde im Anschluss an die Vaginaltupferprobe zusätzlich eine Tupferprobe aus dem Vestibulum entnommen (Abbildung 1). Die Probenentnahme erfolgte mit einem trockenen, sterilen Tupfer. Dieser wurde in die Vulva in dorsale Richtung ohne Hilfe eines Spekulum eingeführt. Die Labien wurden lediglich vor Einführen des Tupfers mit Daumen, Zeigefinger und Mittelfinger gespreizt. Der Tupfer wurde in das Vestibulum eingeführt und unter drehenden Bewegungen erfolgte die Probengewinnung.



1: Entnahmestelle für Tupfer aus Vagina

2: Entnahmestelle für Tupfer aus Vestibulum

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Probenentnahmestellen im Genitaltrakt der Hündin (modifiziert nach FELDMAN und NELSON, 2004)

Zusätzlich erfolgte bei 47 Hündinnen dieser Gruppe im Rahmen der Untersuchung eine Plasmagewinnung zur Bestimmung der Progesteronkonzentration für eine Zykluseinteilung unter endokrinen Gesichtspunkten.

Experiment II

In Experiment II erfolgte bei 106 Hündinnen dieser Gruppe eine zusätzliche Tupferprobenentnahme aus der Vagina. Die erste Probe wurde, wie oben beschrieben, mit einem trockenen Tupfer entnommen. Im Anschluss daran wurde der zweite Tupfer direkt vor Einführung in die Vagina mit isotonischer

Kochsalzlösung beträufelt. Die Vorgehensweise der Entnahme war identisch mit der oben beschriebenen Methode für die Entnahme einer Vaginalzytologie.

Experiment III

Bei 106 Tieren dieser Gruppe wurden jeweils von einer Hündin zwei Ausstriche (Entnahme wie oben beschrieben) angefertigt. Beide Zytologien wurden mit einem trockenen Tupfer am Vaginaldach gewonnen. Ein Ausstrich wurde für vier Tage an der Luft getrocknet, der andere Ausstrich musste unmittelbar nach der Anfertigung mit Zytologiespray (Merckofix[®], Merck, Darmstadt) fixiert werden.

Experiment IV

Für dieses Experiment wurden aus den exfoliativen Vaginalzytologien der Experimentgruppe III (Zytologiespray . Lufttrocknung) willkürlich 30 Hündinnen ausgewählt, deren gepaarte Ausstriche untersucht wurden. In jedem Ausstrich wurden 30 Zellen vermessen, um anschließend die Messdaten der zwei Gruppen (Zytologiespray . Lufttrocknung) miteinander vergleichen zu können.

Experiment V

Für das Experiment V wurden bereits entnommene Vaginalzytologien aus den Experimenten I bis III verwendet.

3.2.5 Probenaufbereitung

Nach Entnahme der Tupferproben erfolgte direkt im Anschluss ein Ausrollen der Tupfer in drei Bahnen auf entfetteten Objektträgern. Die Ausstriche wurden luftgetrocknet und direkt anschließend einem Schnellfärbeverfahren (Hemacolor[®], Merck, Darmstadt) unterzogen und mit einem Deckglas und Eindeckmittel (Entellan[®], Merck, Darmstadt) konserviert.

Tupferproben von Hündinnen der Gruppe II mussten mindestens fünf Minuten lufttrocknen, damit auch die Zytologien der angefeuchteten Tupfer einer ausreichenden Trocknungszeit ausgesetzt waren.

Bei Proben, die von Tieren der Gruppe III stammten, wurde eines der angefertigten Präparate unmittelbar nach der Herstellung aus ca. 20 cm Entfernung gleichmäßig

mit Zytologiespray besprüht. Das andere Präparat der Hündin blieb unbehandelt. Nach vier Tagen wurden sowohl die unbehandelten als auch die mit Zytologiespray behandelten Präparate mit der Schnellfärbung Hemacolor® fixiert und anschließend gefärbt.

3.2.6 Endokrinologische Untersuchung

Bei einem Teil der Hündinnen aus Experiment I wurde im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung eine Progesteronkonzentrationsbestimmung im Blut eingeleitet. Für die Untersuchung wurde eine venöse Blutprobe aus der Vena cephalica antebrachii oder Vena saphena lateralis entnommen, die direkt im Anschluss an die gynäkologische Untersuchung im Endokrinologischen Labor der Klinik analysiert wurde. Für die Analyse stand ein Immunoanalyzer (smi Vidas[®] bioMérieux, Nürtingen) zur Verfügung. Das Gerät arbeitet nach dem ELFA-Verfahren (Enzym Linked Fluorescent Assay). Hierbei wird das ELISA-Prinzip mit einer abschließenden Fluoreszenzmessung kombiniert.

3.2.7 Lichtmikroskopische Auswertung der Vaginalzytologien

Vor der Probenauswertung wurde jeder Ausstrich mit einer 100fachen Vergrößerung durchmustert und auf Auswertbarkeit untersucht. Ein Ausstrich galt als nicht auswertbar, wenn er folgende Eigenschaften besaß:

- Nicht ausreichend intaktes Zellmaterial
- Ausgeprägte Färbeartefakte
Färbeartefakte sind Präzipitate der Färbelösung. Sie entstehen häufig durch unvollständiges Abspülen der Probe nach der Färbung oder durch eine unsachgemäße Lagerung der Färbelösungen.
- Ausgeprägte entnahmebedingten Artefakte
Zu den entnahmebedingten Artefakten gehören zum Beispiel große Mengen von Fäden von Wattetupfern. Auch eine zu starke Zelldeformation, bedingt durch das falsche Ausrollen der Probe auf dem Objektträger, zählt zu entnahmebedingten Artefakten und kann eine Probe nicht auswertbar machen.

3.2.6.1 Zellzählungen

Bei den Experimenten I, II und III wurde bei jedem Ausstrich mit 400facher Vergrößerung eine Zählung von insgesamt 200 Zellen durchgeführt. Die Zählung verteilte sich auf mindestens vier verschiedene Gesichtsfelder, welche mäanderförmig im Ausstrich ausgewählt wurden. Die Beurteilung der Ausstriche wurde in Anlehnung an die Zellklassifizierungen und Auswertschemata von EHLERS (2000) durchgeführt.

Die unterschiedlichen Zellarten wurden anhand der folgenden Merkmale klassifiziert:

Basalzellen (Abb. 2)

- 10 . 20 μm
- rund bis ovoid
- glatter Rand, schmaler Zytoplasmasaum
- randständiger, kugelförmiger Kern

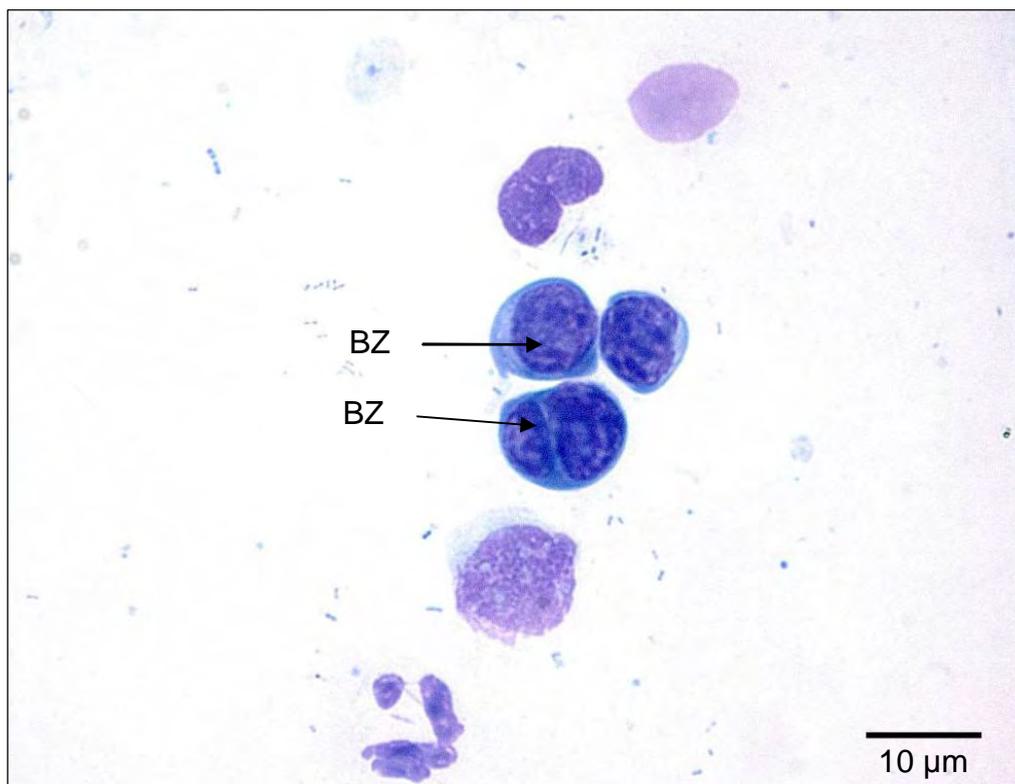


Abbildung 2: Basalzellen (Balken = 10 μm), BZ = Basalzelle

Parabasalzellen (Abb. 6)

- 15 . 25 μm
- rund bis ovoid
- deutlicher, mittelständiger Kern
- glatter Rand
- deutlicher Zytoplasmasaum

Intermediärzellen (Abb. 3, Abb. 7)

- 20 . 35 μm
- rund bis oval
- glattrandig
- deutlicher Kern
- Zytoplasma-Kern-Verhältnis zugunsten des Zytoplasmas verschoben
- oft mit typischer sSpiegelei-Form%

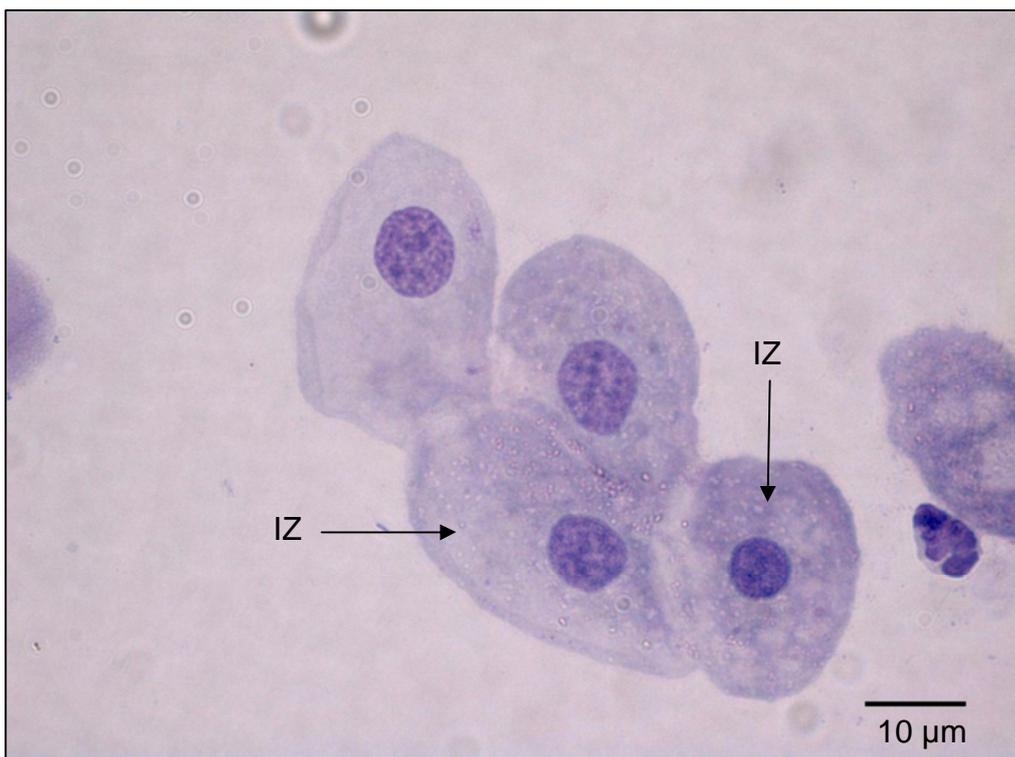


Abbildung 3: Intermediärzellen, teilweise mit typischer Spiegelei-Form
(Balken = 10 μm), IZ = Intermediärzelle

Superfizialzellen (Abb. 4, Abb. 5, Abb. 7)

- 42 . 58 μm
- polygonale, eckige Form, oft eingefältete Zellränder
- deutlich mehr Zytoplasma
- klares Zytoplasma
- Kern noch sichtbar, aber meistens in pyknotischer Form

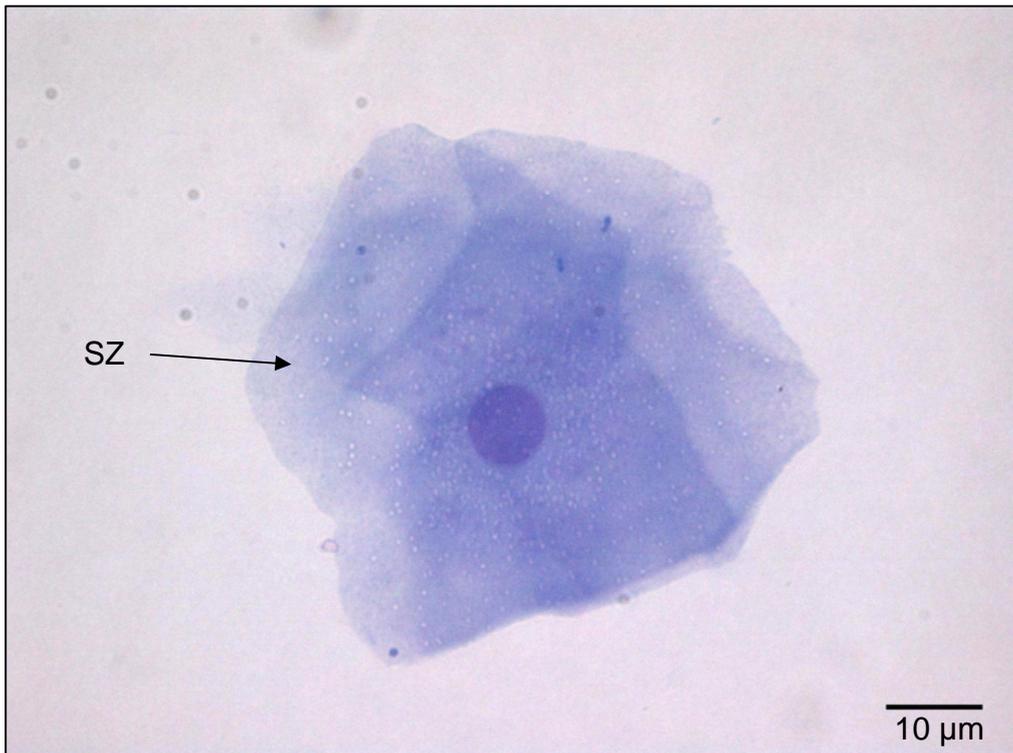


Abbildung 4: Superfizialzelle mit pyknotischem Kern (Balken = 10 μm),
SZ = Superfizialzelle

Schollen (Abb. 5)

- wie Superficialzellen, jedoch ohne Kern

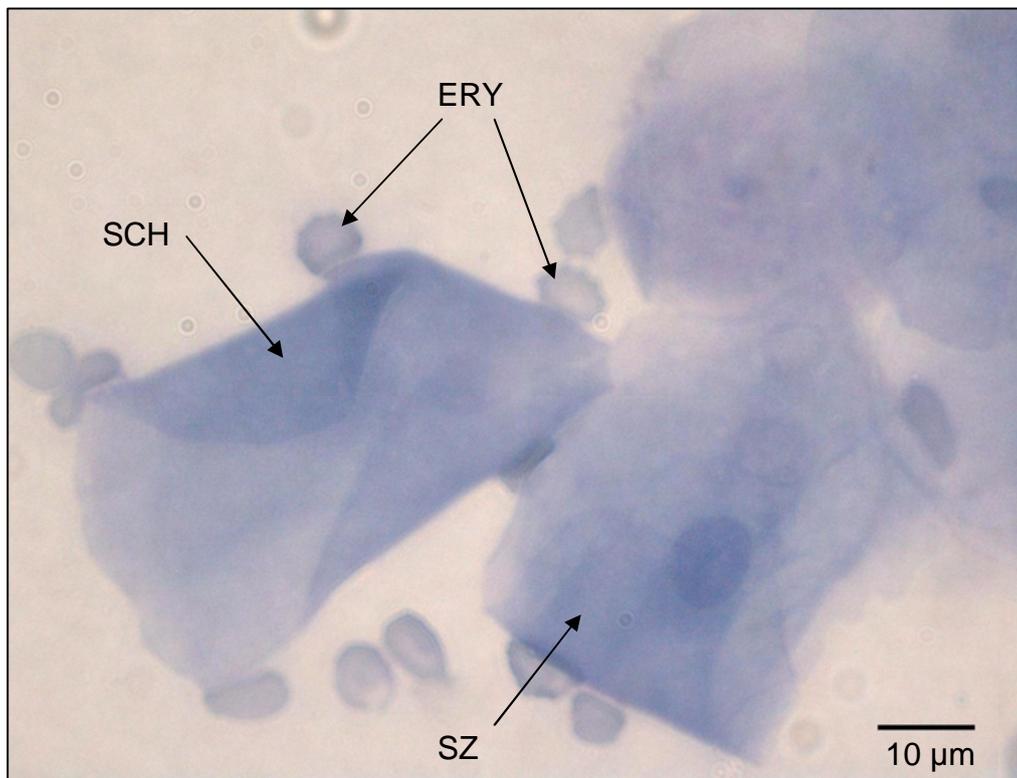


Abbildung 5: Scholle und Superficialzelle, im Hintergrund Erythrozyten
(Balken = 10 µm), SZ = Superficialzelle, SCH = Scholle,
ERY = Erythrozyt

Metöstruszellen (Abb. 6)

- Parabasalzellen oder Intermediärzellen mit eingeschlossenen neutrophilen Granulozyten im Zytoplasma

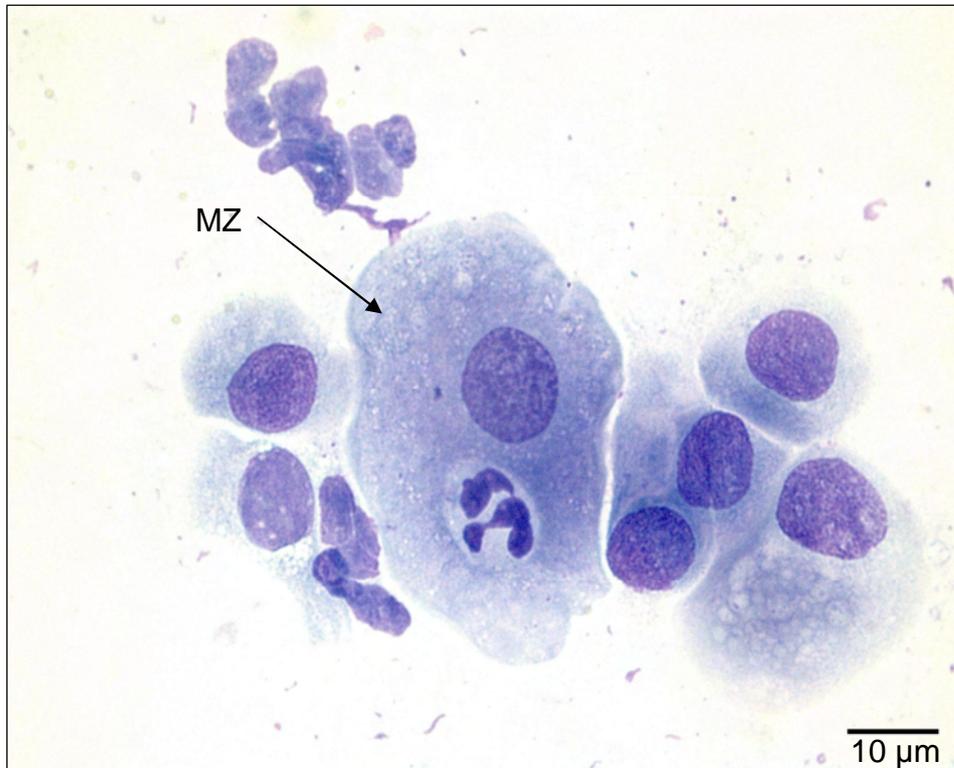


Abbildung 6: Metöstruszelle, umgeben von Parabasal- und Intermediärzellen (Balken = 10 µm), MZ = Metöstruszelle

Keratinisierte Zellen (Abb. 7)

- dunkellila angefärbt
- kein Zellkern erkennbar
- nicht plan
- scharfrandig
- längliche Form



Abbildung 7: Keratinisierte Zelle, umgeben von Intermediär- und Superficialzelle (Balken = 10 μm), IZ = Intermediärzelle, SZ= Superficialzelle, KZ = Keratinisierte Zelle

Eine Unterteilung in große und kleine Intermediärzellen wurde nicht durchgeführt, da eine Abmessung jeder einzelnen Zelle in praxi nicht praktikabel ist und eine Unterteilung der Zellen ohne Ausmessung zu subjektiv erscheint.

3.2.6.2 Bewertungen anderer Ausstrichparameter

Neben den Epithelzellen des Vestibulovaginaltraktes wurden weitere Ausstrichparameter in den exfoliativen vaginalen Zytologien beurteilt.

Folgende Parameter wurden zusätzlich zu den Zellarten erfasst:

- Menge der Erythrozyten
- Menge der neutrophilen Granulozyten
- Verteilung der Zellen
- Zellmenge pro Gesichtsfeld
- Vorkommen von Bakterien
- Vorkommen von Sekret und Detritus
- Vorkommen von Wattefäden
- Auftreten einer Zytolyse, Menge der freiliegenden Zellkerne
- Aufgerollte Zellränder

Die Menge von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld (400fache Vergrößerung, 4 Gesichtsfelder pro Ausstrich) wurde in Anlehnung von EHLERS (2000) geschätzt und mit $\leq 10\%$ bis 50% und $\geq 50\%$ bei den Erythrozyten angegeben. Bei den neutrophilen Granulozyten erfolgten die Angaben der vorhandenen Menge mit $\leq 5\%$ bis 25% und $> 25\%$.

Für die Verteilung und Lagerung der Zellen wurde der Ausstrich mit einer 100fachen Vergrößerung an mindestens vier verschiedenen Stellen betrachtet. Die Zellen konnten dabei entweder einzeln, in einem Zellverband oder in beginnender oder ausgeprägter Zellnesterform zusammen liegen.

Bei den Bakterien wurde nur deren An- oder Abwesenheit dokumentiert. Die Anwesenheit der Bakterien wurde in \leq wenig, \geq viel und \geq sehr viel eingestuft. Identische Einteilungsmuster wurden angewandt für das Vorkommen von Wattefäden, Sekret und Detritus, sowie für freiliegende Zellkerne ohne Zytoplasmasaum und für Zellen mit aufgerollten Zellrändern.

Detritus sind Zelltrümmer mit Resten von Zellkernen und Zytoplasma. Als Sekret werden Schlieren ohne korpuskuläre Bestandteile betrachtet und freiliegende Zellkerne treten nach erfolgter Zytolyse auf.

3.2.6.3 Größenmessungen der Zellen

Die lichtmikroskopische Untersuchung und Vermessung der Zellen erfolgte mittels Lichtmikroskop (Mikroskop DMR, Leica Microsystems, Wetzlar), welches mit einer Digitalkamera verbunden war. Die Bilder wurden zeitgleich auf einen Computer übertragen, der die Bildausschnitte mit Hilfe eines Bildanalyseprogrammes (Leica Image Manager, Leica, Wetzlar) speichern und dokumentieren konnte.

Vermessen wurden nur Zytologiepräparate aus dem Experiment III (Auswertung der Zytologien nach Behandlung der Ausstriche mit Zytologiespray im Vergleich zur Lufttrocknung). Es fand eine willkürliche Auswahl von 30 Hündinnen aus allen vier Zyklusphasen statt. Insgesamt mussten pro Ausstrich 30 Zellen ausgezählt und vermessen werden, die mäanderförmig im Ausstrich aufgesucht wurden. Bei beiden Ausstrichen derselben Hündin wurden immer identische Zellmengen einer bestimmten Zellart ausgezählt, um einen direkten Vergleich der Größen errechnen zu können. Das Zählen der Zellen und Berechnen der Zellflächen erfolgte mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes.

Eine Größenmessung erfolgte bei folgenden Zellparametern:

- Kerndurchmesser (daraus wurde im Anschluss die Kernfläche berechnet)
- Zelllänge und . breite
- Zellgesamtfläche

Die Kernfläche wurde anhand des Kerndurchmessers berechnet. Da der Kern eine runde Form hat, konnte mit Hilfe der Formel für die Berechnung einer Kreisfläche die Kernfläche berechnet werden.

Die Formel lautet: $A = r^2$

3.3 Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse bei unterschiedlich behandelten Vaginalzytologien

Bei diesem Experiment sollte die Frage beantwortet werden, ob es für die Interpretation des Ausstriches eine Rolle spielt, wie und an welcher Stelle die Proben entnommen wurden und wie diese im Anschluss aufbereitet wurden.

Die Beurteilung erfolgte durch eine Vielzahl von Personen, welche die Präparate auswerteten und im Anschluss daran die Ausstriche den unterschiedlichen Zyklusphasen zuzuordnen.

An dem Experiment nahmen 107 Versuchspersonen teil, die über unterschiedlich viel Erfahrung in der Beurteilung und Auswertung von Vaginalzytologien verfügten. Es handelte sich hierbei um Studierenden der Veterinärmedizin im 6. und 8. Semester.

Von jeder Person wurden die gleichen Ausstriche, insgesamt 24 Exemplare, analysiert und bewertet, die alle im Vorfeld gefärbt und eingedeckelt wurden. Es erfolgte im Vorfeld eine Kodierung der Proben, so dass ein Erkennen durch den Untersucher nicht möglich war.

Alle Teilnehmer nahmen freiwillig an dem Experiment teil und haben unmittelbar vor dem Versuch eine kurze, einheitliche Einführung in die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin bekommen. Zusätzlich haben die Studierenden als Hilfe eine schematische Schwarz-Weiß-Zeichnung der Zellen und eine stichpunktartige Auflistung der Erkennungsmerkmale der unterschiedlichen Zellarten erhalten (Anhang Abbildung 38 - 40). Diese Unterlagen konnten während der Untersuchung zur Hilfe genommen werden.

Die Ausstriche stammten zu gleichen Teilen von Tieren der Gruppen I bis III (Tabelle 8). Bei allen Hündinnen wurde im Rahmen der Anfertigung der Vaginalzytologie auch die Plasmaprogesteronkonzentration bestimmt, so dass sich die Zyklusphasen eindeutig zuordnen ließen. Die Progesteronkonzentrationen wurden den Versuchsteilnehmern nicht mitgeteilt, sondern dienten nur zur Auswertung der Ergebnisse.

Die Proben in den einzelnen Zyklusphasen setzten sich immer aus Paaren zusammen. Das bedeutet, dass zum Beispiel die Proben sProöstrus%aus Gruppe II (Trockener Tupfer . Feuchter Tupfer) beide zeitgleich einer Hündin entnommen

wurden und somit ein Paar bilden. Damit ist ein direkter Vergleich der Auswertbarkeit der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Entnahme mit trockenen und feuchten Tupfern gegeben.

Tabelle 8: Verteilung der auszuwertenden Proben aus dem Versuchsmaterial
(PÖ = Proöstrus, Ö = Östrus, MÖ = Metöstrus, AÖ = Anöstrus)

Versuchs- gruppe	Experiment I				Experiment II				Experiment III			
	PÖ	Ö	MÖ	AÖ	PÖ	Ö	MÖ	AÖ	PÖ	Ö	MÖ	AÖ
Ausstriche je Zyklus- phase (n)	2				2				2			
Gesamt (n)	8				8				8			

Die Teilnehmer mussten die Ausstriche nach Auswertbarkeit und Zyklusphase beurteilen und anhand eines vorgefertigten Bewertungsprotokolls klassifizieren (Anhang Abbildung 40). Konnte eine Probe nicht in eine Zyklusphase eingeordnet werden, so sollten die Teilnehmer dafür eine kurze Begründung abgeben.

3.4 Statistische Analysen

Mit Hilfe der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgte die statistische Bearbeitung der Daten. Die Verwaltung der Datensätze wurde unter Verwendung des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) durchgeführt. Das Statistikprogramm BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) diente zur statistischen Auswertung der Ergebnisse. Die graphische Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte ebenfalls mit dem Programm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation).

Zur Deskription der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}_a), Standardabweichungen (SA) und der Median berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Die Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung erfolgte in der Regel bis auf zwei Stellen hinter dem Komma.

Zur statistischen Berechnung der Menge der unterschiedlichen Zellarten in den einzelnen Zytologien wurde erst ein Test auf Normalverteilung durchgeführt. Hierbei zeigte sich in allen Experimenten, dass eine rechtsschiefe Verteilung vorlag. Für die folgenden statistischen Auswertungen wurden die quantitativen Daten logarithmisch transformiert. Um einen Logarithmus von Null zu umgehen, wurden die Daten mit $\lg(x + 3/8)$ transformiert (SACHS, 1992).

Zur Beantwortung der unterschiedlichen Fragestellungen waren verschiedene Tests notwendig (Tabelle 9). Für alle Berechnungen gilt $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant und $p \leq 0,01$ als statistisch hochsignifikant.

Tabelle 9: Angewandte statistische Methoden

Fragestellung	Statistische Methode
<p>Test auf Korrelation zwischen der mittleren Zellmenge einzelner Zellarten ohne Zykluseinteilung, jeweils nach Entnahme</p> <ul style="list-style-type: none"> - an zwei unterschiedlichen Orten, - mit unterschiedlichen Tupfern, - mit unterschiedlicher Fixierung 	<p>Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman</p>
<p>Vergleich der Mittelwerte einzelner Zellarten ohne Zykluseinteilung, jeweils nach Entnahme</p> <ul style="list-style-type: none"> - an zwei unterschiedlichen Orten, - mit unterschiedlichen Tupfern, - mit unterschiedlicher Fixierung 	<p>Wilcoxon-Test</p>
<p>Test auf Korrelation zwischen den einzelnen Parametern nach Entnahme an zwei unterschiedlichen Orten, aufgeteilt nach Zyklusphasen</p>	<p>Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman</p>
<p>Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Parameter nach Entnahme an zwei unterschiedlichen Orten, aufgeteilt nach Zyklusphasen</p>	<p>Wilcoxon-Test</p>
<p>Vergleich der Zellverteilung nach Entnahme</p> <ul style="list-style-type: none"> - an unterschiedlichen Orten - mit unterschiedlichen Tupfern - mit unterschiedlicher Fixierung 	<p>McNemar-Test (Test auf Symmetrie)</p>

Fragestellung	Statistische Methode
Vergleich der Zellmenge pro Gesichtsfeld nach Entnahme <ul style="list-style-type: none"> - mit unterschiedlichen Tupfern - mit unterschiedlicher Fixierung 	Wilcoxon-Test
Test auf Korrelation der Zellmenge pro Gesichtsfeld nach Entnahme <ul style="list-style-type: none"> - mit unterschiedlichen Tupfern - mit unterschiedlicher Fixierung 	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
Vergleich der Zellgrößen nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden	t-Test für verbundene Stichproben
Vergleich der korrekten Zykluszuordnung durch unterschiedliche Untersucher bei gepaarten Zytologien nach Entnahme <ul style="list-style-type: none"> - an unterschiedlichen Orten - mit unterschiedlichen Tupfern - mit unterschiedlicher Fixierung 	McNemar-Test (Test auf Symmetrie)

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Entnahmelokalisation

4.1.1 Zytologische Auswertung

Epithelzellen

Für den Vergleich der zytologischen Ergebnisse wurden Probenpaare von 120 Hündinnen bewertet. Die Ausstriche von den zwei unterschiedlichen Entnahmeorten Vestibulum und Vagina wurden auf Übereinstimmungen in Bezug auf die vorkommenden Zellarten untersucht. Basalzellen konnten in sechs (5 %) Zytologiepaaren nachgewiesen werden. Bei 101 (84 %) Probenpaaren wurden übereinstimmend keine Basalzellen gefunden. In 13 (11 %) Ausstrichpaaren lag keine Übereinstimmung vor, es befanden sich Basalzellen entweder ausschließlich im Vestibular- oder im Vaginalausstrich. Parabasalzellen in Vestibular- und Vaginalausstrichen konnten bei 60 (50 %) Hündinnen nachgewiesen werden. Eine Abwesenheit von Parabasalzellen wurde bei 49 (41 %) der Probenpaare festgestellt. Ohne Übereinstimmung blieben die Ausstrichpaare von elf (9 %) Hündinnen. Hier lagen entweder im Vestibular- oder im Vaginalausstrich Parabasalzellen vor. 102 (85 %) Ausstrichpaare wiesen gleichzeitig in Vestibular- und Vaginalausstrichen Intermediärzellen auf. In vier (3 %) Probenpaaren waren keine Intermediärzellen vorhanden. Ein Nachweis entweder im Vestibular- oder im Vaginalausstrich erfolgte bei 14 (12 %) gepaarten Proben. Superfizialzellen in Ausstrichen von beiden Entnahmeorte konnten bei 73 (60 %) Hündinnen nachgewiesen werden. Bei 37 (31 %) Paaren wurden keine Superfizialzellen gefunden und bei zehn (9 %) Hündinnen lagen entweder im Vestibular- oder im Vaginalausstrich Superfizialzellen vor. Schollen konnten in 49 (40 %) der Vestibular- und Vaginalausstriche detektiert werden. Keine Schollen zeigten die Probenpaare von 61 (51 %) Hündinnen. Bei zehn (9 %) Ausstrichpaaren lag keine Übereinstimmung vor, es wurden Schollen im Vestibular- oder im Vaginalausstrich nachgewiesen. Keratinisierte Zellen wurden bei 43 (36 %) Hündinnen an beiden Ausstrichlokalisationen nachgewiesen. Eine Abwesenheit von keratinisierten Zellen wiesen 20 (17 %) Ausstrichpaare auf. Ohne Übereinstimmung blieben 57 (47 %) Hündinnen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Anzahl der Ausstrichpaare (Entnahmeort Vestibulum und Vagina) mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Basal- (BZ), Parabasal- (PZ), Intermediär- (IZ), Superficialzellen (SZ), Schollen (Sch) und keratinisierten Zellen (KZ) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 120).

Zellart	Übereinstimmung (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
BZ	6 (5)	101 (84)	107 (89)	13 (11)	120 (100)
PZ	60 (50)	49 (41)	109 (91)	11 (9)	120 (100)
IZ	102 (85)	4 (3)	106 (88)	14 (12)	120 (100)
SZ	73 (60)	37 (31)	110 (91)	10 (9)	120 (100)
Sch	49 (40)	61 (51)	110 (91)	10 (9)	120 (100)
KZ	43 (36)	20 (17)	63 (53)	57 (47)	120 (100)

In der Vagina konnten mehr Basalzellen und Schollen als im Vestibulum nachgewiesen werden ($p = 0,0078$). Intermediärzellen und keratinisierte Zellen kamen hochsignifikant häufiger im Vestibulum als in der Vagina vor ($p < 0,0001$). Statistisch signifikante Unterschiede in der Menge zeigten sich somit bei Basalzellen, Intermediärzellen, Schollen und keratinisierte Zellen (Tabelle 11).

Ergebnisse

Tabelle 11: Vergleich des Zellvorkommens der Basal-, Parabasal-, Intermediär- und Superficialzellen sowie Schollen und keratinisierten Zellen nach Entnahme von zwei unterschiedlichen Orten (Vestibulum . Vagina). Die Hündinnen (n = 120) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Dargestellt sind die p-Werte. Statistische signifikante Unterschiede kamen bei Basalzellen, Intermediärzellen, Schollen und keratinisierten Zellen vor.

	Basal- zellen	Parabasal- zellen	Intermediär- zellen	Superficial- zellen	Schollen	Keratinisierte Zellen
p- Wert	0,0078	0,051	< 0,0001	0,79	< 0,0001	< 0,0001

Es bestand bei den Basalzellen, Parabasalzellen, Intermediärzellen, Superficialzellen und bei den Schollen eine eindeutige positive Korrelation zwischen den Entnahmeorten ($r = 0,53$). Die positive Korrelation bei den keratinisierten Zellen war nicht so deutlich ausgeprägt ($r = 0,42$). Alle Korrelationsanalysen präsentierten eine hohe statistische Signifikanz ($p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 37).

Zusätzlich zu den Zellzahlen wurden die Parameter Detritus, Sekret und das Vorkommen von Bakterien, Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten untersucht. Bei allen Parametern bestand eine deutliche, positive Korrelation zwischen dem Vorkommen dieser Parameter in den Vestibular- und Vaginaausstrichen, die hochsignifikant war (Anhang Tabelle 37). Die durchschnittliche Menge der Parameter wies keine Unterschiede auf. Lediglich die Sekretmenge zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich der Entnahmeorte (Tabelle 14).

Erythrozyten und neutrophile Granulozyten

In 38 (32 %) Probenpaaren konnten übereinstimmend Erythrozyten detektiert werden. Keine Erythrozyten wurden bei 66 (55 %) Hündinnen nachgewiesen. In 16 (13 %) Ausstrichpaaren lagen keine Übereinstimmungen vor. Es kamen Erythrozyten

entweder im Vestibular- oder im Vaginaausstrich vor (Tabelle 12). Erythrozyten waren insgesamt bei 49 (40 %) Zytologien aus dem Vestibulum nachweisbar, aber nur in 43 (36 %) Proben aus der Vagina.

Sowohl aus dem Vestibulum als auch aus der Vagina wurden vier (3 %) Proben gewonnen, in denen mehr als 50 Erythrozyten pro Gesichtsfeld zu sehen waren.

Von den positiven Vestibularproben zeigten 13 (11 %) Ausstriche eine Erythrozytenzahl von 10 bis 50 Erythrozyten pro Gesichtsfeld und bei 32 (27 %) Ausstrichen waren nur bis zu 10 Erythrozyten pro Gesichtsfeld darstellbar. Bei den Vaginaausstrichen gab es 19 (16 %) Proben mit 10 bis 50 Erythrozyten pro Gesichtsfeld und 20 (17 %) Ausstriche mit weniger als 10 Erythrozyten pro Gesichtsfeld (Abbildung 8). Bezüglich der Erythrozytenmenge in den gepaarten Ausstrichen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 1,0$) (Tabelle 14).

Neutrophile Granulozyten wurden bei 37 (31 %) Hündinnen detektiert. Bei 71 (59 %) der Ausstrichpaare konnten übereinstimmend keine neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Bei zwölf (10 %) Hündinnen zeigten die Zytologien keine Übereinstimmung (Tabelle 12).

Neutrophile Granulozyten waren mit 45 positiven Proben (37 %) im Vestibulum häufiger vertreten. In den Vaginaausstrichen wurden nur in 41 (34 %) Ausstrichen neutrophile Granulozyten detektiert.

Mehr als 25 neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld zeigten jeweils zehn (8 %) Proben der Vestibular- und Vaginaausstriche. Die Zahl der Ausstriche mit 5 bis 25 neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld lag bei den Vestibularausstrichen bei elf (9 %) Proben, bei den Proben aus der Vagina bei zehn (8 %) Ausstrichen. In 24 (20 %) Proben aus dem Vestibulum konnten bis zu fünf neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld gefunden werden. Bei den Vaginaausstrichen waren es hingegen nur 21 (18 %) Proben (Abbildung 9). Ein statistischer Unterschied der Menge der neutrophilen Granulozyten konnte nicht bewiesen werden ($p = 0,42$).

Sowohl bei den Erythrozyten als auch bei den neutrophilen Granulozyten bestanden deutliche, positive Korrelationen mit einer hohen statistischen Signifikanz ($r_s = 0,8$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 37).

Ergebnisse

Tabelle 12: Anzahl der Ausstrichpaare von zwei unterschiedlichen Entnahmeorten (Vestibulum . Vagina) mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Erythrozyten (Ery) und neutrophilen Granulozyten (NG) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 120).

Zellart	Übereinstimmung (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
Ery	38 (32)	66 (55)	104 (87)	16 (13)	120 (100)
NG	37 (31)	71 (59)	108 (90)	12 (10)	120 (100)

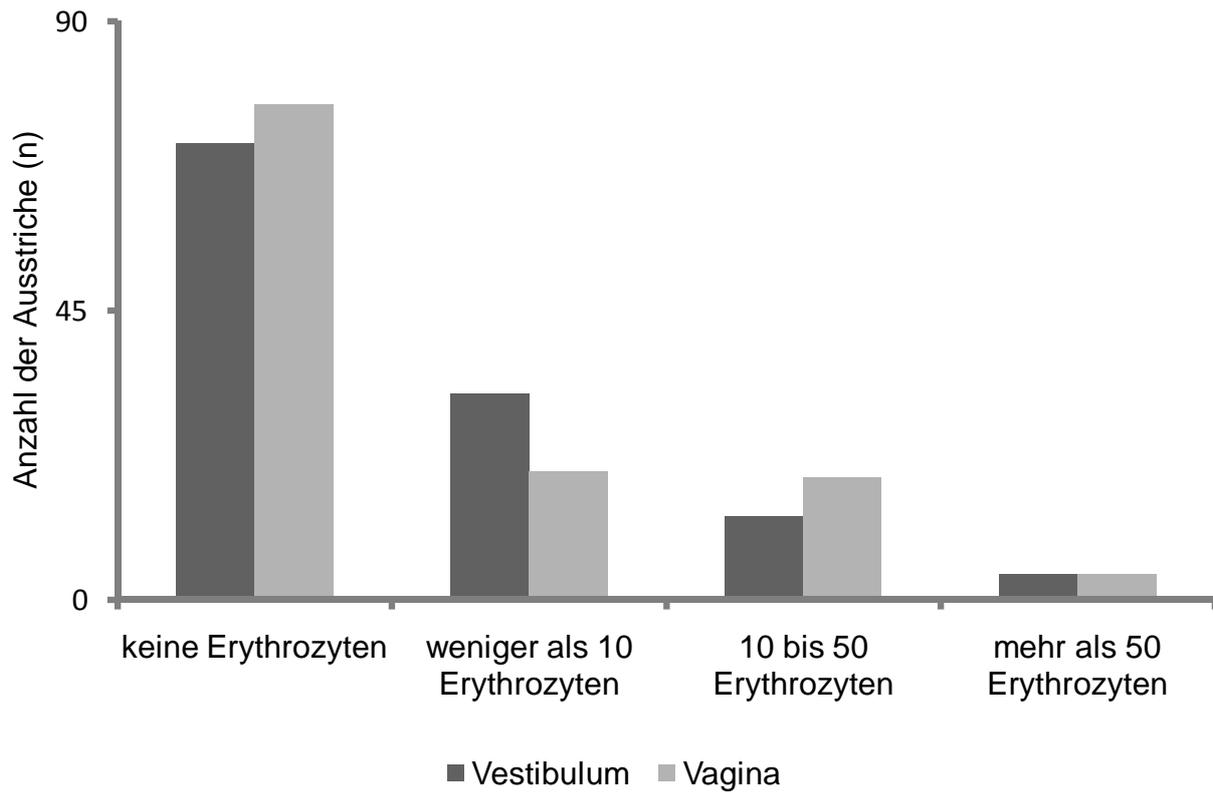


Abbildung 8: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum (n = 120) und Vagina (n = 120) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Erythrozyten pro Gesichtsfeld. Zwischen den beiden Entnahmelokalisationen existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

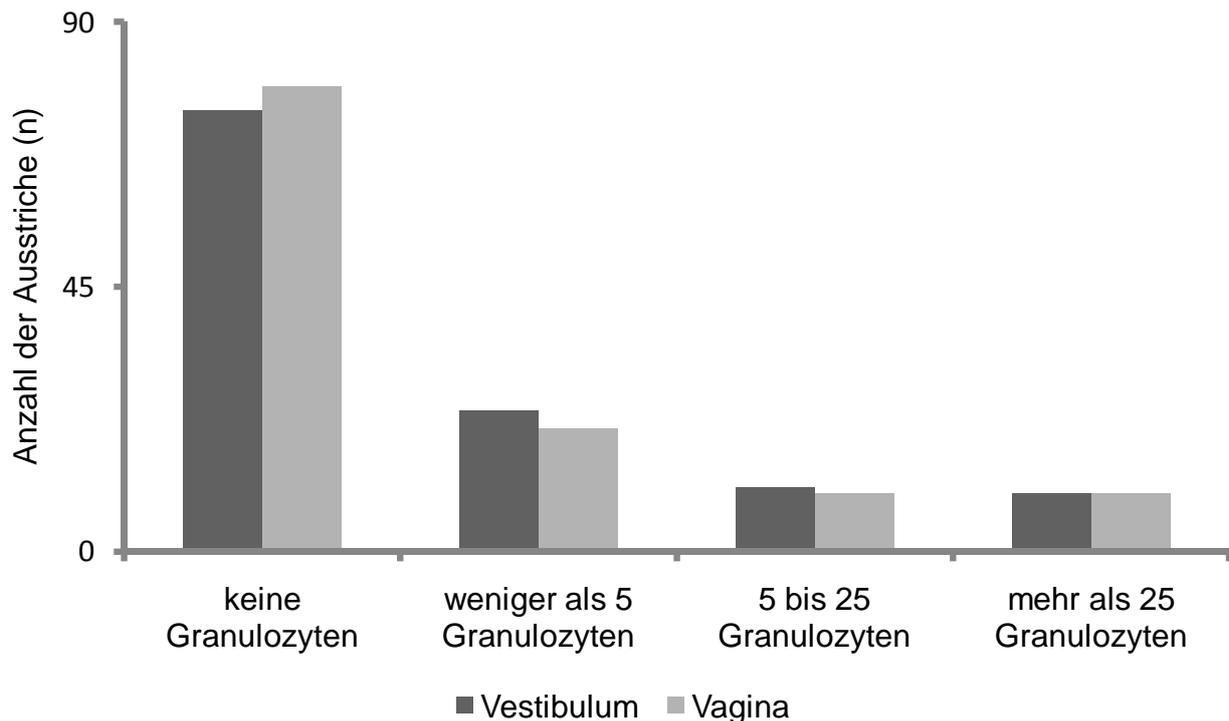


Abbildung 9: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum (n = 120) und Vagina (n = 120) nach unterschiedlich starkem Gehalt an neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld. Zwischen beiden Entnahmelokalisationen existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Bakterien

In 68 (56 %) Probenpaaren konnten übereinstimmend Bakterien dargestellt werden. Bakterien konnten nicht nachgewiesen werden in 27 (23 %) Probenpaaren. Bei 25 Hündinnen (21 %) wurden Bakterien entweder im Vestibular- oder im Vaginaausstrich dokumentiert.

In 78 (65 %) Ausstrichen aus dem Vestibulum konnten Bakterien nachgewiesen werden, dagegen nur in 73 (61 %) Proben aus der Vagina.

47 Vestibularausstriche (39 %) wiesen eine geringe Menge von Bakterien auf. In 26 Ausstrichen (22 %) aus dem Vestibulum wurde ein mittleres Aufkommen von Bakterien festgestellt, eine hohe Bakterienmenge zeigten fünf Proben (4 %).

Die 73 (61 %) positiven Ausstriche aus der Vagina teilten sich wie folgt auf: 47 (39 %) Ausstriche mit geringem Bakterienaufkommen, 22 (18 %) Proben mit mittlerem Gehalt an Bakterienkolonien und vier (3 %) Ausstriche mit einem hohen Aufkommen an Bakterien (Tabelle 13, Abbildung 10). Statistisch wurden keine signifikanten Unterschiede in der Bakterienmenge bei den gepaarten Zytologien nachgewiesen ($p = 0,15$) (Tabelle 14). Es lag eine statistisch hochsignifikante positive Korrelation vor ($r_s = 0,64$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 37).

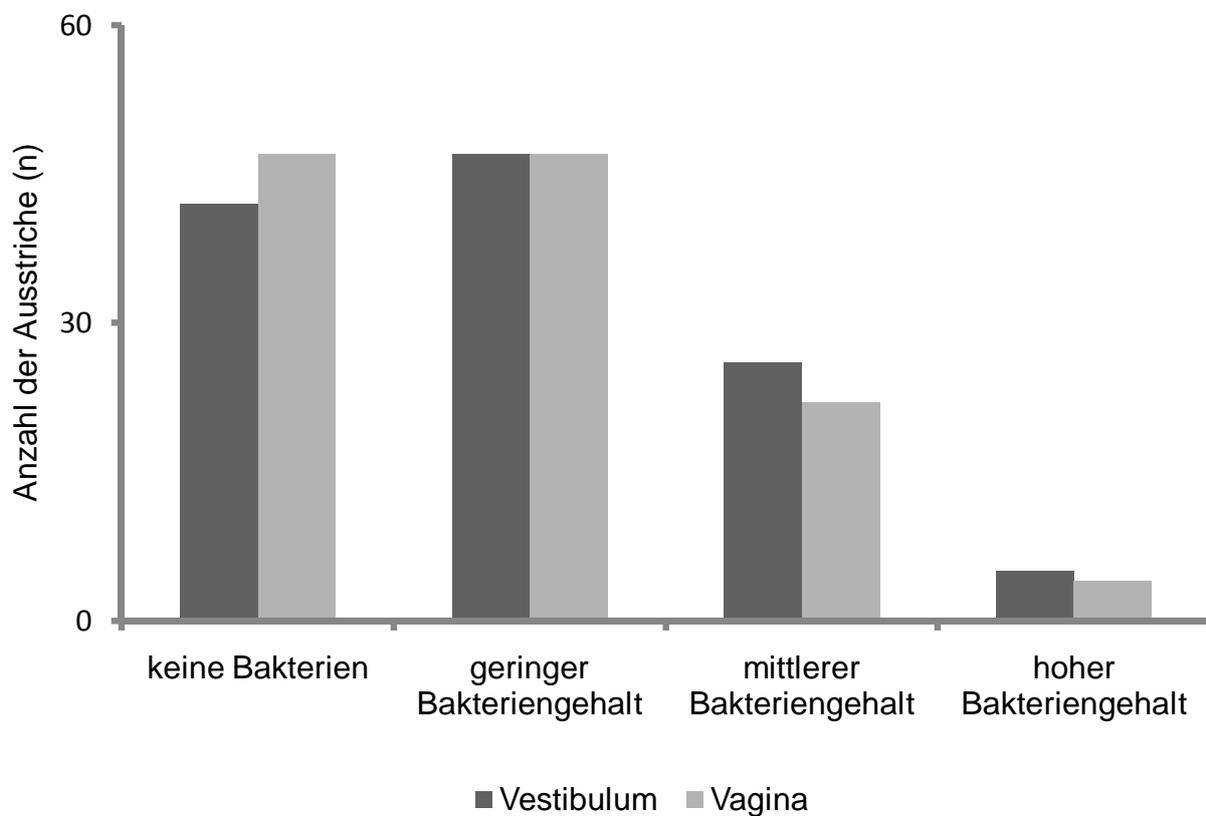


Abbildung 10: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum ($n = 120$) und Vagina ($n = 120$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Bakterienkolonien. Zwischen den beiden Entnahmelokalisationen existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Sekret

Bei 15 (12 %) Hündinnen konnte übereinstimmend Sekret im Vestibular- und Vaginalausstrich dargestellt werden. Kein Sekret wurde bei 79 (66 %) Hündinnen nachgewiesen. Eine fehlende Übereinstimmung zeigten 26 (22 %) Probenpaare. Hier war Sekret entweder im Vestibular- oder im Vaginalausstrich nachweisbar. Insgesamt wiesen 34 (28 %) Vaginalausstriche Sekret auf. Bei den Vestibularausstrichen waren es 22 (18 %) positive Proben. Von den genannten 34 (28 %) Vaginalzytologien wiesen 20 (17 %) Proben einen nur geringen Sekretgehalt auf. Zehn Ausstriche (8 %) zeigten einen mittleren und vier (3 %) Ausstriche einen hohen Sekretgehalt an. Jeweils vier (3 %) Proben von den untersuchten Vestibularausstrichen zeigten einen mittleren und einen hohen Sekretgehalt. Wenig Sekret war in 14 (12 %) Proben von insgesamt 22 (18 %) positiven Ausstrichen aus dem Vestibulum vorhanden (Abbildung 11, Tabelle 13). Es lagen statisch signifikante Unterschiede bezüglich der Sekretmenge vor ($p = 0,032$) (Tabelle 14). Im Vestibulum befand sich im Mittel weniger Sekret als in der Vagina. Eine positive Korrelation wurde mit statistischer Signifikanz nachgewiesen ($r_s = 0,48$, $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 37).

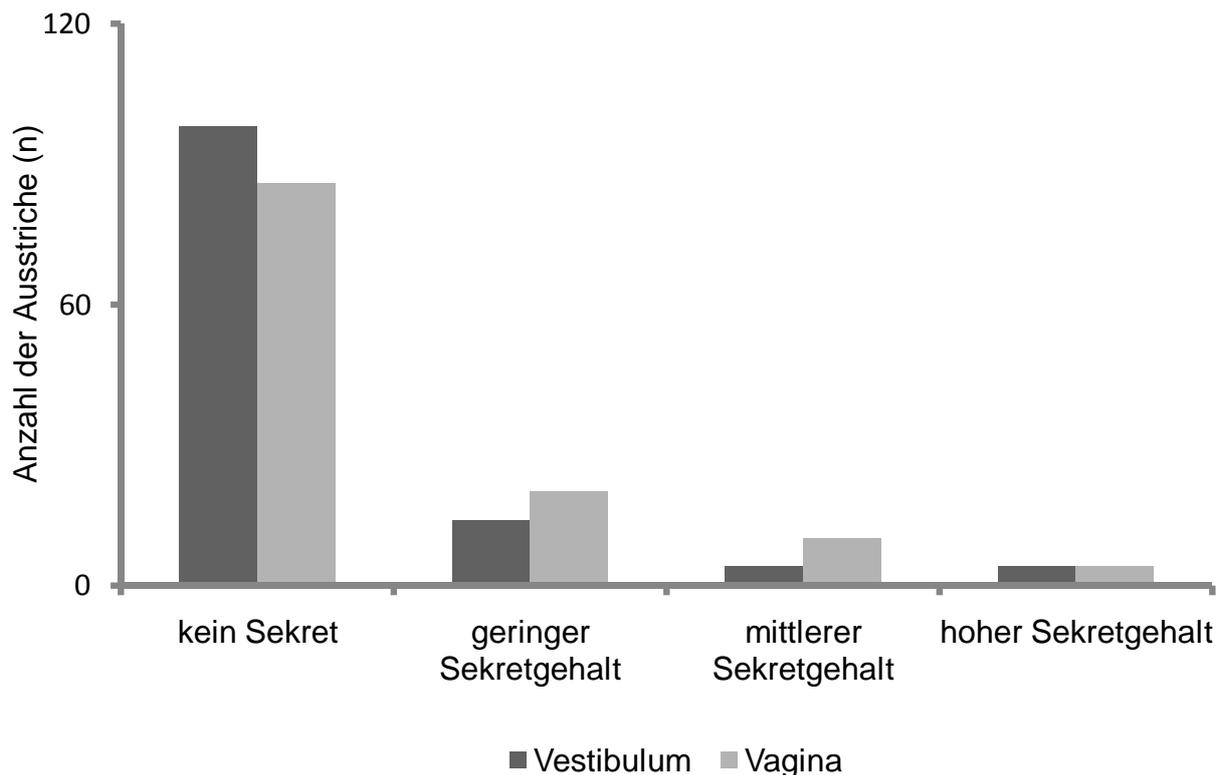


Abbildung 11: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum (n = 120) und Vagina (n = 120) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Sekret. Die Unterschiede sind statistisch signifikant. In der Vagina konnte mehr Sekret nachgewiesen werden als im Vestibulum.

Detritus

Übereinstimmend konnte Detritus bei 94 (77 %) Hündinnen in den Vestibular- und Vaginalausstrichen nachgewiesen werden. Eine übereinstimmende Abwesenheit von Detritus zeigten zwölf (10 %) Probenpaare. Bei den Vestibularausstrichen waren es 105 (88 %) Proben, in denen Detritus nachgewiesen wurde. Bei den Vaginalausstrichen waren es dagegen nur 94 (78 %) Proben.

74 (62 %) Proben aus dem Vestibulum enthielten geringe Mengen Detritus. In 26 (22 %) Vestibularausstrichen wurde ein mittlerer Gehalt an Detritus gefunden. Ein hoher Detritusgehalt war in fünf (4 %) Vestibularproben nachweisbar. Bei den Vaginalausstrichen präsentierten insgesamt 59 (49 %) Proben eine geringe Menge an Detritus. Ein mittelgradiger Detritusgehalt lag bei 27 (23 %) Proben vor und acht (7 %) Proben präsentierten eine hohe Menge an Detritus (Tabelle 13, Abbildung 12).

Ergebnisse

Bei Untersuchung aller gepaarten Proben lagen keine signifikanten Unterschiede vor ($p = 0,48$) (Tabelle 14). Eine positive Korrelation wurde nachgewiesen ($r_s = 0,66$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 37).

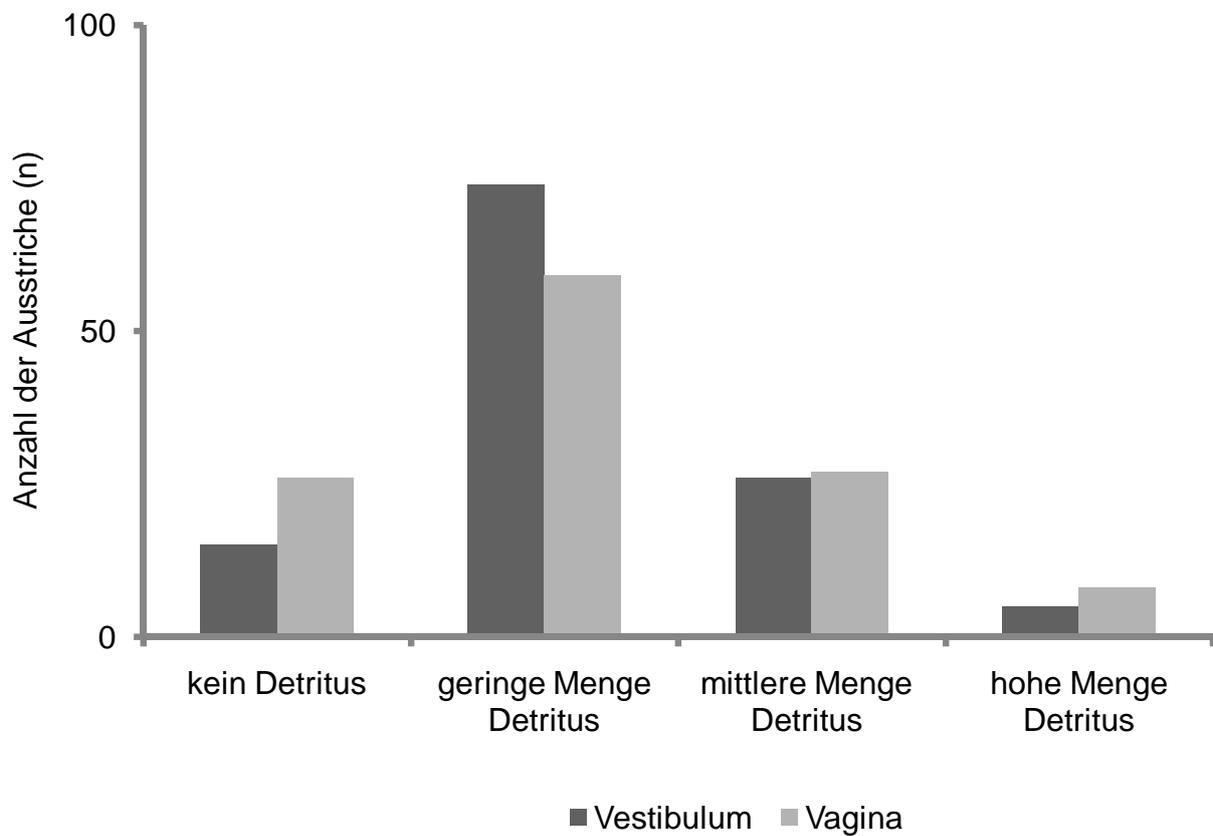


Abbildung 12: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum ($n = 120$) und Vagina ($n = 120$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Detritus. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Tabelle 13: Anzahl der Ausstrichpaare mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf das Vorkommen von Bakterien (Bakt), Sekret (Sek) und Detritus (Det) sowie die relative Häufigkeit der Ausstriche in % in Bezug auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 120).

Parameter	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt		
Bakt	68 (56)	27 (23)	95 (79)	25 (21)	120(100)
Sek	15 (12)	79 (66)	94 (78)	26 (22)	120 (100)
Det	94 (77)	12 (10)	106 (88)	14 (12)	120 (100)

Tabelle 14: Vergleich des Vorkommens der einzelnen Parameter (Erythrozyten, neutrophile Granulozyten, Bakterien, Sekret und Detritus) nach Entnahme von zwei unterschiedlichen Orten (Vestibulum . Vagina). Die Hündinnen (n = 120) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Dargestellt sind die p-Werte. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte ausschließlich bei dem Vorkommen von Sekret detektiert werden ($p = 0,032$).

	Erythrozyten	Neutrophile Granulozyten	Bakterien	Sekret	Detritus
p- Wert	1,0	0,42	0,15	0,032	0,48

Zellverteilung

Die Zellverteilung war in 85 (71 %) gepaarten Ausstrichen identisch. Bei 35 (29 %) Hündinnen zeigten die Zellen im Vestibular- und Vaginaausstrich eine unterschiedliche Verteilung.

Einzelnen lagen die Zellen in 62 (52 %) Proben aus dem Vestibulum und in 63 (53 %) Proben der Vaginaausstriche vor. 31 (26 %) Vestibularausstriche und 25 (21 %) Proben aus der Vagina zeigten Zellen, die mit anderen Zellen in einem Verband zusammengelagert waren. Eine beginnende Nesterbildung zeigten jeweils 22 (18 %) Ausstriche aus Vestibulum und Vagina. Eine deutliche Nesterbildung wurde bei fünf (4 %) Vestibular- und zehn (8 %) Vaginaausstrichen detektiert (Abbildung 13). Die Zellverteilung in den gepaarten Ausstrichen unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,29$).

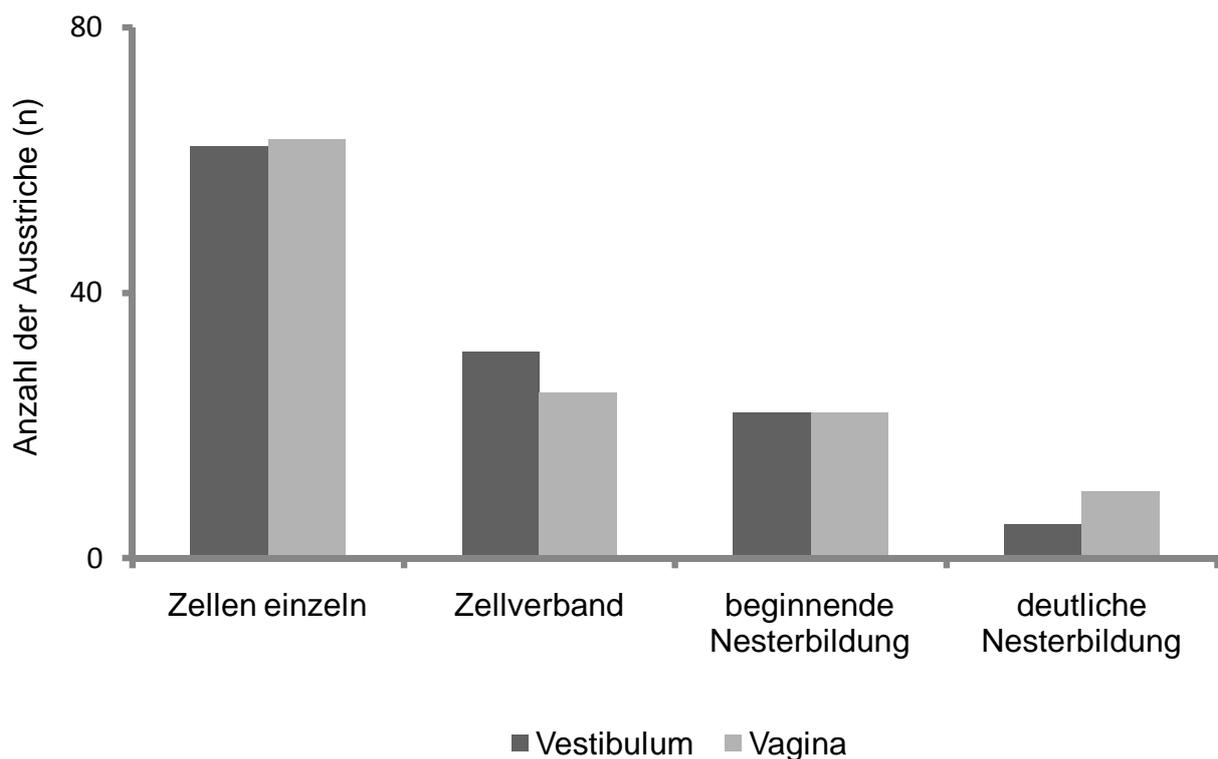


Abbildung 13: Einteilung der Ausstriche aus Vestibulum ($n = 120$) und Vagina ($n = 120$) nach unterschiedlichem Verteilungsmuster der Zellen im Ausstrich. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

4.1.2 Zykluseinteilung

Die Vaginalzytologie wurde als Goldstandard bei der Einteilung in die Zyklusphase angesehen. An ihr wurde die Zyklusphase der jeweiligen Hündin festgelegt. Bei insgesamt 100 gepaarten Zytologien (83 %) lagen Übereinstimmungen im Zyklusbild von Vagina und Vestibulum vor. Die 20 (17 %) abweichenden Probenpaare traten alle bei Hündinnen mit einem vaginalzytologisch östrischem Bild auf (Tabelle 15).

Im Proöstrus befanden sich 19 (16 %) der 120 Hündinnen. Hier zeigte sich in den Vestibular- und Vaginalausstrichen ein identisches Ausstrichbild. Anhand der Vaginalzytologie wurden 46 (38 %) Hündinnen in den Östrus eingeteilt. Davon waren bei 26 Hündinnen Vestibular- und Vaginalzytologie identisch. In 20 Ausstrichen wichen die Vestibularproben in der Zytologie jedoch von den Vaginalausstrichen ab und zeigten durchweg ein proöstrisches Zellbild. Ein metöstrisches Zellbild lag bei 32 (27 %) Hündinnen vor. Hier stimmten die Aussagen der exfoliativen Zytologien aus Vagina und Vestibulum überein. 23 (19 %) Hündinnen konnten anhand der Ausstriche aus Vagina und Vestibulum in den Anöstrus eingeteilt werden. Die gepaarten Proben zeigten übereinstimmend ein anöstrisches Zellbild (Tabelle 15).

Tabelle 15: Anzahl der Ausstrichpaare (n = 120) mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf die zytologische Einordnung in die entsprechenden Zyklusstadien.

	Übereinstimmung Vestibulum . Vagina (n)	Keine Übereinstimmung (n)	Gesamt (n)
Proöstrus	19	0	19
Östrus	26	20	46
Metöstrus	32	0	32
Anöstrus	23	0	23
Gesamt	100	20	120

4.1.3 Zykluseinteilung mit Berücksichtigung der Progesteronwerte

Bei 47 Hündinnen wurden zusätzlich zu den Ausstrichen aus Vestibulum und Vagina die Plasmaprogesteronkonzentrationen für die Zyklusbestimmung analysiert.

Hündinnen im Proöstrus

Von den 47 Hündinnen hatten 13 (28 %) Hündinnen eine Progesteronkonzentration unter 2 ng / ml und konnten somit dem Proöstrus zugeordnet werden.

Die Zyklusaussagen, die anhand der exfoliativen Zellausstriche getroffen werden konnten, waren nicht in allen Fällen übereinstimmend mit den Zyklusdiagnosen, die anhand der Plasmaprogesteronkonzentrationen gestellt wurden (Abbildung 20).

Bei den Ausstrichen aus dem Vestibulum waren es zehn Proben, die ein eindeutiges proöstrisches Bild präsentierten und drei Proben, die trotz einer proöstrischen Progesteronkonzentration typische Merkmale des Östrus aufwiesen. Fünf der ausgewerteten Vaginalzytologien präsentierten ein proöstrisches Zellbild. Die übrigen acht Ausstriche wurden anhand der Zytologie in den Östrus eingeordnet.

Beim Auszählen der 200 Zellen der einzelnen Ausstriche von proöstrischen Hündinnen konnte festgestellt werden, dass in den gepaarten Zytologien bei einigen Zellarten Unterschiede vorlagen (Tabelle 16). Statistisch signifikante Unterschiede konnten beim Vorkommen der Intermediärzellen, Superficialzellen, Schollen und keratinisierten Zellen nachgewiesen werden ($p < 0,05$) (Abbildungen 14 und 15). Die Intermediärzellen wurden vermehrt in den Ausstrichen aus dem Vestibulum nachgewiesen, Superficialzellen und Schollen in deutlich mehr Ausstrichen aus der Vagina (Abbildung 14). Das Vorkommen der keratinisierten Zellen zeigte statistisch hochsignifikante Unterschiede und war deutlich höher in den Vestibularausstrichen ($p = 0,002$). Eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem Nachweis an zwei Lokalisationen konnte bei fast allen Zellarten nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 38). Bei den Basalzellen und keratinisierten Zellen ließ sich eine positive Korrelation nicht mit einer statistischen Signifikanz beweisen ($p > 0,05$).

Tabelle 16: Zellverteilung der 200 ausgezählten Zellen pro Ausstrich in den exfoliativen Vestibular- und Vaginalzytologien bei Hündinnen mit proöstrischem Plasmaprogesteronwert ($n = 13$), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Zellart	Vestibulum		Vagina	
	$x_a \pm SA$	Median	$x_a \pm SA$	Median
Basalzellen	0 ± 0	0,00	$0,15 \pm 0,56$	0,00
Parabasalzellen	$6,15 \pm 11,31$	0,00	$10,69 \pm 29,85$	0,00
Intermediärzellen	$91,69 \pm 64,54$	123,00	$43 \pm 50,61$	15,00
Superfizialzellen	$86,85 \pm 59,62$	74,00	$111,62 \pm 57,14$	120,00
Schollen	$12,85 \pm 24,7$	1,00	$34,08 \pm 35,97$	18,00
Keratinisierte Zellen	$2,77 \pm 2,59$	2,00	$0,46 \pm 0,88$	0,00

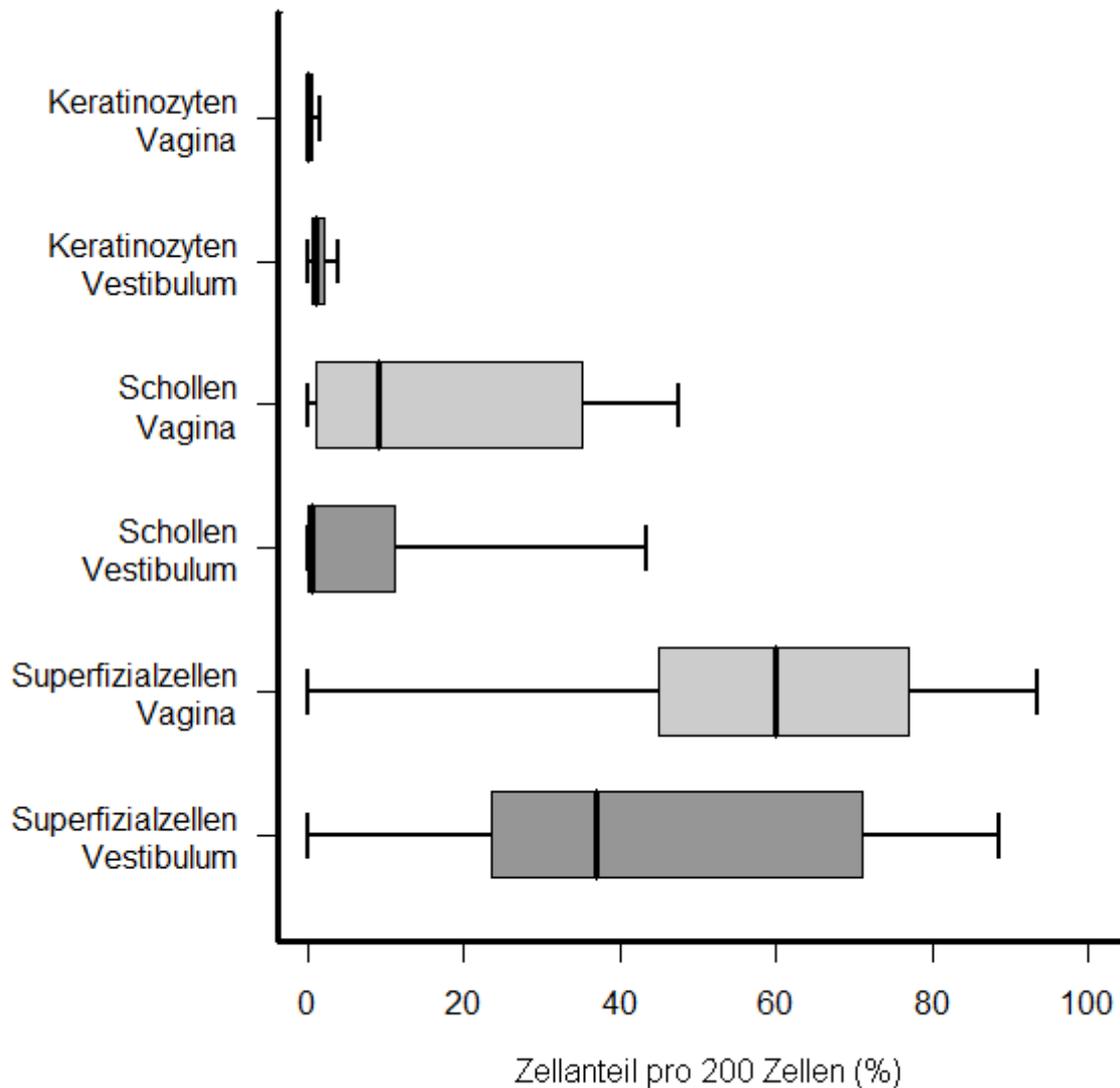


Abbildung 14: Darstellung der Zellanteile pro 200 ausgezählter Zellen an den unterschiedlichen Entnahmeorten Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Proöstrus (n = 13). Darstellung von Keratinozyten, Schollen und Superficialzellen im Box-and-Whisker-Plot. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich für keratinisierte Zellen, Schollen und Superficialzellen nachweisen.

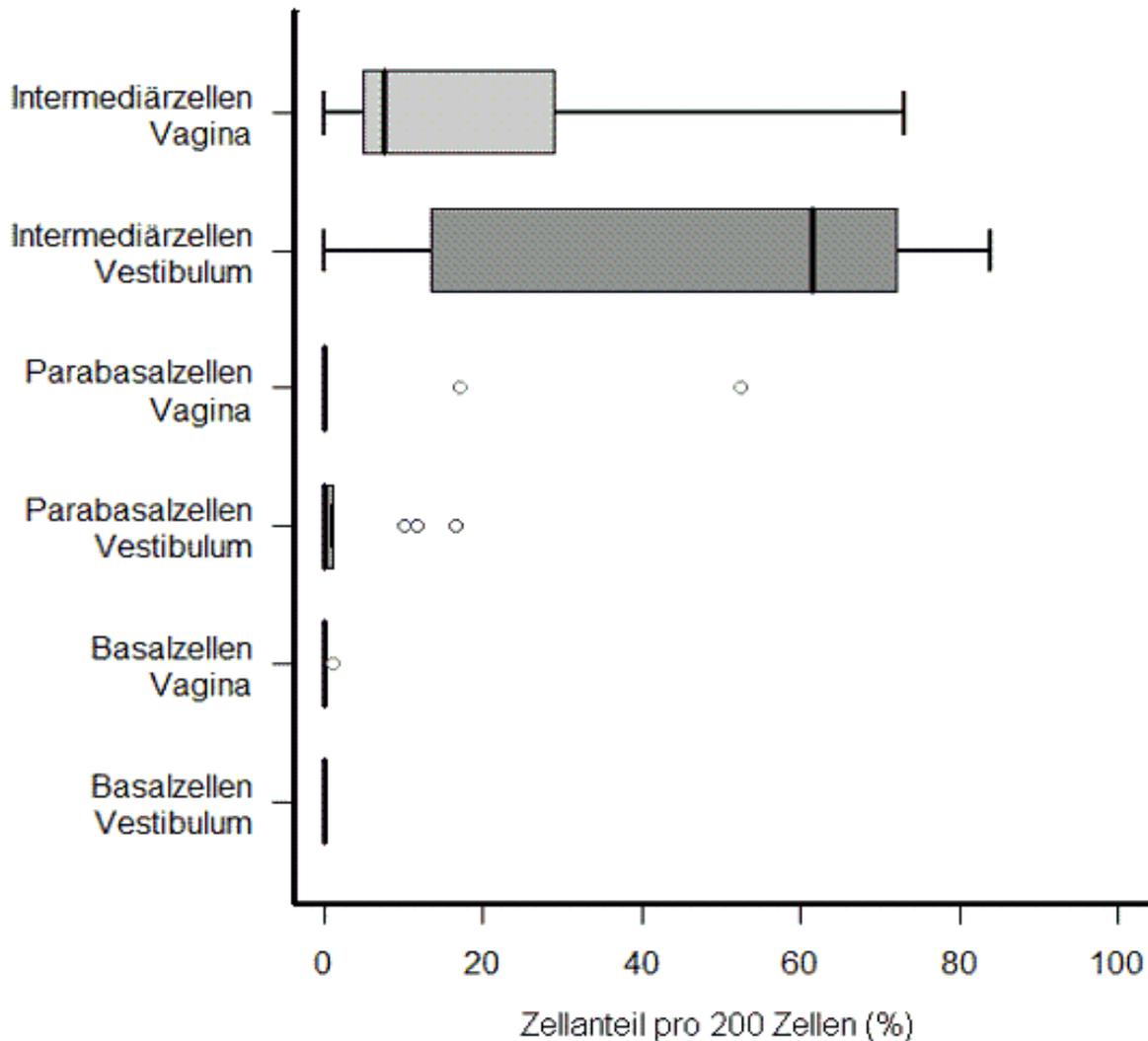


Abbildung 15: Darstellung der Zellanteile pro 200 Zellen an den unterschiedlichen Entnahmeorten Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Proöstrus (n = 13). Darstellung der Intermediärzellen, Parabasalzellen und Basalzellen im Box-and-Whisker-Plot. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für Intermediärzellen nachgewiesen.

Das Vorkommen von Bakterien, Sekret, Detritus, Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten wies bei den gepaarten Zytologien der Hündinnen im Proöstrus keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$).

Ergebnisse

Hündinnen im Östrus

Anhand der Progesteronkonzentrationsbestimmung wurden 23 Hündinnen (49 %) in den Östrus eingeordnet. Bei den exfoliativen Zytologien zeigten zwölf Hündinnen trotz eindeutiger Plasmaprogesteronkonzentration ein proöstrisches Zellbild im Vestibularausstrich. Bei den Vaginaausstrichen waren es nur zwei von insgesamt 23 Hündinnen, die statt einem östrischen Zellbild ein proöstrisches Zellbild aufwiesen (Abbildung 20). Bei der Untersuchung der gepaarten Ausstriche aus Vestibulum und Vagina lagen statistische signifikante Unterschiede beim Vorkommen der Intermediärzellen, Schollen und keratinisierten Zellen vor. Die Schollen kamen deutlich öfter und in größerer Menge in den Vaginaausstrichen vor ($p = 0,0019$) (Abbildung 16, Tabelle 17). Die Intermediärzellen ($p = 0,0054$) und keratinisierten Zellen ($p < 0,0001$) konnten öfter in den Ausstrichen aus dem Vestibulum beobachtet werden. Bei den übrigen Zellarten zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abbildungen 16 und 17). Eine deutliche positive Korrelation zwischen den Entnahmeorten war bei fast allen Zellarten vorhanden. Diese war jedoch bei den meisten Zellarten statistisch nicht signifikant (Anhang Tabelle 38).

Tabelle 17: Zellverteilung der 200 ausgezählten Zellen pro Ausstrich in den Vestibular- und Vaginalzytologien bei Hündinnen mit einer östrischen Plasmaprogesteronkonzentration ($n = 23$), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Zellart	Vestibulum		Vagina	
	$x_a \pm SA$	Median	$x_a \pm SA$	Median
Basalzellen	0 ± 0	0,00	0 ± 0	0,00
Parabasalzellen	$0,17 \pm 0,58$	0,00	$0,04 \pm 0,21$	0,00
Intermediärzellen	$28,43 \pm 32,81$	16,00	$10,48 \pm 21,67$	4,00
Superficialzellen	$126,13 \pm 34,04$	133,00	$128,61 \pm 37,71$	120,00
Schollen	$40,74 \pm 38,39$	32,00	$59,87 \pm 38,26$	66,00
Keratinisierte Zellen	$4,48 \pm 3,67$	3,00	$0,74 \pm 0,96$	0,00

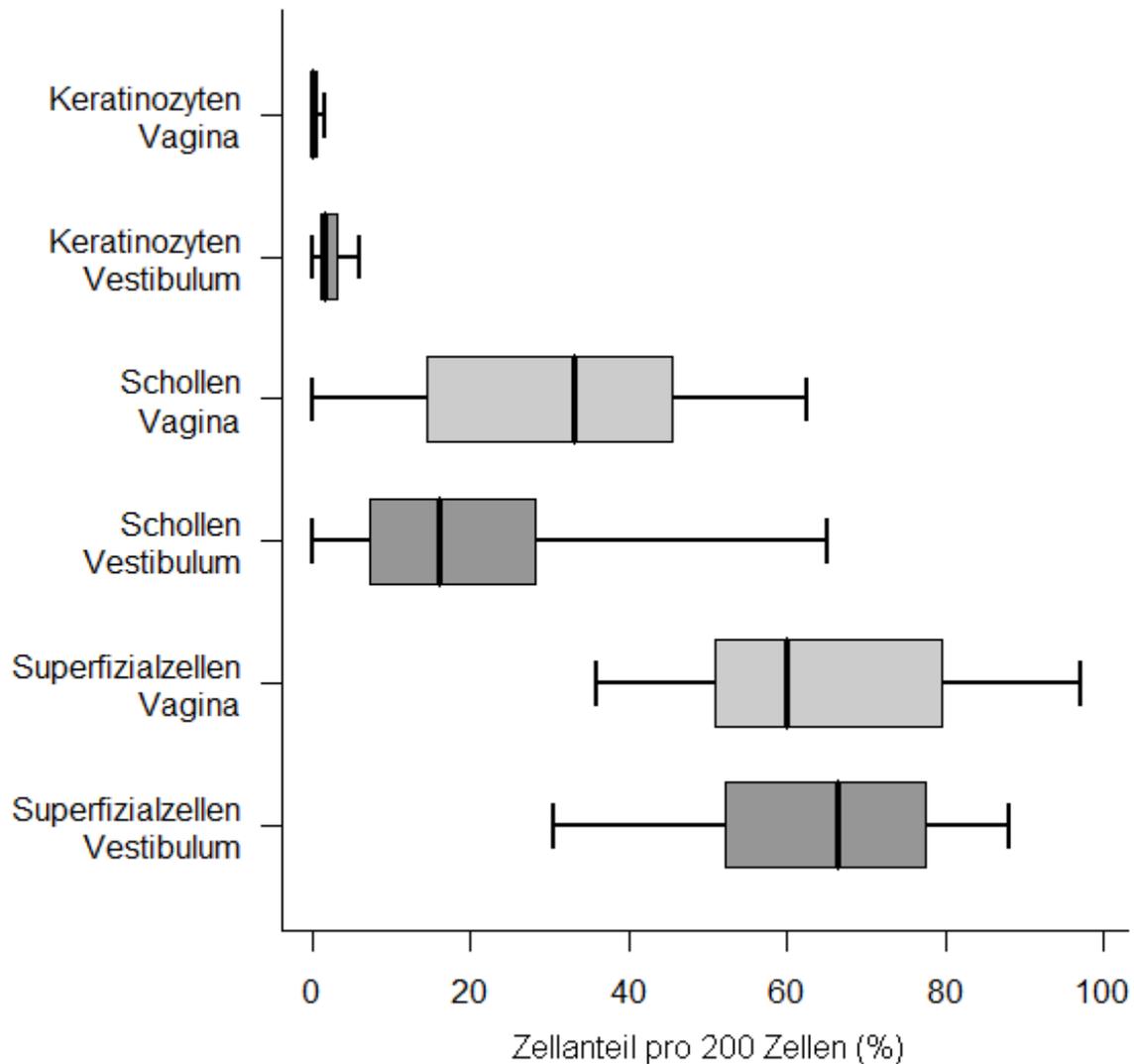


Abbildung 16: Darstellung der Zellanteile pro 200 Zellen an den unterschiedlichen Entnahmestellen Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Östrus (n = 23). Darstellung der Superfizialzellen, Schollen und keratinisierten Zellen im Box-and-Whisker-Plot. Statistisch signifikante Unterschiede lagen bei keratinisierten Zellen und Schollen vor.

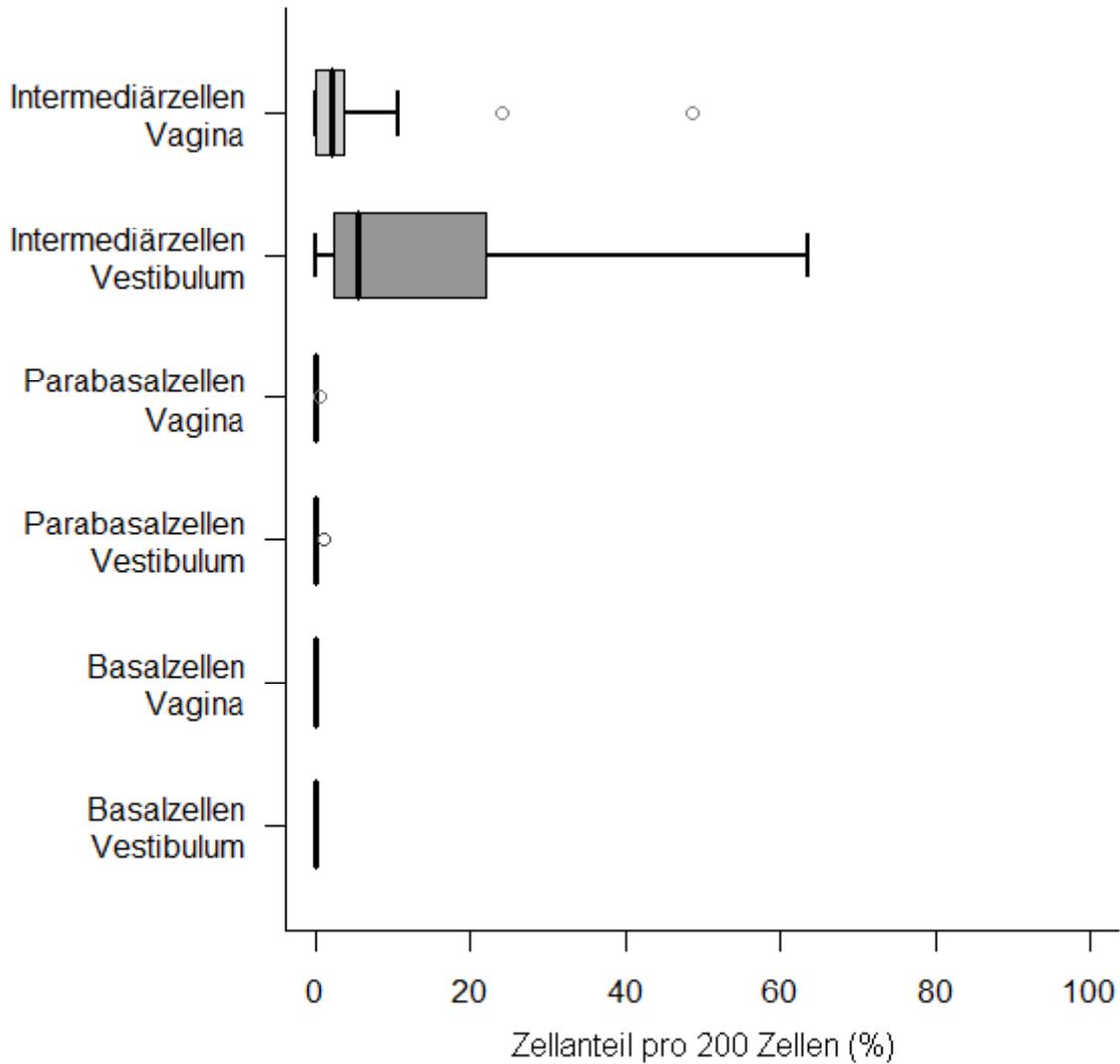


Abbildung 17: Darstellung der Zellanteile pro 200 Zellen an den unterschiedlichen Entnahmeorten Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Östrus (n = 23). Darstellung der Anteile der Intermediärzellen, Parabasalzellen und Basalzellen im Box-and-Whisker-Plot. Statistisch signifikante Unterschiede lagen bei den Intermediärzellen vor.

Bakterien-, Sekret- und Detritusmenge wiesen in den gepaarten Zytologien keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Gleiches galt für das Vorkommen von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten ($p < 0,05$). Eine positive Korrelation konnte bei allen Parametern statistisch bewiesen werden (Anhang Tabelle 39).

Hündinnen im Metöstrus

Neun (19 %) Hündinnen ließen sich hormonell eindeutig in den Metöstrus einordnen. Bei fünf Hündinnen stimmten Hormonwerte und die exfoliativen Zytologien aus Vestibulum und Vagina überein (Abbildung 20). Die übrigen Ausstriche ließen sich anhand des Zellbildes in die Zyklusstadien Proöstrus und Östrus einordnen. Zwei der neun Vestibularproben präsentierten ein proöstrisches Zellbild, die dazugehörigen Vaginaausstriche zeigten dagegen ein östrisches Zellbild. Bei zwei weiteren Paarproben zeigten alle vier Ausstriche ein östrisches Zellbild, obwohl die Plasmaprogesteronkonzentration deutlich über 15 ng / ml lag.

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellmenge zwischen den Entnahmelokalisationen ließ sich nur für keratinisierte Zellen nachweisen ($p = 0,0078$). Sie waren in den Vestibularausstrichen viel häufiger vorhanden. Bei den anderen Zellarten bestanden keine statistisch nachweisbaren Unterschiede im Vorkommen der Zellen in den gepaarten Ausstrichen (Abbildungen 18 und 19, Tabelle 18). Bei keratinisierten Zellen konnte keine Korrelation mit statistischer Signifikanz nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 38).

Ergebnisse

Tabelle 18: Zellverteilung der 200 ausgezählten Zellen pro Ausstrich in den exfoliativen Vestibular- und Vaginausstrichen bei Hündinnen mit einer metöstrischen Plasmaprogesteronkonzentration ($n = 9$), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Zellart	Vestibulum		Vagina	
	$x_a \pm SA$	Median	$x_a \pm SA$	Median
Basalzellen	0,00 \pm 0,00	0,00	0,22 \pm 0,67	0,00
Parabasalzellen	17,89 \pm 47,40	2,00	18,22 \pm 45,18	0,00
Intermediärzellen	92,00 \pm 83,69	42,00	87,67 \pm 86,61	60,00
Superfizialzellen	66,11 \pm 71,10	42,00	67,44 \pm 70,27	66,00
Schollen	18,22 \pm 29,38	6,00	25,89 \pm 39,29	1,00
Keratinisierte Zellen	5,56 \pm 3,88	5,00	0,22 \pm 0,44	0,00

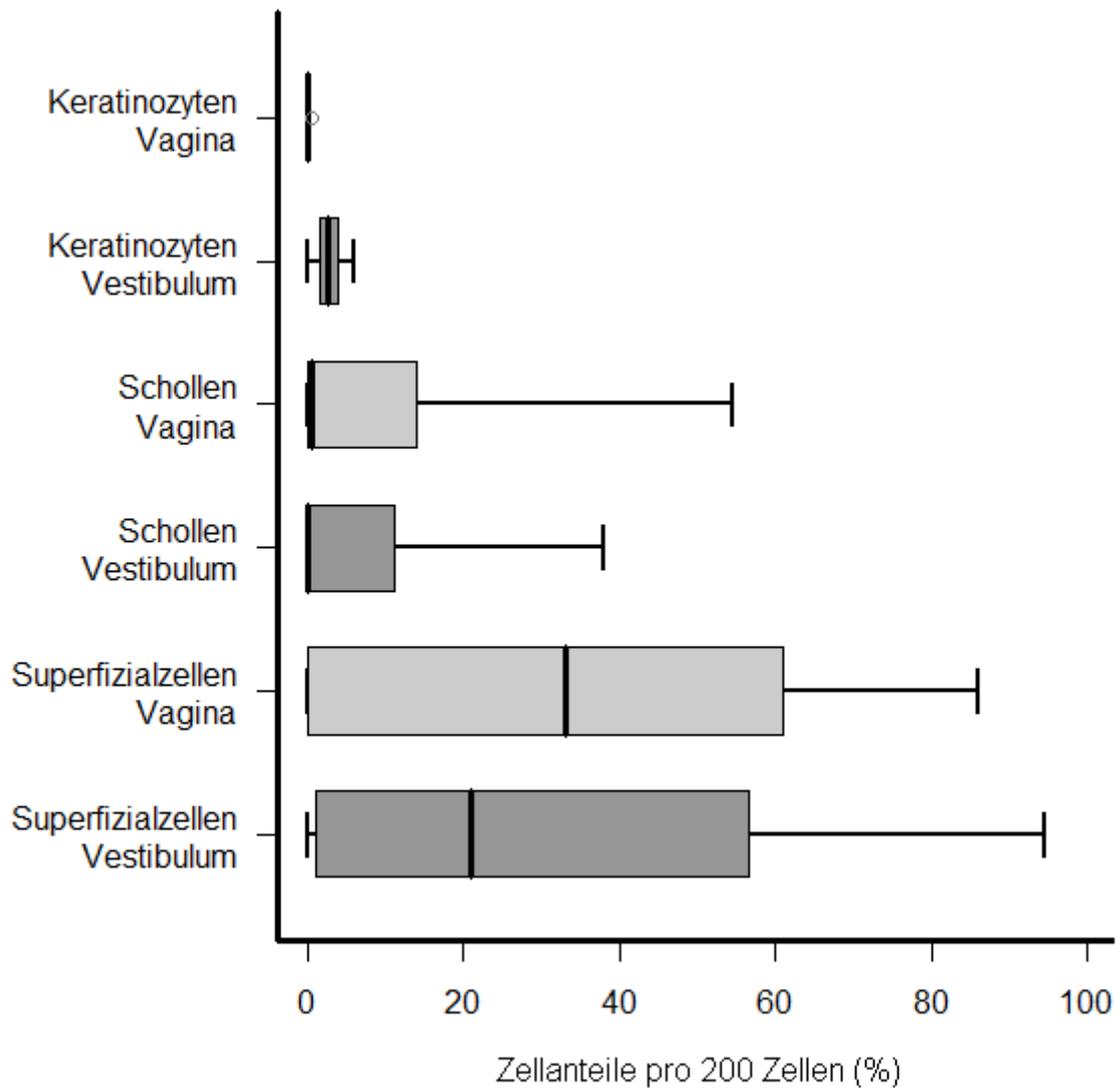


Abbildung 18: Darstellung der Zellanteile pro 200 Zellen an den unterschiedlichen Entnahmeorten Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Metöstrus (n = 9). Darstellung der Superfizialzellen, Schollen und keratinisierten Zellen im Box-and-Whisker-Plot. Statistisch signifikante Unterschiede waren nur für die keratinisierten Zellen nachweisbar.

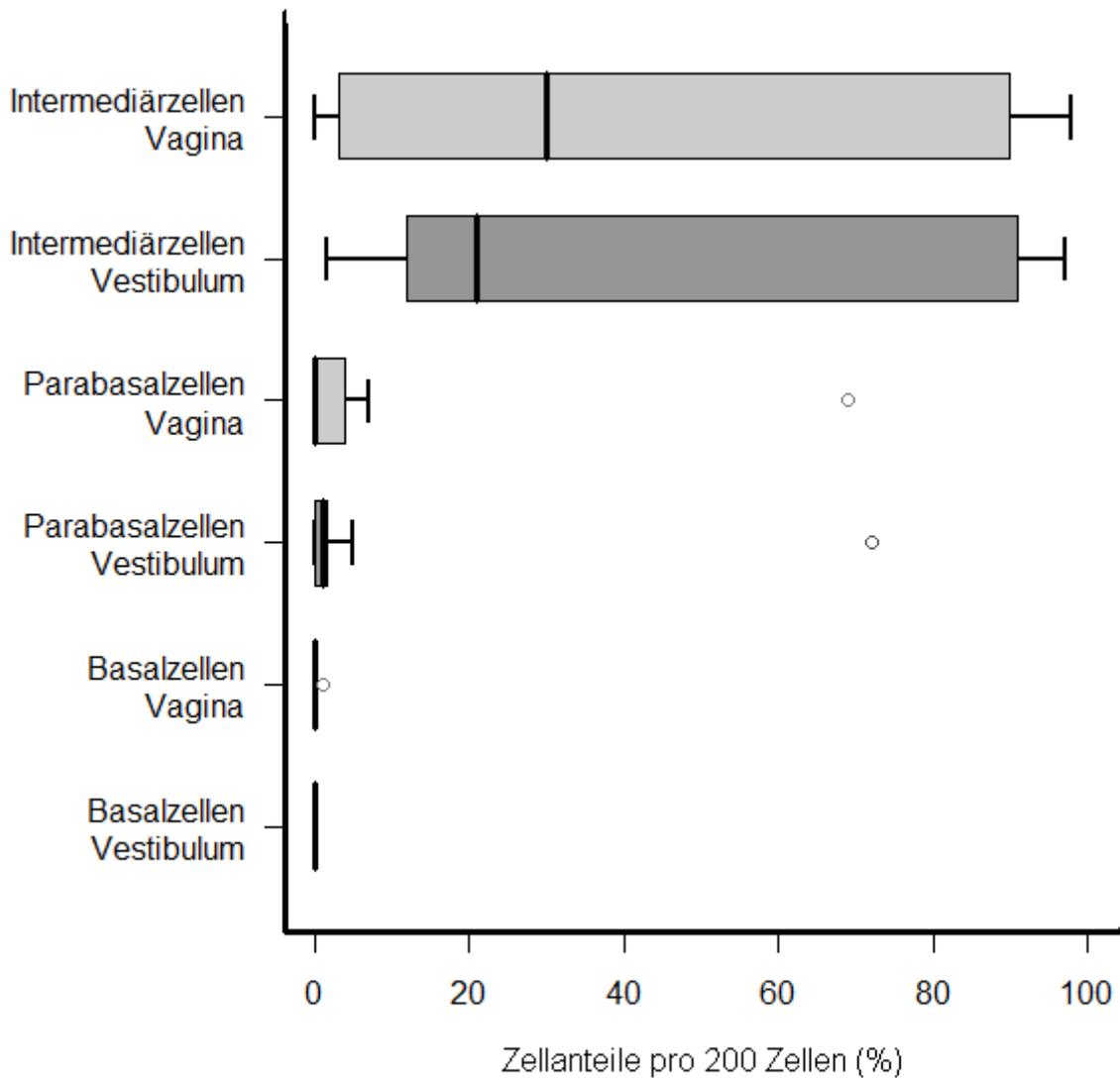


Abbildung 19: Darstellung der Zellanteile pro 200 Zellen an den unterschiedlichen Entnahmeorten Vagina und Vestibulum bei Hündinnen im Metöstrus (n = 9). Darstellung der Anteile der Intermediärzellen, Parabasalzellen und Basalzellen im Box-and-Whisker-Plot. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Bakterien-, Sekret- und Detritusvorkommen wiesen bei den gepaarten Proben bei metöstrischen Hündinnen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ($p > 0,05$). Gleiches galt für das Vorkommen von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten. Eine statistisch signifikante positive Korrelation konnte nur bei neutrophilen Granulozyten und knapp bei Erythrozyten bewiesen werden (Anhang Tabelle 39).

Hündinnen im Anöstrus

Bei zwei Hündinnen (4 %) wurde eine Plasmalogesteronkonzentration unter 0,5 ng / ml gemessen. Diese Hündinnen konnten anhand der Anamnese und des niedrigen Progesteronwertes eindeutig dem Anöstrus zugeordnet werden. Bei beiden Tieren präsentierten die exfoliierten Zytologien aus Vestibulum und Vagina ein anöstrisches Zellbild (Abbildung 20).

Eine statistische Auswertung der Parameter Detritus, Sekret, Bakterien und Vorkommen von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten konnte auf Grund der kleinen Probenanzahl nicht durchgeführt werden.

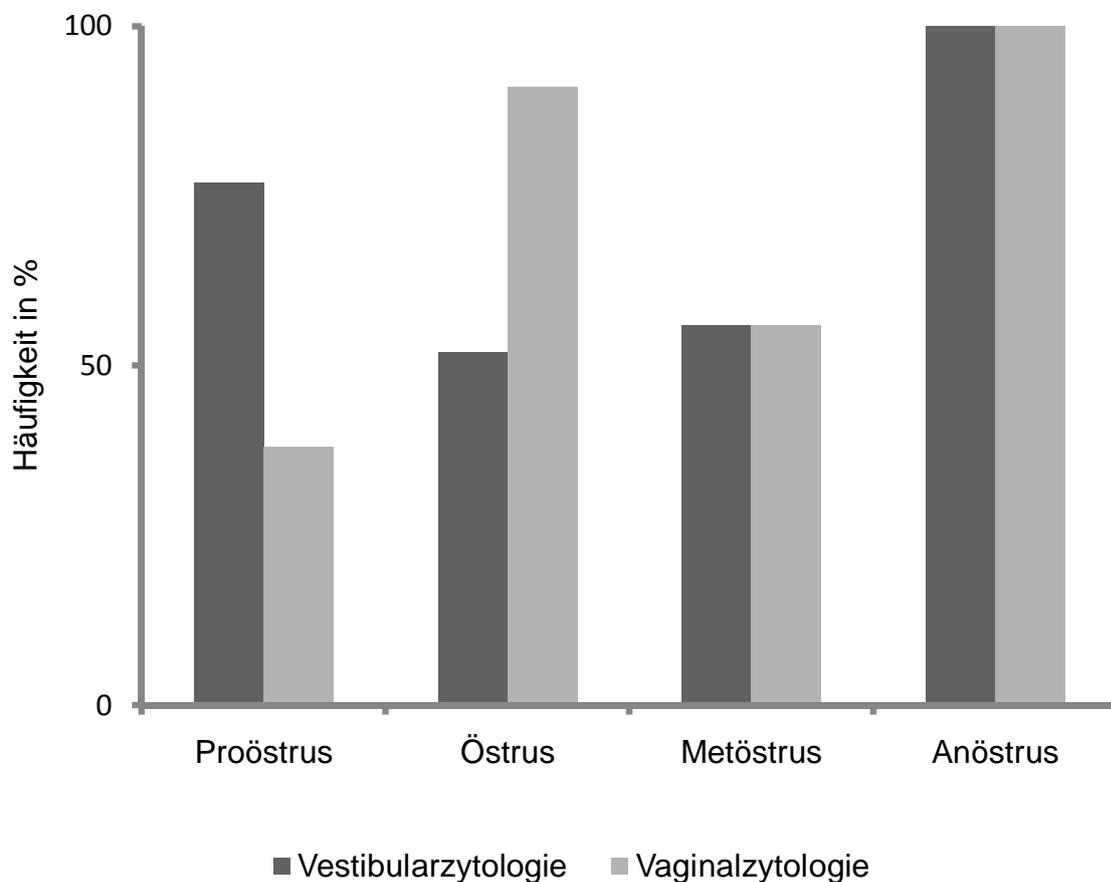


Abbildung 20: Absolute Häufigkeit der Übereinstimmungen von Vestibular- und Vaginalzytologien mit den dazugehörigen Plasmalogesteronkonzentrationen bei 47 Hündinnen.

4.2 Einfluss von trockenen und feuchten Tupfern

4.2.1 Zytologische Auswertung

Epithelzellen

Von insgesamt 106 Hündinnen wurden gepaarte Proben mit jeweils einem trockenen und einem feuchten Tupfer entnommen. Alle Ausstriche waren auswertbar. Die angefertigten Zytologien wurden auf Übereinstimmungen in Bezug auf vorkommende Zellarten und Ausstrichparameter untersucht. Bei drei Hündinnen (3 %) konnten übereinstimmend Basalzellen in beiden Ausstrichen nachgewiesen werden. 97 (92 %) Probenpaare präsentierten übereinstimmend keine Basalzellen. Bei sechs (6 %) Hündinnen wurden Basalzellen entweder in den feucht oder in den trocken entnommenen Zytologien detektiert. Parabasalzellen konnten übereinstimmend in 40 (38 %) Probenpaaren gefunden werden. Bei 58 (55 %) Hündinnen wurden sowohl in den trockenen Ausstrichen als auch in den feuchten Ausstrichen keine Parabasalzellen nachgewiesen. Acht (8 %) Hündinnen präsentierten Parabasalzellen in den feucht oder in den trocken angefertigten Zytologien. Intermediärzellen waren in 81 (76 %) Ausstrichpaaren vorhanden. 15 (14 %) Hündinnen hatten in beiden Ausstrichen übereinstimmend keine Intermediärzellen. Bei zehn (9 %) Tieren lagen Intermediärzellen entweder im trockenen oder im feuchten Ausstrich vor. Ein Nachweis von Superfizialzellen konnte bei 78 (74 %) Hündinnen erbracht werden. Bei 20 (19 %) Probenpaaren waren keine Superfizialzellen vorhanden. Acht (8 %) Hündinnen präsentierten Superfizialzellen entweder ausschließlich im trockenen oder im feuchten Ausstrich. Schollen konnten in 56 (53 %) Ausstrichpaaren detektiert werden. Keine Schollen zeigten die Probenpaare von 45 (42 %) Hündinnen. Bei fünf (5 %) Ausstrichpaaren lagen keine Übereinstimmungen in Bezug auf das Vorhandensein von Schollen vor. Keratinisierte Zellen wurden bei fünf (5 %) Hündinnen in beiden Ausstrichen nachgewiesen. Zu einer übereinstimmenden Abwesenheit von keratinisierten Zellen kam es bei 77 (73 %) Hündinnen. Keratinisierte Zellen lagen bei 24 (23 %) Hündinnen entweder im trocken oder im feucht angefertigten Ausstrich vor (Tabelle 19).

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Menge der vorkommenden Zellen konnte nur bei Intermediärzellen ($p = 0,02$) nachgewiesen werden (Tabelle 20). In

den trocken entnommenen Zytologien wurden mehr Intermediärzellen detektiert. Bei Betrachtung der Korrelation wurde bei fast allen Zellarten eine statistisch signifikante positive Korrelation festgestellt ($r_s = 0,48$; $p < 0,001$) (Anhang Tabelle 40). Alleinige Ausnahme waren die keratinisierten Zellen, die eine nur schwach positive Korrelation aufwiesen, die nicht signifikant war und somit rein zufällig bedingt sein konnte ($r_s = 0,14$; $p = 0,15$).

Tabelle 19: Anzahl der Ausstrichpaare (trockener Tupfer - feuchter Tupfer) mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Basal- (BZ), Parabasal- (PZ), Intermediär- (IZ), Superficialzellen (SZ), Schollen (Sch) und keratinisierten Zellen (KZ) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen ($n = 106$).

Zellart	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
BZ	3 (3)	97 (92)	100 (94)	6 (6)	106 (100)
PZ	40 (38)	58 (55)	98 (92)	8 (8)	106 (100)
IZ	81 (76)	15 (14)	96 (91)	10 (9)	106 (100)
SZ	78 (74)	20 (19)	98 (92)	8 (8)	106 (100)
Sch	56 (53)	45 (42)	101 (95)	5 (5)	106 (100)
KZ	5 (5)	77 (73)	82 (77)	24 (23)	106 (100)

Ergebnisse

Tabelle 20: Vergleich des Zellvorkommens der Basal-, Parabasal-, Intermediär- und Superfizialzellen sowie Schollen und keratinisierten Zellen nach Entnahme mit zwei unterschiedlichen Tupfern (trocken . feucht). Die Hündinnen (n = 106) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Dargestellt sind die p-Werte. Statistische signifikante Unterschiede konnten ausschließlich bei den Intermediärzellen nachgewiesen werden ($p = 0,02$).

	Basal- zellen	Parabasal- zellen	Intermediär- zellen	Superfizial- zellen	Schollen	Keratinisierte Zellen
p- Wert	1,0	0,35	0,02	0,87	0,11	0,52

Zellmenge pro Gesichtsfeld

Die durchschnittliche Anzahl der Epithelzellen pro Gesichtsfeld betrug bei Zytologien nach Entnahme mit einem trockenen Tupfer $13,46 \pm 7,11$ (Median 10). Bei der Probenentnahme mit einem feuchten Tupfer konnten im Durchschnitt mehr Zellen gewonnen werden. Hier lag der Wert bei $17,27 \pm 9,59$ Zellen (Median 15) pro Gesichtsfeld (Abbildung 21, Tabelle 21). Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Ebenso lag eine hochsignifikante positive Korrelation zwischen beiden Entnahmemethoden vor ($r_s = 0,71$, $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

Tabelle 21: Epithelzellen pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (x_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Entnahmemethode	$x_a \pm SA$ Epithelzellen / GF	Median
Tupfer trocken	$13,46 \pm 7,11$	10
Tupfer feucht	$17,27 \pm 9,59$	15

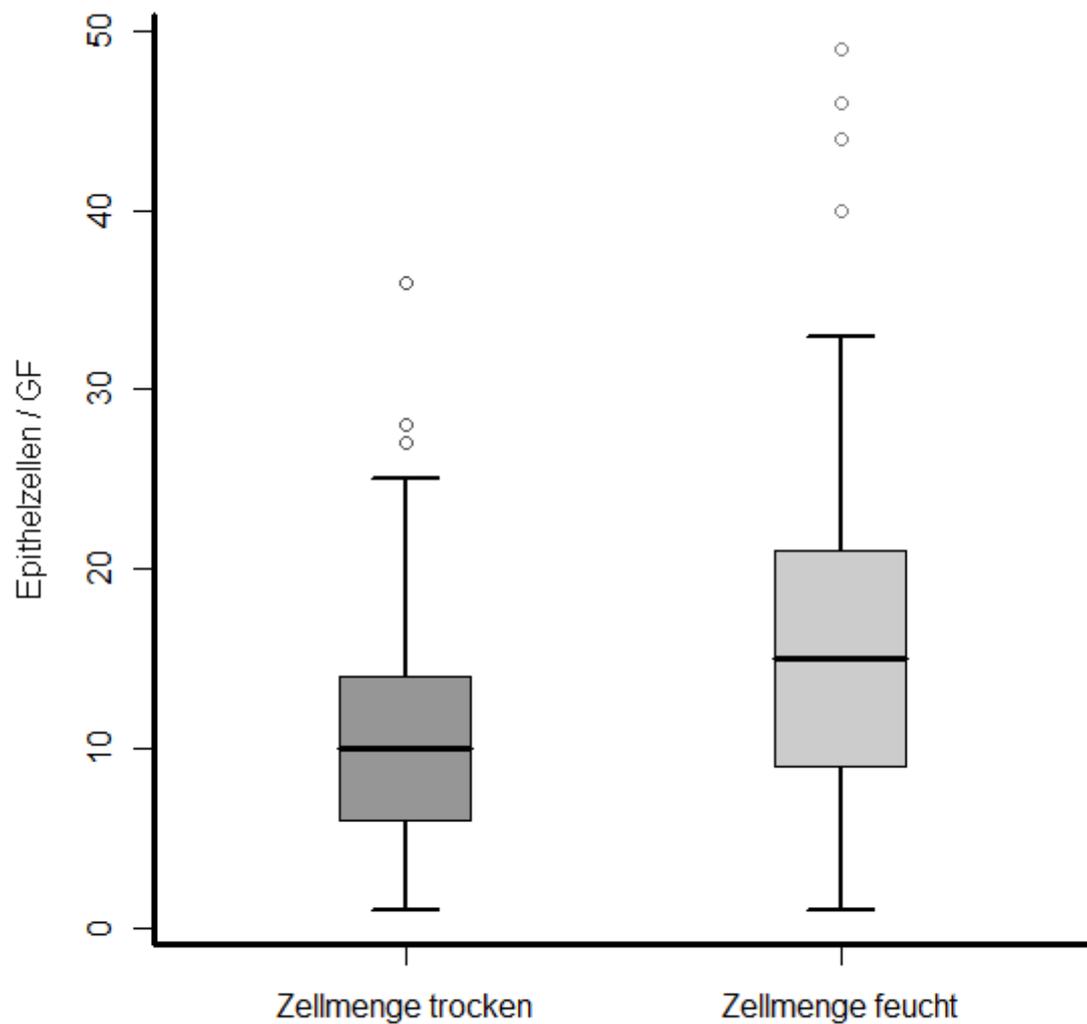


Abbildung 21: Epithelzellen pro Gesichtsfeld (GF) nach Entnahme mit trockenen und feuchten Tupfern ($n = 106$), dargestellt als Box-and-Whisker-Plot. Es existierten statistisch hochsignifikante Unterschiede.

Vergleichend untersucht wurden zusätzlich die Parameter Detritus, Sekret und Zellverteilung, sowie der Nachweis von Bakterien, neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten, freiliegenden Zellkernen und von Artefakten in Form von Wattefäden.

Erythrozyten und neutrophile Granulozyten

Erythrozyten konnten bei 43 (41 %) Hündinnen sowohl nach Entnahme mit trockenen als auch mit feuchten Tupfern dargestellt werden. Bei 45 (42 %) Hündinnen waren übereinstimmend keine Erythrozyten vorhanden. 18 (17 %) Probenpaare blieben ohne Übereinstimmung. In insgesamt 52 (49 %) trockenen Ausstrichen wurden Erythrozyten nachgewiesen. Bei einer Entnahme mit einem feuchten Tupfer waren es 53 (50 %) positive Proben (Tabelle 22).

Zytologien mit mehr als 50 Erythrozyten pro Gesichtsfeld kamen bei der Entnahme mit trockenen Tupfern bei vier (4 %) Hündinnen vor. Bei der feuchten Tupferprobenentnahme waren es fünf (5 %) Ausstriche mit so einer hohen Erythrozytenzahl. Eine mittlere Anzahl von Erythrozyten (10 bis 50 Zellen pro Gesichtsfeld) konnte bei der trockenen Methode bei zwölf (11 %) Hündinnen dargestellt werden. Bei der feuchten Probenentnahme waren es vier (4 %) Hündinnen mit einer mittleren Erythrozytenzahl und 44 (42 %) Hündinnen mit einer niedrigen Erythrozytenzahl (weniger als 10 Zellen pro Gesichtsfeld). Geringe Mengen von Erythrozyten konnten mit der trockenen Methode bei 36 (34 %) Hündinnen detektiert werden (Abbildung 22). Zwischen den beiden Entnahmemethoden bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Erythrozytenmenge ($p = 0,43$) (Tabelle 24). Bei Betrachtung einer möglichen positiven Korrelation zwischen den unterschiedlichen Entnahmemethoden bestätigte sich diese als hochsignifikant ($r_s = 0,67$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

Eine Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten lag bei 66 (62 %) Probenpaaren vor. Bei 31 (29 %) Hündinnen konnten neutrophile Granulozyten detektiert werden und neun (8 %) Hündinnen zeigten kein übereinstimmendes Ergebnis. Neutrophile Granulozyten waren mit 38 (36 %) positiven Proben bei den Trockenausstrichen häufiger vorhanden als bei der feuchten Entnahmemethode. Hier waren in 32 (30%) Ausstrichen neutrophile Granulozyten nachweisbar (Tabelle 22).

Mehr als 25 neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld zeigten jeweils sechs (6 %) trocken und feucht entnommene Zytologien. Die Zahl der Ausstriche mit 5 bis 25 neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld lag ebenfalls in beiden Ausstrichgruppen bei sechs (6 %) Proben. Bei 26 (25 %) Hündinnen wurde nach Entnahme mit einem trockenen Tupfer eine geringe Menge neutrophiler Granulozyten (bis zu fünf pro Gesichtsfeld) nachgewiesen. Bei der Entnahme mit einem feuchten Tupfer waren es

20 (19 %) Hündinnen (Abbildung 23). Ein Unterschied im Vorkommen der neutrophilen Granulozyten in den zwei Ausstrichmethoden konnte statistisch nicht belegt werden ($p = 0,2$) (Tabelle 24). Eine positive Korrelation zwischen beiden Entnahmemethoden wurde statistisch bewiesen ($r_s = 0,8$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

Tabelle 22: Anzahl der Ausstrichpaare (Tupfer trocken . Tupfer feucht) mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Erythrozyten (Ery) und neutrophilen Granulozyten (NG) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen ($n = 106$).

Zellart	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
Ery	43 (41 %)	45 (42 %)	88 (83 %)	18 (17 %)	106 (100 %)
NG	31 (29 %)	66 (62 %)	97 (92 %)	9 (8 %)	106 (100 %)

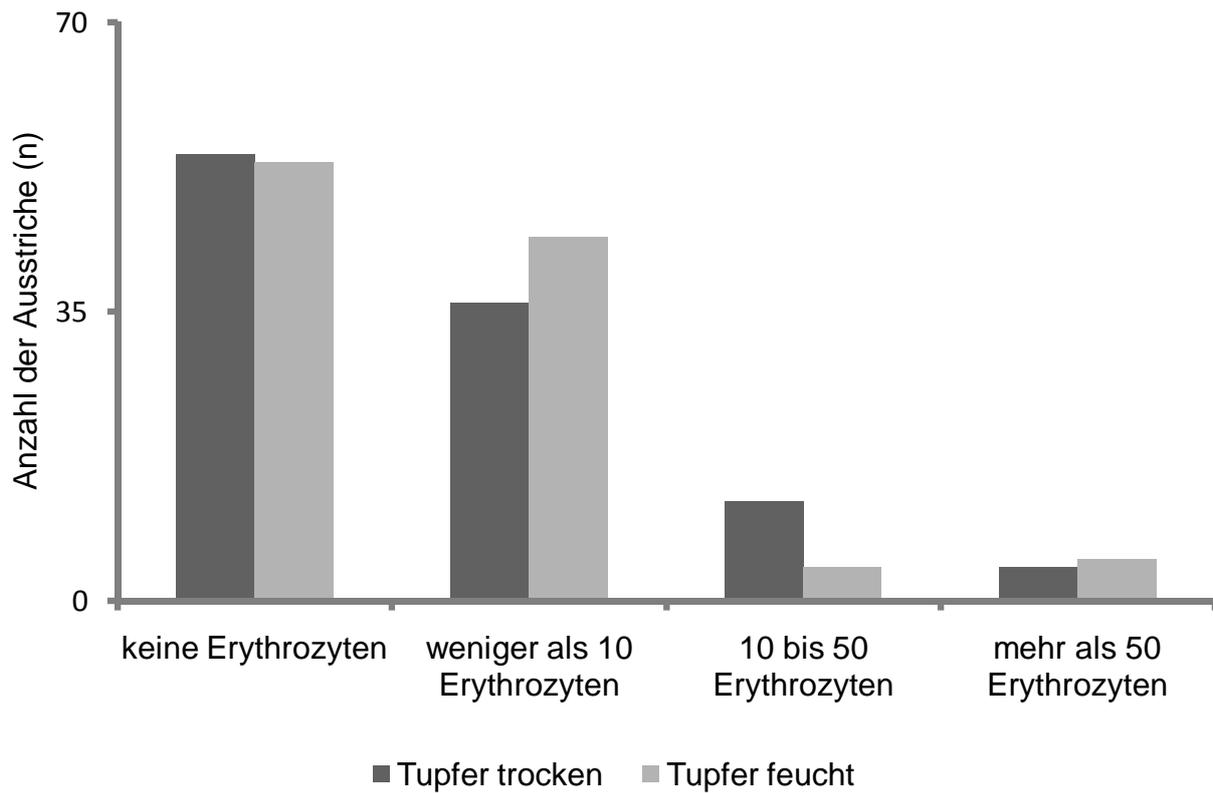


Abbildung 22: Einteilung der trockenen Ausstriche (n = 106) und feuchten Ausstriche (n = 106) Ausstriche nach unterschiedlich starkem Gehalt an Erythrozyten pro Gesichtsfeld. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

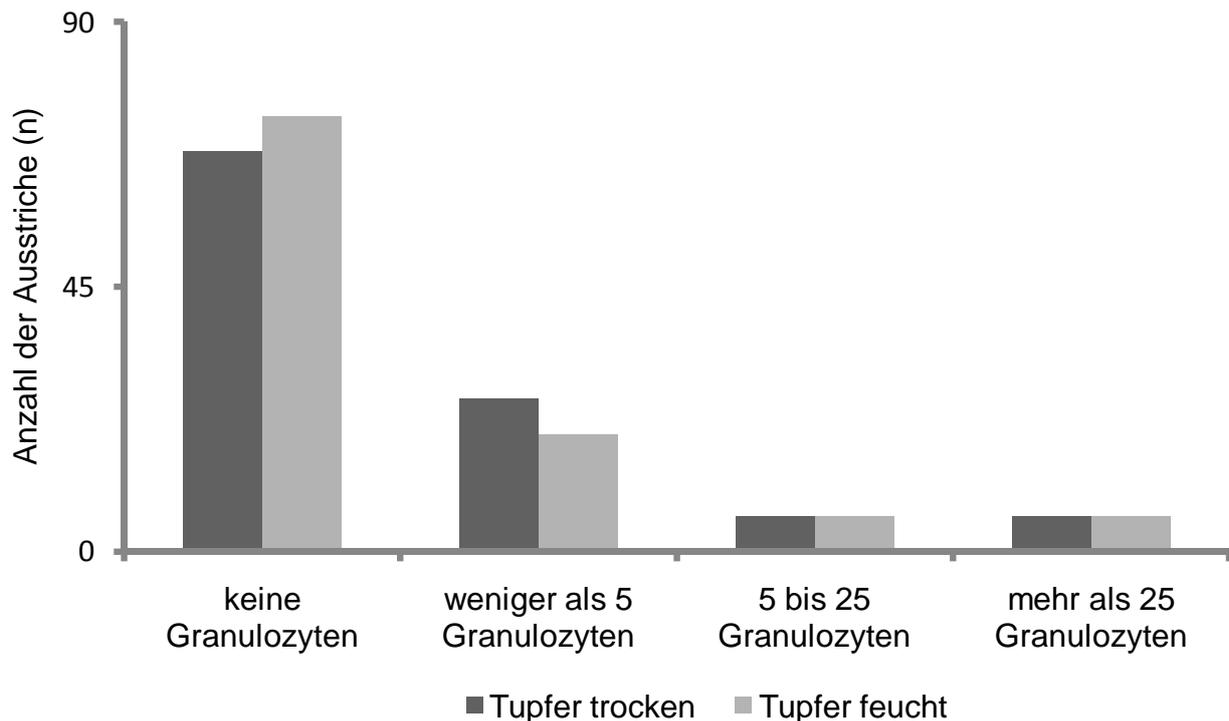


Abbildung 23: Einteilung der trockenen Ausstriche (n = 106) und feuchten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

Bakterien

In 65 (61 %) Probenpaaren konnten übereinstimmend Bakterien dargestellt werden. Keine Bakterien wurden übereinstimmend bei 23 (22 %) Hündinnen gefunden und ohne Übereinstimmung blieben die Ausstrichpaare von 18 (17 %) Hündinnen (Tabelle 23).

In 78 (74 %) trocken entnommenen Ausstrichen konnten Bakterien nachgewiesen werden. Bei der feuchten Entnahmemethode waren es dagegen nur 70 (66 %) positive Zytologien.

Nach Entnahme mit einem trockenen Tupfer wiesen zwölf (11 %) Ausstriche eine hohe Anzahl an Bakterienkolonien auf. Ein mittleres Bakterienvorkommen zeigten 32 (30 %) Proben und 34 (32 %) Ausstriche wiesen ein geringes Vorkommen von Bakterien auf. Bei der Probenentnahme mit einem feuchten Tupfer konnte nur bei

Ergebnisse

fünf (5 %) Hündinnen ein hoher Bakteriengehalt detektiert werden. 15 (14 %) Hündinnen zeigten einen mittleren Bakteriengehalt und bei 50 (47 %) Hündinnen waren es geringe Bakterienmengen, die gefunden wurden (Abbildung 24). Die Menge an Bakterien in den Ausstrichen unterscheidet sich hochsignifikant ($p < 0,0001$) (Tabelle 24). In den trockenen Ausstrichen konnten deutlich mehr Bakterien nachgewiesen werden. Bei Betrachtung einer möglichen positiven Korrelation stellte sich diese als hochsignifikant dar ($r_s = 0,7$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

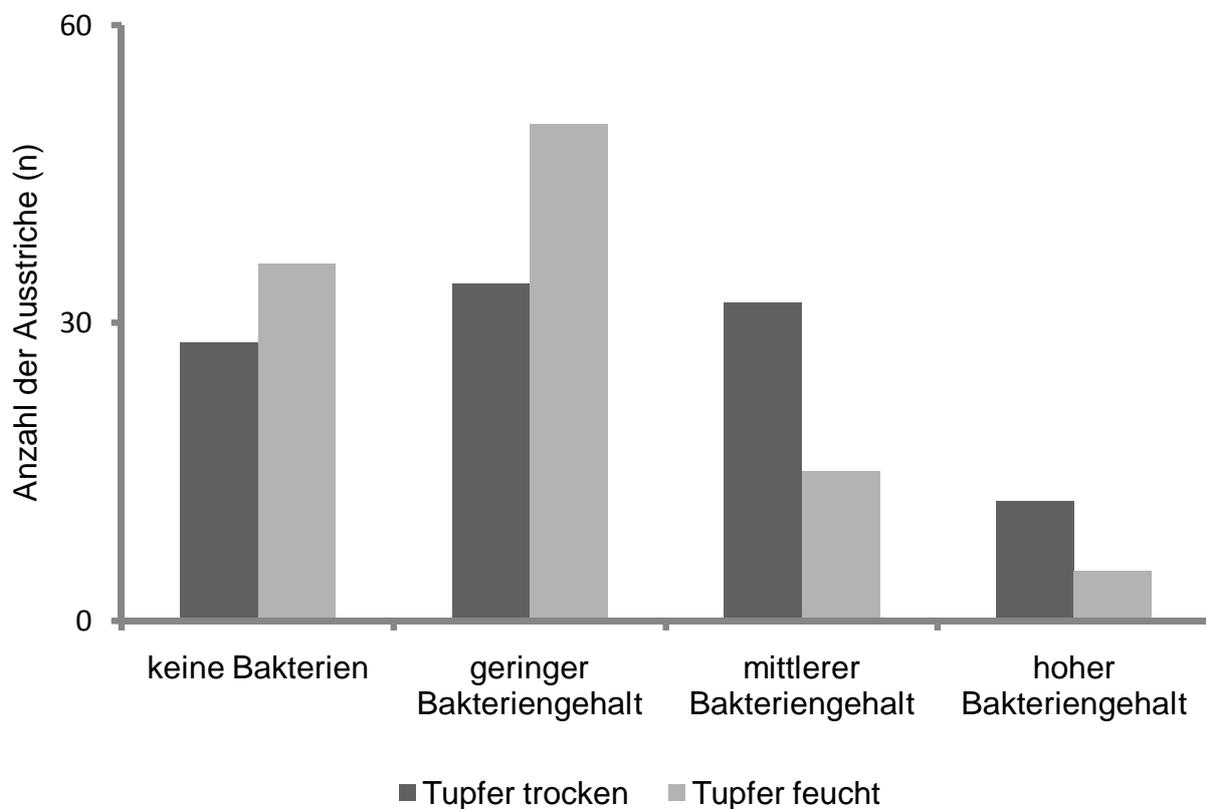


Abbildung 24: Einteilung der trockenen Ausstriche ($n = 106$) und feuchten Ausstriche ($n = 106$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Bakterienkolonien. In den trockenen entnommenen Zytologien konnten statistisch hochsignifikant mehr Bakterien nachgewiesen werden ($p < 0,0001$).

Sekret

Von den 106 Hündinnen zeigten 60 (57 %) Hündinnen in ihren Ausstrichen keine Sekretpuren. Bei 15 (14 %) Hündinnen war übereinstimmend in beiden Ausstrichen Sekret darstellbar und bei 31 (29 %) Ausstrichpaaren blieb eine Übereinstimmung aus (Tabelle 23). Insgesamt wiesen 41 (39 %) Proben nach trockener Entnahme Sekret auf. Bei den Zytologien nach feuchter Tupferprobenentnahme waren es hingegen nur 20 (19 %) Ausstriche.

Drei (3 %) trocken angefertigte Zytologien präsentierten einen hohen Sekretgehalt. Einen mittleren Sekretgehalt zeigten 14 (13 %) Ausstriche und nur wenig Sekret war bei 24 (23 %) Proben darstellbar. Bei den feucht angefertigten Ausstrichen gab es keine Proben mit einem hohen Sekretgehalt. Fünf (5 %) Ausstriche wiesen einen mittleren Gehalt auf und 15 (14 %) Ausstriche präsentierten geringe Sekretmengen (Abbildung 25). In den trocken entnommenen Tupferproben war statistisch hochsignifikant häufiger Sekret vorhanden ($p < 0,0001$). Es lag eine positive, hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Tupfervarianten vor ($r_s = 0,38$; $p = 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

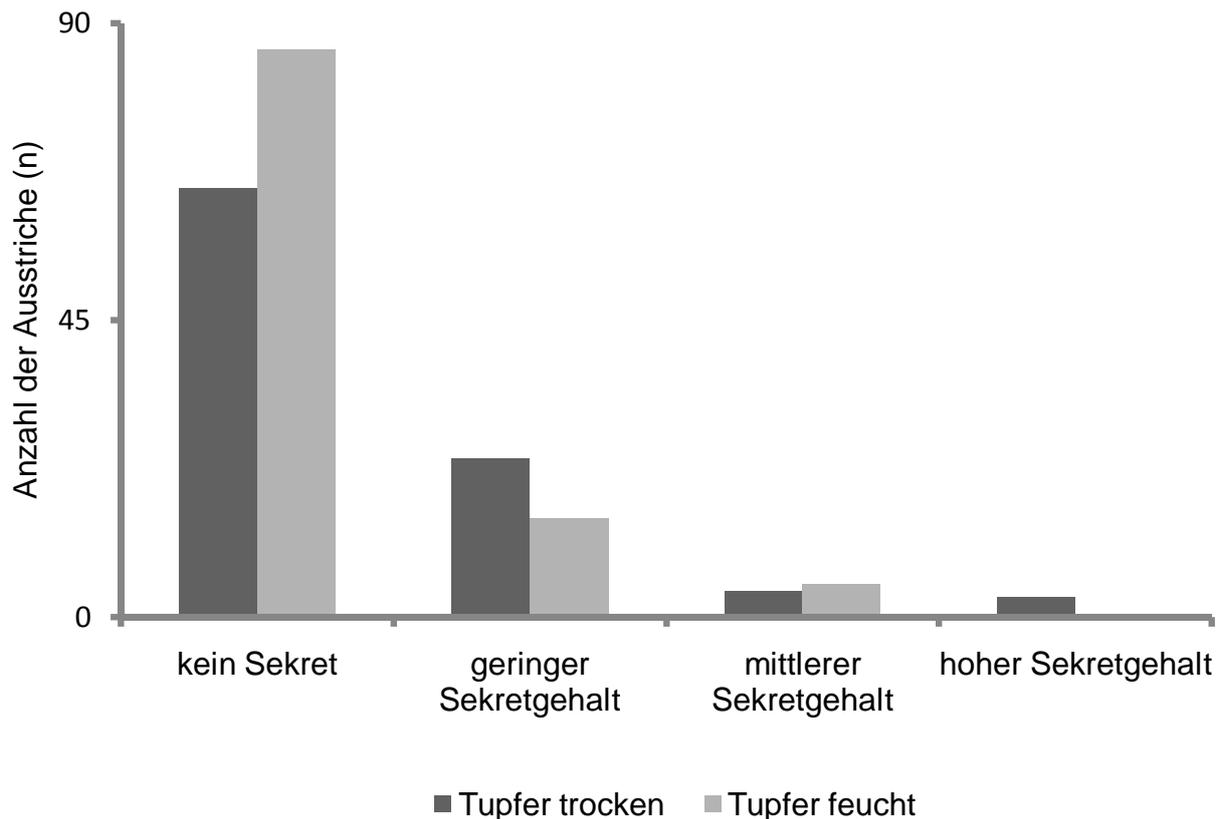


Abbildung 25: Einteilung der trockenen Ausstriche (n = 106) und feuchten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Sekret. In den trocken entnommenen Zytologien war hochsignifikant mehr Sekret vorhanden ($p < 0,0001$).

Detritus

Von den 106 Hündinnen waren bei 66 (62 %) Tieren in beiden Ausstrichen Detritusmengen vorhanden. Keine Übereinstimmung lag bei 20 (19 %) Hündinnen vor (Tabelle 23). Hier zeigten nur die Proben Detritus, die mit einem trockenen Tupfer entnommen wurden. Die feucht entnommenen Zytologien waren jedoch frei von Detritus. Bei 20 (19 %) Hündinnen waren in beiden Ausstrichmethoden kein Detritus zu finden. Bei den mit einem trockenen Tupfer gewonnen Proben gab es insgesamt 85 (80 %) positive Ausstriche. Bei den feucht entnommenen Tupferproben waren es hingegen nur 67 (63 %) positive Proben, in denen Detritus nachgewiesen wurde. Der Gehalt der Detritusmenge war bei den trockenen angefertigten Ausstrichen deutlich höher ($p < 0,0001$) (Abbildung 26, Tabelle 24). Eine Korrelation der beiden

Entnahmemethoden stellte sich eindeutig positiv dar und war hochsignifikant ($r_s = 0,77$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

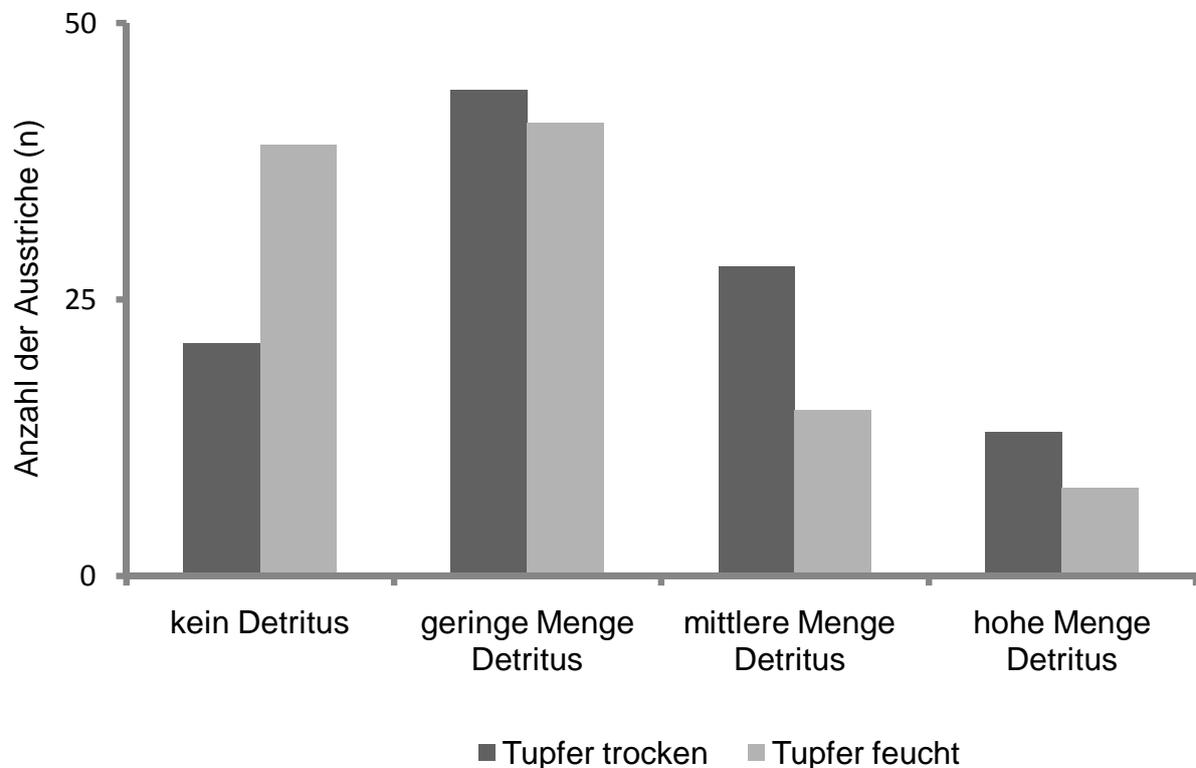


Abbildung 26: Einteilung der trockenen Ausstriche ($n = 106$) und feuchten Ausstriche ($n = 106$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Detritus. Es existieren statistisch hochsignifikante Unterschiede. In den trocken entnommenen Zytologien war hochsignifikant mehr Detritus vorhanden ($p < 0,0001$).

Wattefäden (Artefakte)

In 49 (46 %) trocken entnommenen Ausstrichen konnten Wattefäden nachgewiesen werden. Bei den feucht entnommenen Ausstrichen waren es 16 (15 %) Zytologien, die Wattefäden enthielten (Tabelle 23). Einen hochgradigen Gehalt von Wattefäden wiesen 13 (12 %) Ausstriche auf, die allesamt trocken entnommen wurden. Neun (9 %) trockene Zytologien zeigten einen mittelgradigen Gehalt und 27 (25 %) Ausstriche einen geringgradigen Gehalt an Wattefäden. Hündinnen, bei denen die

Ergebnisse

Zytologien mit feuchten Tupfern gewonnen wurden, hatten nur in einer (1 %) Probe einen mittelgradigen Gehalt und in 16 (15 %) Proben einen geringgradigen Gehalt an Wattefäden vorzuweisen (Abbildung 27). Es konnte statistisch bewiesen werden, dass der Gehalt an Wattefäden in den trocken angefertigten Ausstrichen deutlich höher ist ($p < 0,0001$) (Tabelle 24). Eine schwach positive Korrelation zwischen beiden Entnahmemethoden wurde nachgewiesen ($r_s = 0,51$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

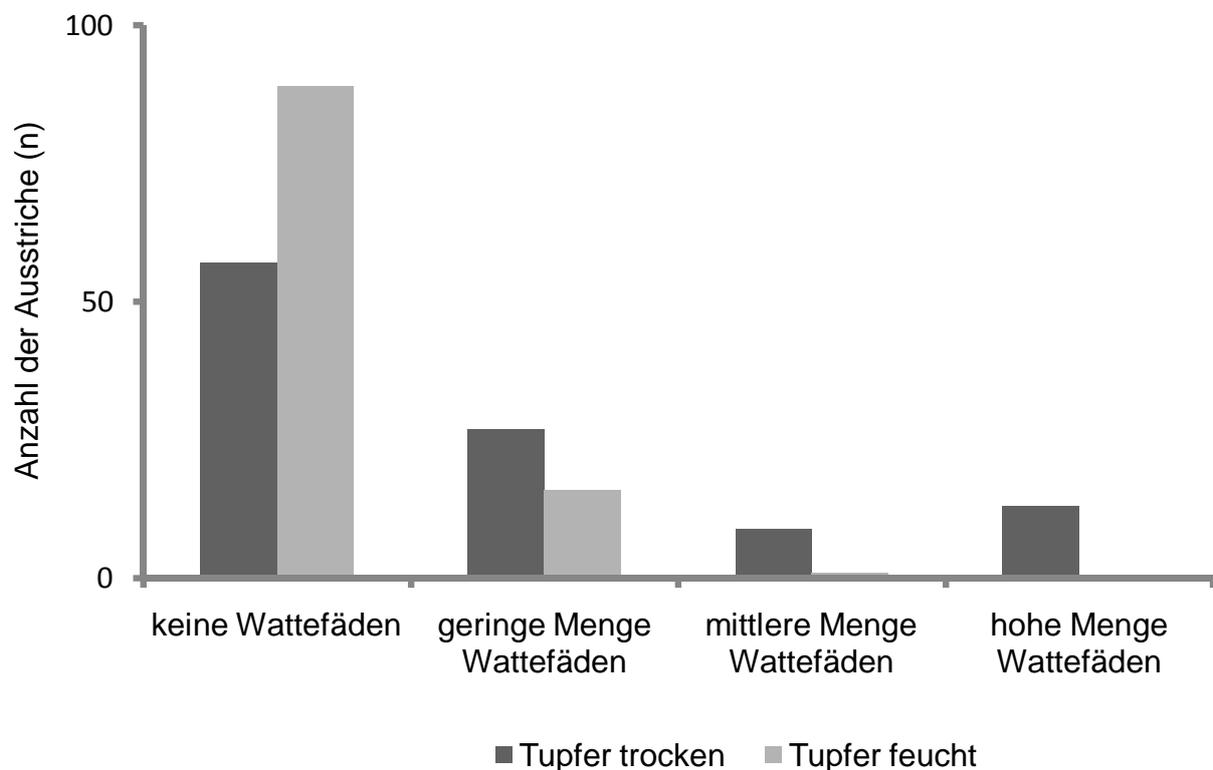


Abbildung 27: Einteilung der trockenen Ausstriche (n = 106) und feuchten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Wattefäden. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$).

Freie Zellkerne

Übereinstimmend konnten in 24 (23 %) Ausstrichpaaren freie Zellkerne nachgewiesen werden. Bei 64 (60 %) Hündinnen wurden in beiden Ausstrichen keine freien Zellkerne gefunden. 18 (17 %) gepaarte Ausstrichproben blieben ohne Übereinstimmung (Tabelle 23).

In 80 (75 %) trocken entnommenen Ausstrichen wurden keine freien Zellkerne gefunden, bei den feucht entnommenen Tupfern waren es 66 (62 %) Proben ohne frei vorliegende Zellkerne. Geringgradige Mengen konnten in 17 (16 %) trockenen Ausstrichen und 23 (22 %) feuchten Ausstrichen nachgewiesen werden. Ein mittelgradiger Gehalt an frei liegenden Zellkernen war bei sieben (7 %) Zytologien nach trockener und bei acht (8 %) Zytologien nach feuchter Entnahme zu beobachten. Nur zwei trockene Ausstriche hatten einen hochgradigen Gehalt an freien Zellkernen. Bei den feucht entnommenen Zytologien waren es dagegen neun (8 %) Proben. Es konnte statistisch bewiesen werden, dass die Menge der frei vorkommenden Zellkerne in den feucht entnommenen Zytologien signifikant höher war ($p = 0,0002$) (Tabelle 24). Bei Betrachtung einer möglichen positiven Korrelation stellte sich diese als hochsignifikant dar ($r_s = 0,68$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 40).

Ergebnisse

Tabelle 23: Anzahl der Ausstrichpaare mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf das Vorkommen von Bakterien (Bakt), Sekret (Sek), Detritus (Det), Wattefäden (Wat) und freier Zellkerne (FZK) sowie die relative Häufigkeit der Ausstriche in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 106).

Parameter	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt		
Bakt	65 (61)	23 (22)	88 (83)	18 (17)	106 (100)
Sek	15 (14)	60 (57)	75 (71)	31 (29)	106 (100)
Det	66 (62)	20 (19)	86 (81)	20 (19)	106 (100)
Wat	16 (15)	57 (54)	73 (69)	33 (31)	106 (100)
FZK	24 (23)	64 (60)	88 (83)	18 (17)	106 (100)

Tabelle 24: Vergleich des Vorkommens der Parameter Sekret (Sek), Detritus (Det), Wattefäden (Wat), freiliegende Zellkerne (FZK), sowie Erythrozyten (Ery), neutrophile Granulozyten (NG) und Bakterien (Bak) nach Entnahme mit zwei unterschiedlichen Tupfern. Die Hündinnen (n = 106) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Dargestellt sind die p-Werte. Statistische signifikante Unterschiede konnten nur bei den Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

	Ery	NG	Bakt	Sek	Det	Wat	FZK
p-Wert	0,43	0,20	< 0,0001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0002

Zellverteilung

In 74 (70 %) gepaarten Zytologien zeigte sich ein identisches Muster der Zellverteilung. Die anderen Hündinnen (30 %) präsentierten in den trockenen und feuchten Ausstrichen jeweils unterschiedliche Zellverteilungsmuster (Abbildung 28). Einzeln lagen die Zellen in 63 (59 %) trockenen entnommenen Proben und in 49 (46 %) feuchten Ausstrichen vor. Zellen, die mit anderen Zellen in einem Verband zusammengelagert waren, zeigten sich in 13 (12 %) trockenen und in zwölf (11 %) feucht entnommenen Proben. Eine beginnende Nesterbildung konnte bei 19 (18 %) Ausstrichen mit trockenen Tupfern und bei 29 (27 %) Ausstrichen mit feuchten Tupfern detektiert werden. Eine deutliche Nesterbildung wurde bei elf (10 %) trockenen und 16 (15 %) feuchten Ausstrichen nachgewiesen (Abbildung 28). Es lag eine signifikante Abweichungen von der Symmetrie vor ($p = 0,003$). Einzeln lagen die Zellen vermehrt nach Entnahme mit einem trockenen Tupfer vor, in Nesterformation traten sie häufiger nach feuchter Entnahme auf.

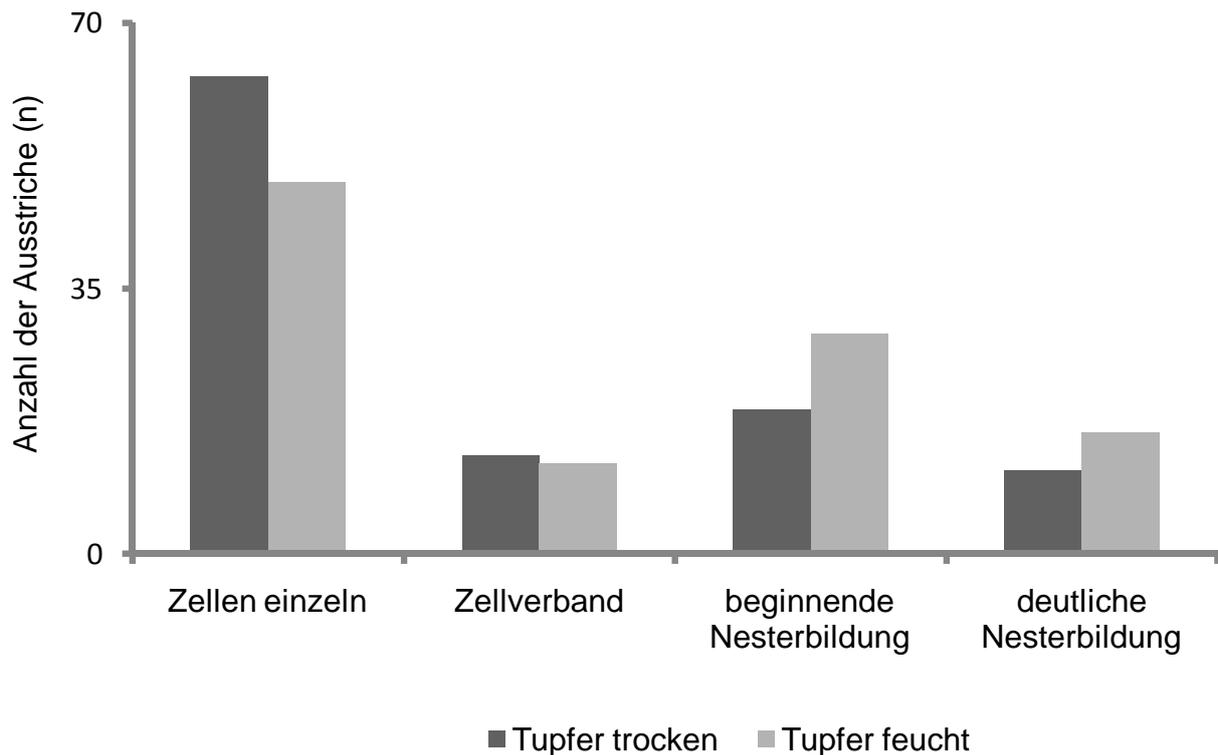


Abbildung 28: Einteilung der trockenen Ausstriche (n = 106) und feuchten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlichem Verteilungsmuster der Zellen im Ausstrich. Es konnten statistisch signifikante Unterschiede bewiesen werden ($p = 0,003$).

4.2.2 Zykluseinteilung

Von den insgesamt 106 Hündinnen präsentierten 104 Hündinnen (98 %) ein zytologisch identisches Zyklusbild (Tabelle 25).

Im zytologischen Proöstrus befanden sich 26 Hündinnen (25 %). Bei diesen Hündinnen präsentierte eine (1 %) Hündin in dem feucht entnommenen Ausstrich ein östrisches Zellbild. Alle anderen Zytologien zeigten identische Zyklusbilder.

47 (43 %) Hündinnen hatten ein östrisches Zellbild. Auch hier gab es nur eine Abweichung. Eine Hündin (1 %) hatte in der feucht entnommenen Zytologie ein proöstrisches Zellbild. Ein metöstrisches Zellbild lag bei 19 Hündinnen (18 %) vor. Hier stimmten die Zyklusaussagen der exfoliativen Zytologien nach Entnahme mit einem trockenen und einem feuchten Tupfer überein. 14 (13 %) Hündinnen wurden

anhand der Zytologien in den Anöstrus eingeteilt. Auch hier zeigten die gepaarten Proben übereinstimmend ein anöstrisches Zellbild (Tabelle 25).

Tabelle 25: Anzahl der Ausstrichpaare (n = 106) mit und ohne Übereinstimmung nach Einordnung in die entsprechenden Zyklusstadien.

	Übereinstimmung trocken . feucht (n)	Keine Übereinstimmung (n)	Gesamt (n)
Proöstrus	25	1	26
Östrus	46	1	47
Metöstrus	19	0	19
Anöstrus	14	0	14
Gesamt	104	2	106

4.3 Einfluss von unterschiedlichen Fixierungsmethoden

4.3.1 Ergebnisse der zytologischen Auswertung

Epithelzellen

Von 106 Hündinnen wurden gepaarte Zytologien entnommen, die nach Anfertigung mit einem Zytologiespray eingesprüht oder ohne sofortige Fixierung luftgetrocknet wurden. Die angefertigten Zytologien waren alle auswertbar und wurden auf Übereinstimmungen in Bezug auf vorkommende Zellarten und Ausstrichparameter untersucht. Basalzellen waren übereinstimmend in keiner der Proben nachweisbar. Bei dem Nachweis der Parabasalzellen zeigten 100 (94 %) Hündinnen Übereinstimmungen, wobei in 64 (60 %) der Ausstrichpaare keine Parabasalzellen detektiert werden konnten. In der Auswertung der Intermediärzellen wiesen 98 (92 %) der Hündinnen Übereinstimmungen auf. Bei 81 (76 %) Hündinnen wurden in beiden Ausstrichen Intermediärzellen nachgewiesen. Insgesamt 101 (95 %) Hündinnen zeigten Übereinstimmungen bei der Betrachtung der Superficialzellen. Eine Detektion von Superficialzellen fand bei 91 (86 %) gepaarter Ausstriche statt. Auch bei einem Nachweis der Schollen zeigten 101 (95 %) der Hündinnen Übereinstimmungen, wobei nur 56 (53 %) Ausstrichpaare positiv waren und Schollen präsentierten. Deutlich weniger Übereinstimmungen konnten bei der Auszählung der keratinisierten Zellen bewiesen werden. Hierbei blieben 24 (23 %) Hündinnen ohne Übereinstimmung (Tabelle 26).

Statistisch signifikante Unterschiede im Vorkommen der einzelnen Zellarten konnte bei den unterschiedlichen Fixierungsmethoden nicht gezeigt werden ($p = 0,12$) (Tabelle 27). Außer bei den Basalzellen und keratinisierten Zellen war bei allen anderen Zellarten eine deutliche positive Korrelation vorhanden ($r_s = 0,76$), die sich statistisch als hochsignifikant erwiesen hat ($p < 0,001$) (Anhang Tabelle 41).

Tabelle 26: Anzahl der Ausstrichpaare mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Basal- (BZ), Parabasal- (PZ), Intermediär- (IZ), Superfizialzellen (SZ), Schollen (Sch) und keratinisierten Zellen (KZ) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 106).

Zellart	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
BZ	0 (0)	106 (100)	106 (100)	0 (0)	106 (100)
PZ	36 (34 %)	64 (60)	100 (94)	6 (6)	106 (100)
IZ	81 (76)	17 (16)	98 (92)	8 (8)	106 (100)
SZ	91 (86)	10 (9)	101 (95)	5 (5)	106 (100)
Sch	56 (53)	45 (42)	101 (95)	5 (5)	106 (100)
KZ	7 (6)	75 (71)	82 (77)	24 (23)	106 (100)

Tabelle 27: Vergleich des Zellvorkommens der unterschiedlichen Zellarten nach zwei unterschiedlichen Fixierungsmethoden. Die Hündinnen (n = 106) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

	Basal- zellen	Parabasal- zellen	Intermediär- zellen	Superfizial- zellen	Schollen	Keratinisierte Zellen
p- Wert	1,0	0,17	0,12	0,25	0,73	0,25

Außer den Zellzahlen wurden die Parameter Detritus, Sekret, Zellmenge und Zellverteilung sowie das Vorkommen von Bakterien, neutrophilen Granulozyten, Erythrozyten und freiliegenden Zellkernen untersucht. Auch die Menge von Zellen, die nicht plan lagen sondern aufgerollte Zellränder präsentierten, wurde berücksichtigt.

Erythrozyten und neutrophile Granulozyten

Erythrozyten konnten bei 43 (41 %) Hündinnen sowohl in den sprayfixierten als auch in den luftgetrockneten Ausstrichen dargestellt werden. Bei 51 (48 %) Hündinnen waren übereinstimmend keine Erythrozyten vorhanden (Tabelle 28).

Zytologien mit mehr als 50 Erythrozyten pro Gesichtsfeld konnten bei den sprayfixierten Ausstrichen bei zwei (2 %) Hündinnen detektiert werden. Bei den luftgetrockneten Ausstrichen waren es drei (3 %) Hündinnen. Eine mittlere Anzahl von Erythrozyten (10 bis 50 Zellen pro Gesichtsfeld) wurden mit Sprayfixierung bei zehn (9 %) Hündinnen und mit Lufttrocknung bei zwölf (11 %) Hündinnen nachgewiesen. Nur geringe Mengen von Erythrozyten konnten mit Sprayfixierung bei 35 (33 %) und mit Lufttrocknung bei 36 (34 %) Hündinnen gezeigt werden (Abbildung 29). Ein statistischer signifikanter Unterschied in der Erythrozytenmenge konnte zwischen den Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden ($p = 0,088$) (Tabelle 30). Es lag eine positive Korrelation vor, die statistisch als hochsignifikant betrachtet werden konnte ($r_s = 0,81$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

Neutrophile Granulozyten wurden bei 55 (52 %) Ausstrichpaaren übereinstimmend nicht nachgewiesen. Bei 43 (41 %) Hündinnen wurden dagegen übereinstimmend in beiden Zytologien neutrophile Granulozyten detektiert (Tabelle 28).

Mehr als 25 neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld zeigten jeweils vier (4 %) Proben der sprayfixierten und luftgetrockneten Ausstriche. Die Zahl der Ausstriche mit 5 bis 25 neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld lag nach Sprayfixierung bei neun (8 %) Hündinnen und nach Lufttrocknung bei 14 (13 %) Hündinnen. Eine geringe Anzahl von neutrophilen Granulozyten (bis zu fünf pro Gesichtsfeld) konnte bei 33 (31 %) Zytologien nach Sprayfixierung nachgewiesen werden. Nach Lufttrocknung waren es 30 (28 %) Ausstriche, die geringe Mengen von neutrophilen Granulozyten präsentierten (Abbildung 30). Es wurde kein statistisch signifikanter

Unterschied in der vorhandenen Menge der neutrophilen Granulozyten in den Ausstrichpaaren festgestellt ($p = 0,071$) (Tabelle 30). Eine positive, statistisch hochsignifikante Korrelation konnte bewiesen werden ($r_s = 0,88$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

Tabelle 28: Anzahl der Ausstrichpaare mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf den Nachweis von Erythrozyten (Ery) und neutrophilen Granulozyten (NG) sowie deren relative Häufigkeit in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen ($n = 106$).

Zellart	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Zellart vorhanden	Zellart nicht vorhanden	Gesamt		
Ery	43 (41)	51 (48)	88 (89)	12 (11)	106 (100)
NG	43 (41)	55 (51)	98 (92)	8 (8)	106 (100)

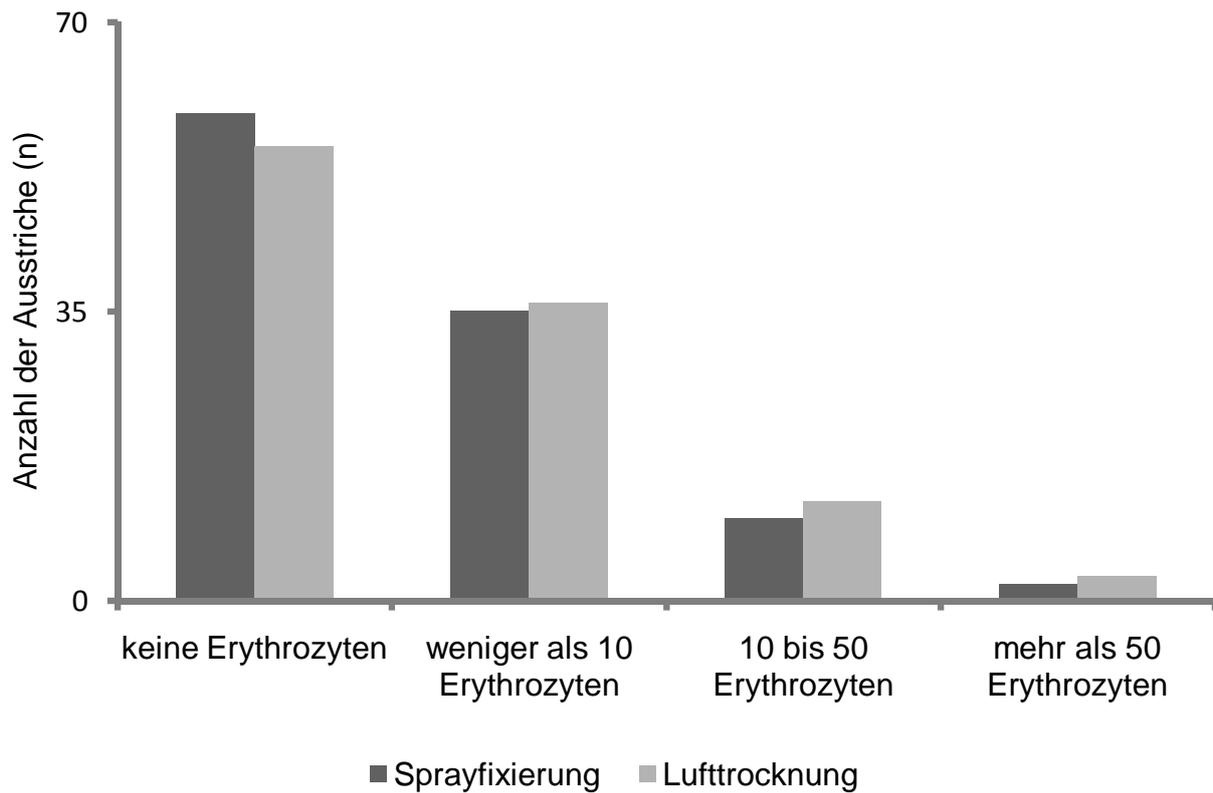


Abbildung 29: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche (n = 106) und luftgetrockneten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Erythrozyten pro Gesichtsfeld. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

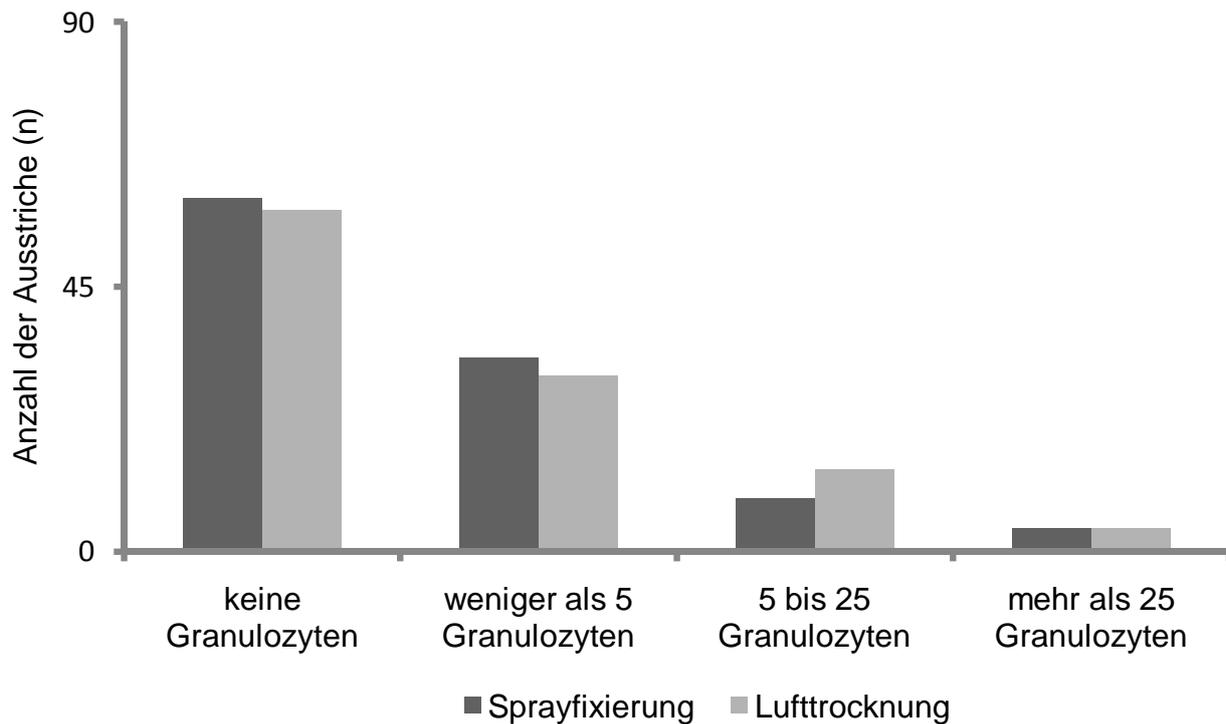


Abbildung 30: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche (n = 106) und luftgetrockneten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

Bakterien

Bei 72 (68 %) Hündinnen konnten in beiden Ausstrichen Bakterien detektiert werden. In 20 (19 %) gepaarten Zytologien wurden übereinstimmend keine Bakterien nachgewiesen (Tabelle 29).

Insgesamt 39 (37 %) Hündinnen präsentierten nach Sprayfixierung geringe Bakterienmengen im Ausstrich. Ein mittlerer Gehalt an Bakterien konnte bei 28 (26 %) Hündinnen nach Sprayfixierung nachgewiesen werden und einen hohen Bakteriengehalt hatten acht (8 %) Hündinnen aufzuweisen. Nach Lufttrocknung wurden 33 (31 %) Hündinnen mit einem geringen Bakteriengehalt detektiert. Ein mittlerer Bakteriengehalt konnte bei 38 (36 %) Hündinnen nachgewiesen werden. Hohe Bakterienmengen wurden bei zwölf (11%) Hündinnen bewiesen (Abbildung 31). Eine deutlich größere Menge an Bakterien in den luftgetrockneten Ausstrichen

Ergebnisse

konnte statistisch als hochsignifikant bewiesen werden ($p = 0,0005$) (Tabelle 30). Es bestand eine statistisch hochsignifikante positive Korrelation zwischen beiden Fixierungsmethoden ($r_s = 0,73$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

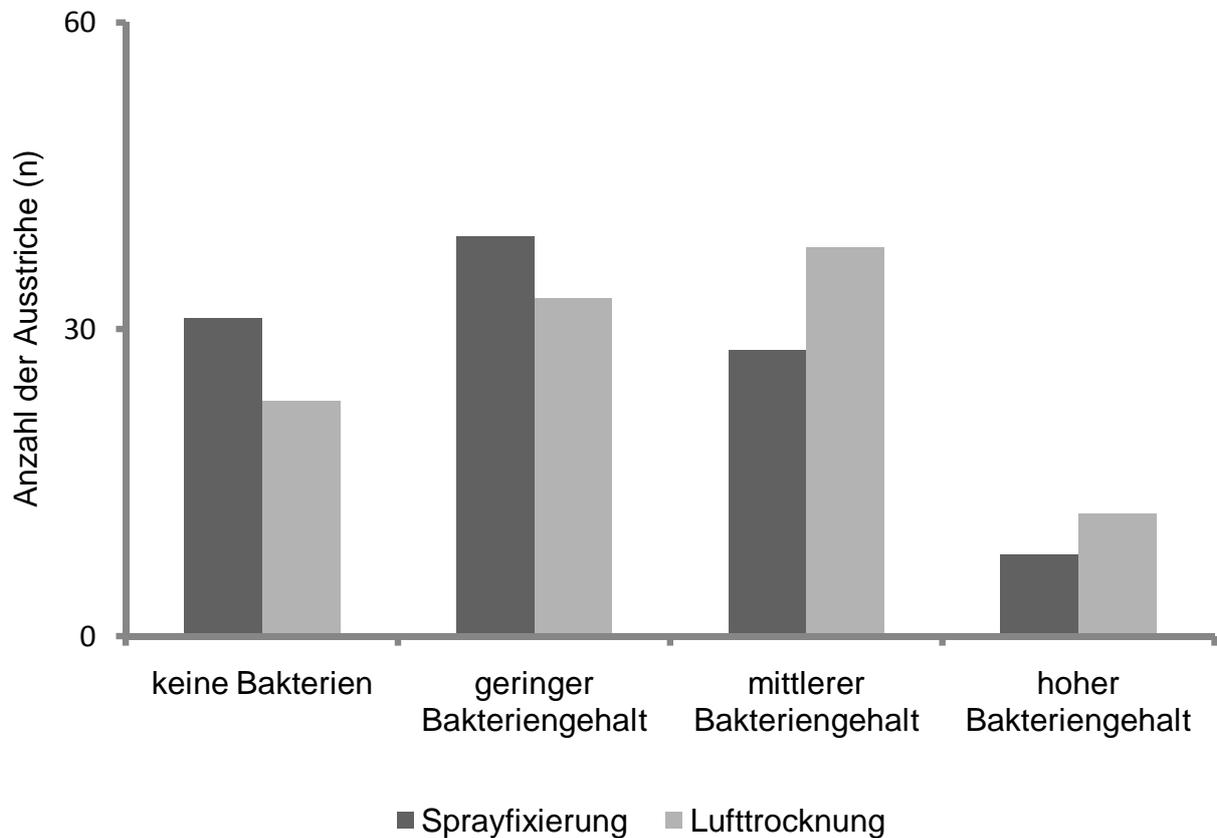


Abbildung 31: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche ($n = 106$) und luftgetrockneten Ausstriche ($n = 106$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Bakterienkolonien. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte bewiesen werden ($p = 0,0005$).

Sekret

In 49 (46 %) gepaarten Proben konnten übereinstimmend Sekretmengen gezeigt werden. Kein Sekret wurde bei 37 (35 %) Ausstrichpaaren nachgewiesen und 20 (19 %) Hündinnen zeigten in den Zytologien nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden keine Übereinstimmungen (Tabelle 29).

Drei (3 %) sprayfixierte Ausstriche und vier (4 %) luftgetrocknete Ausstriche wiesen einen hohen Sekretgehalt auf. Eine mittlere Menge an Sekret wiesen bei den sprayfixierten Ausstrichen 16 (15 %) der Hündinnen auf. Bei den luftgetrockneten Zytologien waren es dagegen 22 (21 %) Proben. Die Probenanzahl mit einem geringen Gehalt an Sekret blieb mit 37 (35 %) und 36 (34 %) Zytologien ausgewogen. Ohne Sekret blieben bei den spraybehandelten Ausstrichen insgesamt 50 (47 %) Proben, nach Lufttrocknung waren es nur 44 (42 %) Proben (Abbildung 32). Statistisch konnte bewiesen werden, dass die Sekretmengen in den luftgetrockneten Ausstrichen signifikant höher waren ($p = 0,037$) (Tabelle 30). Zwischen beiden Fixierungsmethoden bestand eine statistisch signifikante positive Korrelation ($r_s = 0,72$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

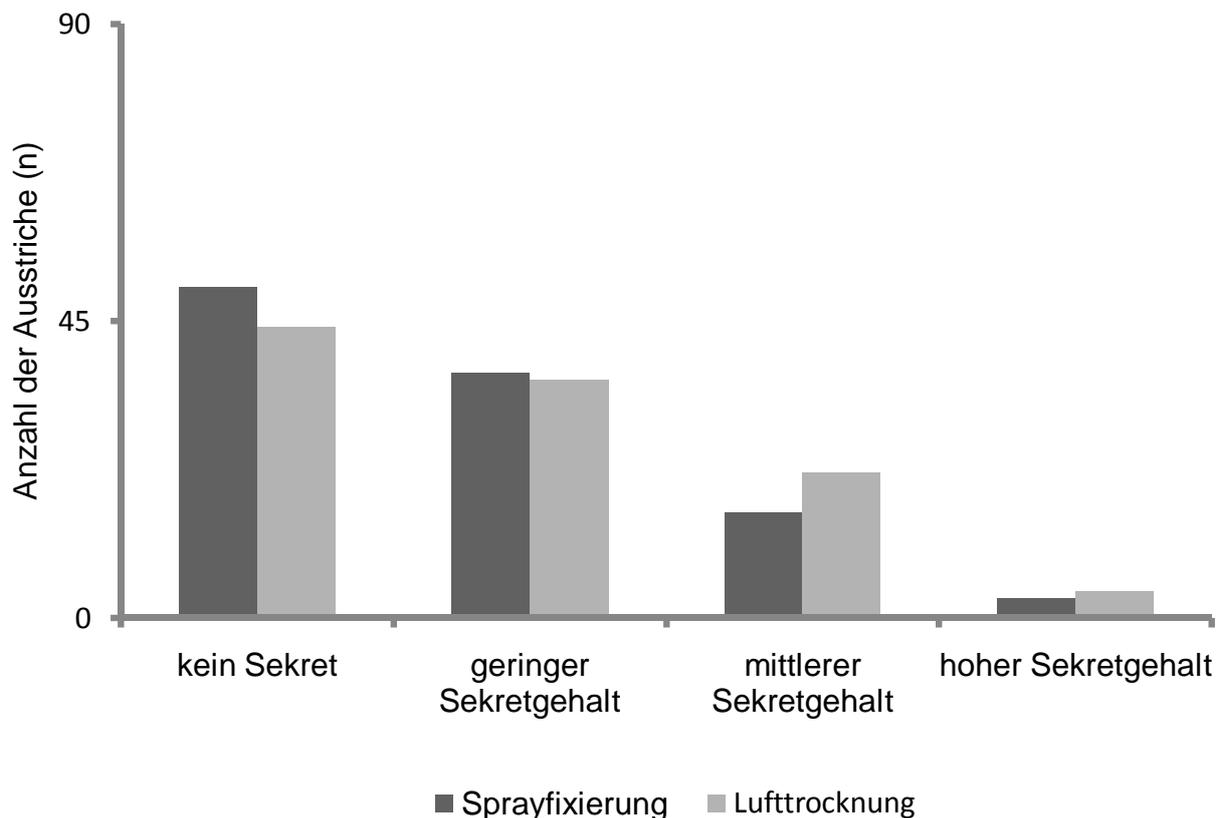


Abbildung 32: Einteilung der sprayfixierten Ausstrich ($n = 106$) und luftgetrockneten Ausstriche ($n = 106$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Sekret. Die Sekretmenge in den luftgetrockneten Ausstrichen war statistisch signifikant höher ($p = 0,0037$).

Detritus

Detritus konnte in den Probenpaaren von 76 (72 %) Hündinnen nachgewiesen werden. Bei 19 (18 %) Hündinnen wurde in beiden Ausstrichen kein Detritus detektiert (Tabelle 29). Von den 106 sprayfixierten Ausstrichen zeigten 3 (3 %) Proben eine hohe Menge an Detritus. Einen mittleren Gehalt präsentierten insgesamt 35 (33 %) sprayfixierte Zytologien und eine nur geringe Menge Detritus konnte bei 42 (40 %) Hündinnen detektiert werden. Bei den luftgetrockneten Präparaten präsentierten 45 (42 %) Ausstriche eine geringe Detritusmenge. Einen mittleren Detritusgehalt zeigten 32 (30 %) Proben und ein hoher Gehalt an Detritus wurde in sieben (7 %) Ausstrichen nachgewiesen (Abbildung 33).

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte in Bezug auf den Gehalt an Detritus nicht bewiesen werden ($p = 0,11$) (Tabelle 30). Es bestand eine deutliche positive Korrelation der Detritusmenge, die als statistisch hochsignifikant angesehen werden musste ($r_s = 0,82$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

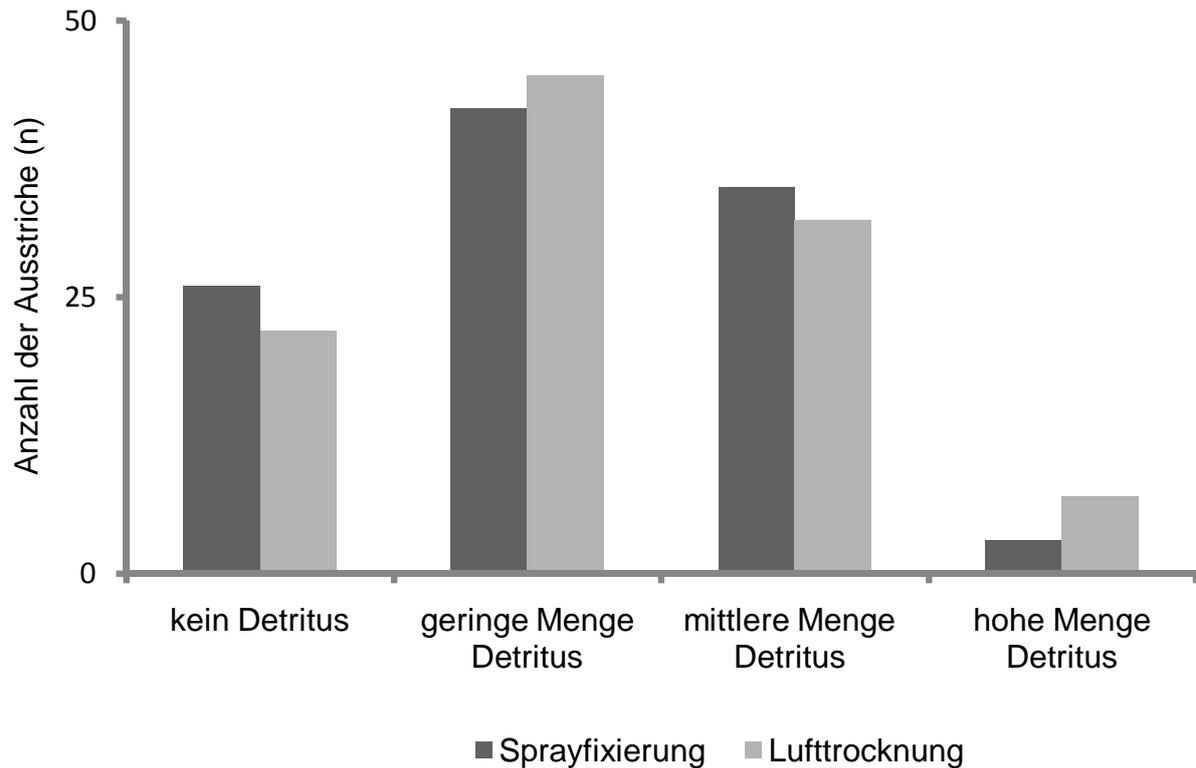


Abbildung 33: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche (n = 106) und luftgetrockneten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an Detritus. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,11$).

Freie Zellkerne

In 35 (33 %) Ausstrichpaaren konnten freie Zellkerne nachgewiesen werden. Bei 62 (58 %) Hündinnen wurden übereinstimmend in beiden Ausstrichen keine freien Zellkerne nachgewiesen und die gepaarten Ausstriche von neun (8 %) Hündinnen blieben ohne Übereinstimmung (Tabelle 29).

Geringe Mengen an freien Zellkernen wurden bei 25 (24 %) sprayfixierten und 26 (25 %) luftgetrockneten Zytologien nachgewiesen. Eine mittlere Menge an freien Zellkernen kam in jeweils elf (10 %) Ausstrichen vor. Unter den sprayfixierten Zytologien präsentierten zwei (2 %) Ausstriche einen hohen Gehalt an freien Zellkernen. Bei den luftgetrockneten Zytologien waren es insgesamt vier (4 %) Proben (Abbildung 34).

Ergebnisse

Ein Unterschied der Menge an freien Zellkernen in den Probenpaaren konnte statistisch nicht bewiesen werden ($p = 0,16$) (Tabelle 30). Es konnte eine statistisch hochsignifikante positive Korrelation bewiesen werden ($r_s = 0,84$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

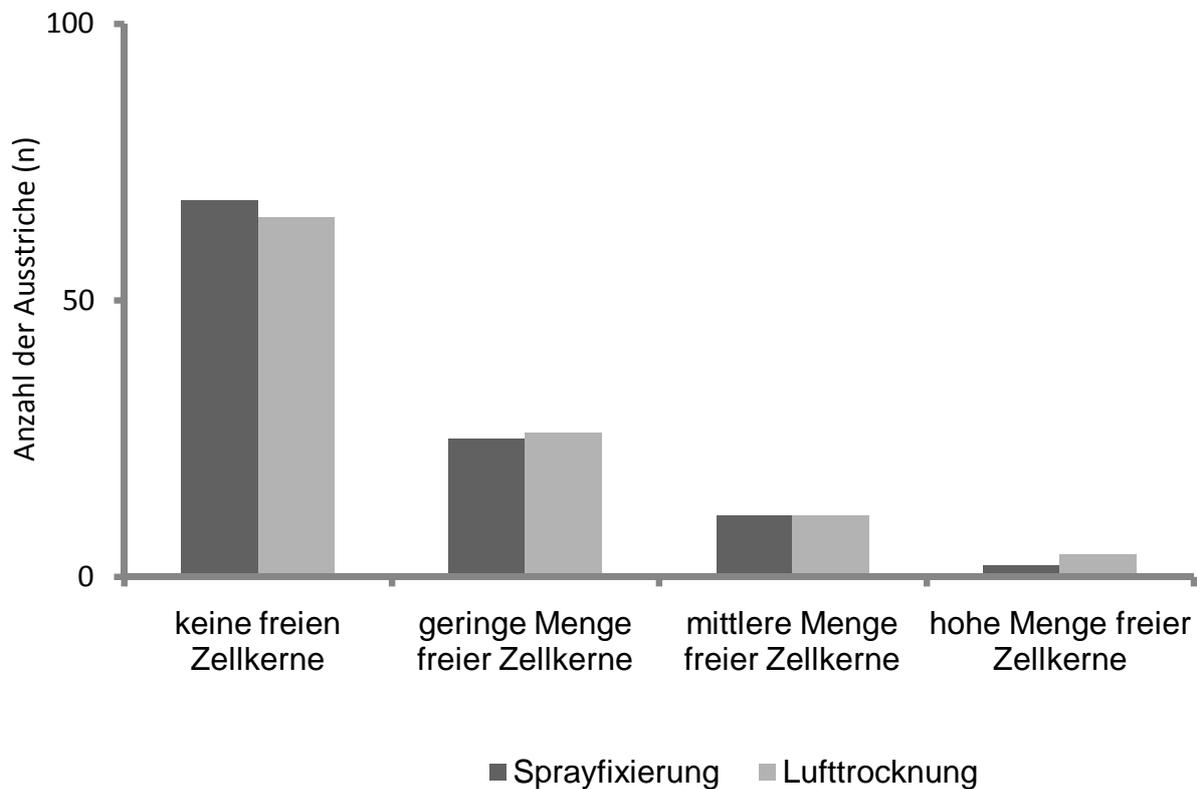


Abbildung 34: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche (n = 106) und luftgetrockneten Ausstriche (n = 106) nach unterschiedlich starkem Gehalt an freien Zellkernen. Statistisch signifikante Unterschiede existierten nicht.

Aufgerollte Zellränder

Zellen, die stark aufgerollte Zellränder aufweisen, waren bei zwölf (11 %) Hündinnen übereinstimmend in beiden Ausstrichen vorhanden. Bei 77 (73 %) Hündinnen ließen sich in beiden Ausstrichen keine aufgerollten Zellränder nachweisen (Tabelle 29). Während sich bei den sprayfixierten Ausstrichen elf (20 %) mit einem geringen Gehalt an aufgerollten Zellen präsentierten, waren es bei den luftgetrockneten Zytologien mit 26 (25 %) Ausstrichen mehr als doppelt so viele. Ein mittleres

Vorkommen von aufgerollten Zellrändern belief sich sowohl nach Sprayfixierung als auch nach Lufttrocknung auf zwei (2 %) Zytologien (Abbildung 35). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fixierungsmethoden in Bezug auf das Vorkommen der aufgerollten Zellränder konnte statistisch bewiesen werden ($p = 0,0011$) (Tabelle 30). Aufgerollte Zellränder konnten häufiger in luftgetrockneten Zytologien nachgewiesen werden. Zwischen beiden Fixierungsmethoden bestand eine schwach positive, statistisch signifikante Korrelation ($r_s = 0,56$; $p < 0,0001$) (Anhang Tabelle 41).

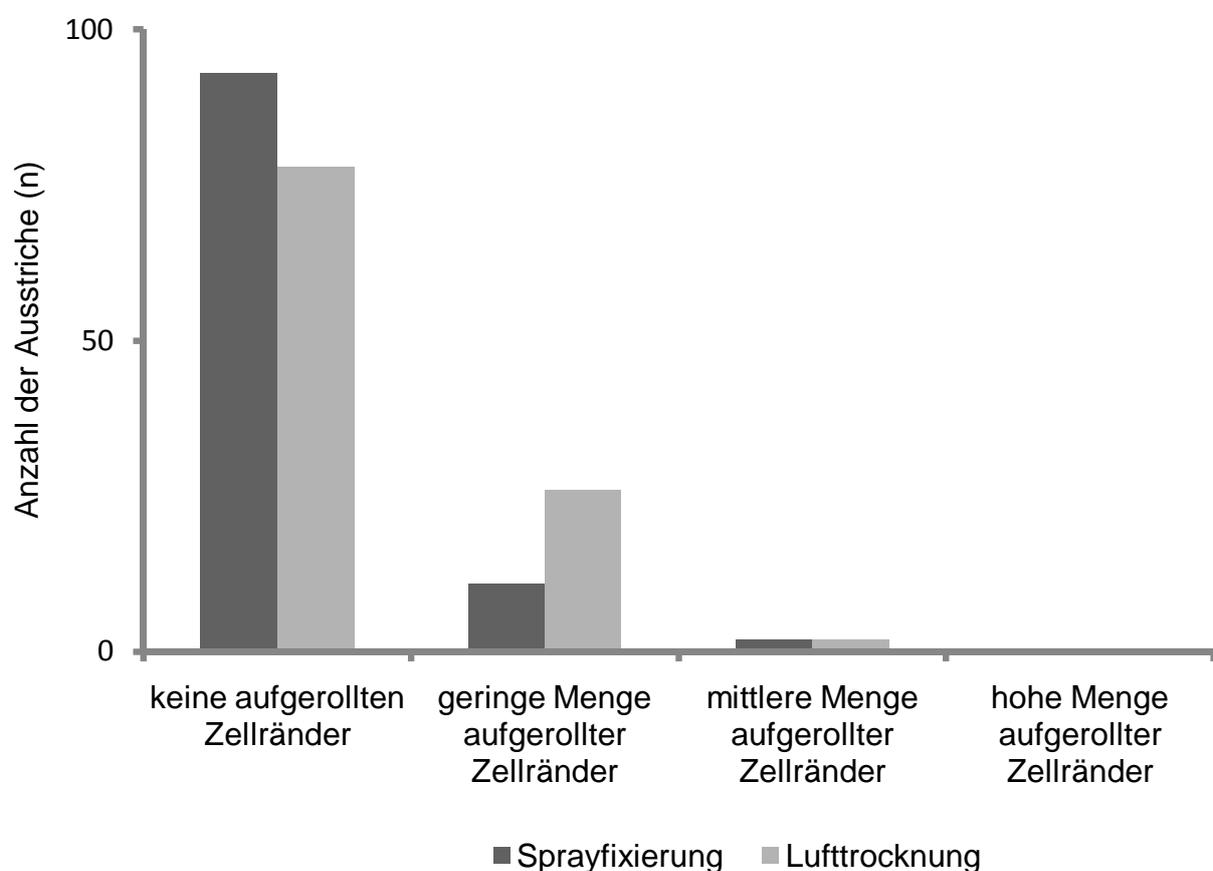


Abbildung 35: Einteilung der sprayfixierten Ausstriche ($n = 106$) und luftgetrockneten Ausstriche ($n = 106$) nach unterschiedlich starkem Gehalt an aufgerollten Zellrändern. Aufgerollte Zellränder lagen mit einer statistischen Signifikanz häufiger in den luftgetrockneten Ausstrichen vor ($p = 0,0011$).

Ergebnisse

Tabelle 29: Anzahl der Ausstrichpaare mit und ohne Übereinstimmung bezogen auf das Vorkommen von Bakterien (Bakt), Sekret (Sek), Detritus (Det), Wattefäden (Wat), freien Zellkernen (FZK) und aufgerollten Zellränder (AZr) sowie die relative Häufigkeit der sprayfixierten und luftgetrockneten Ausstriche in % bezogen auf die Gesamtzahl der Hündinnen (n = 106).

Parameter	Übereinstimmungen (n / %)			Keine Übereinstimmung (n / %)	Gesamtzahl Probenpaare (n / %)
	Vorhanden	Nicht vorhanden	Gesamt		
Bakt	72 (68)	20 (19)	92 (87)	14 (13)	106 (100)
Sek	49 (46)	37 (35)	86 (81)	20 (19)	106 (100)
Det	76 (72)	19 (18)	95 (90)	11 (10)	106 (100)
FZK	35 (33)	62 (58)	97 (91)	9 (8)	106 (100)
AZr	12 (11)	77 (73)	89 (84)	17 (16)	106 (100)

Tabelle 30: Vergleich des Vorkommens der Parameter Sekret (Sek), Detritus (Det), aufgerollte Zellränder (AZr), freiliegende Zellkerne (FZK), sowie Erythrozyten (Ery), neutrophile Granulozyten (NG) und Bakterien (Bak) nach zwei unterschiedlichen Fixierungsmethoden. Die Hündinnen (n = 106) wurden unabhängig von ihrer Zyklusphase beurteilt. Dargestellt sind die p-Werte. Statistische signifikante Unterschiede wurden bei der Sekretmenge, der Bakterienmenge und den aufgerollten Zellrändern nachgewiesen ($p < 0,05$).

	Ery	NG	Bakt	Sek	Det	FZK	AZr
p-Wert	0,088	0,071	0,0005	0,037	0,11	0,16	0,001

Zellverteilung

In 83 (78 %) gepaarten Zytologien zeigte sich ein identisches Muster der Zellverteilung. Einzeln lagen die Zellen in 50 (47 %) sprayfixierten Proben vor. Bei den luftgetrockneten Ausstrichen waren es 48 (45 %) Proben, in denen die Zellen einzeln vorlagen. Zellen, die mit anderen in einem Verband zusammengelagert waren, zeigten sich in 16 (15 %) luftgetrockneten und in 18 (17 %) sprayfixierten Proben. Beginnende Nesterbildung konnte in 25 (24 %) luftgetrockneten Ausstrichen und in 23 (22 %) Ausstrichen nach Sprayfixierung detektiert werden. Eine deutlich ausgeprägte Nesterbildung wurde bei 17 (16 %) luftgetrockneten und 18 (17 %) sprayfixierten Ausstrichen nachgewiesen (Abbildung 36). Es bestand keine signifikante Abweichung von der Symmetrie ($p = 0,18$).

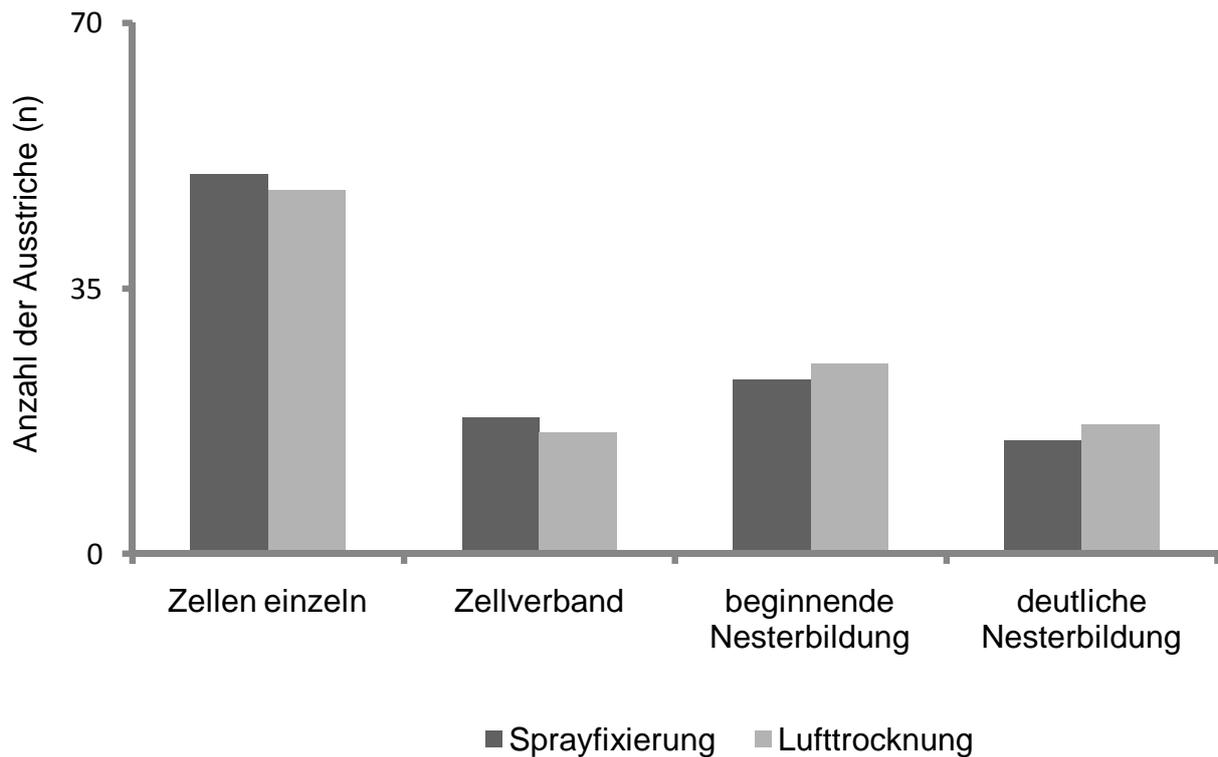


Abbildung 36: Einteilung der Ausstriche nach Sprayfixierung (n = 106) und nach Lufttrocknung (n = 106) nach unterschiedlichem Verteilungsmuster der Zellen im Ausstrich. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden.

Zellmenge pro Gesichtsfeld

Nach Sprayfixierung betrug die durchschnittliche Anzahl der Epithelzellen pro Gesichtsfeld $9,43 \pm 6,63$ (Median 8). Bei den Zytologien mit anschließender Lufttrocknung betrug die Zellmenge pro Gesichtsfeld $9,71 \pm 5,5$ (Median 9).

(Tabelle 31, Abbildung 37). Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht belegt werden ($p = 0,18$).

Tabelle 31: Epithelzellen pro Gesichtsfeld (GF), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}_a) mit Standardabweichung (SA) und Median.

Fixierungsmethode	$\bar{x}_a \pm SA$ (Epithelzellen / GF)	Median
Sprayfixierung	$9,43 \pm 6,63$	8
Lufttrocknung	$9,71 \pm 5,5$	9

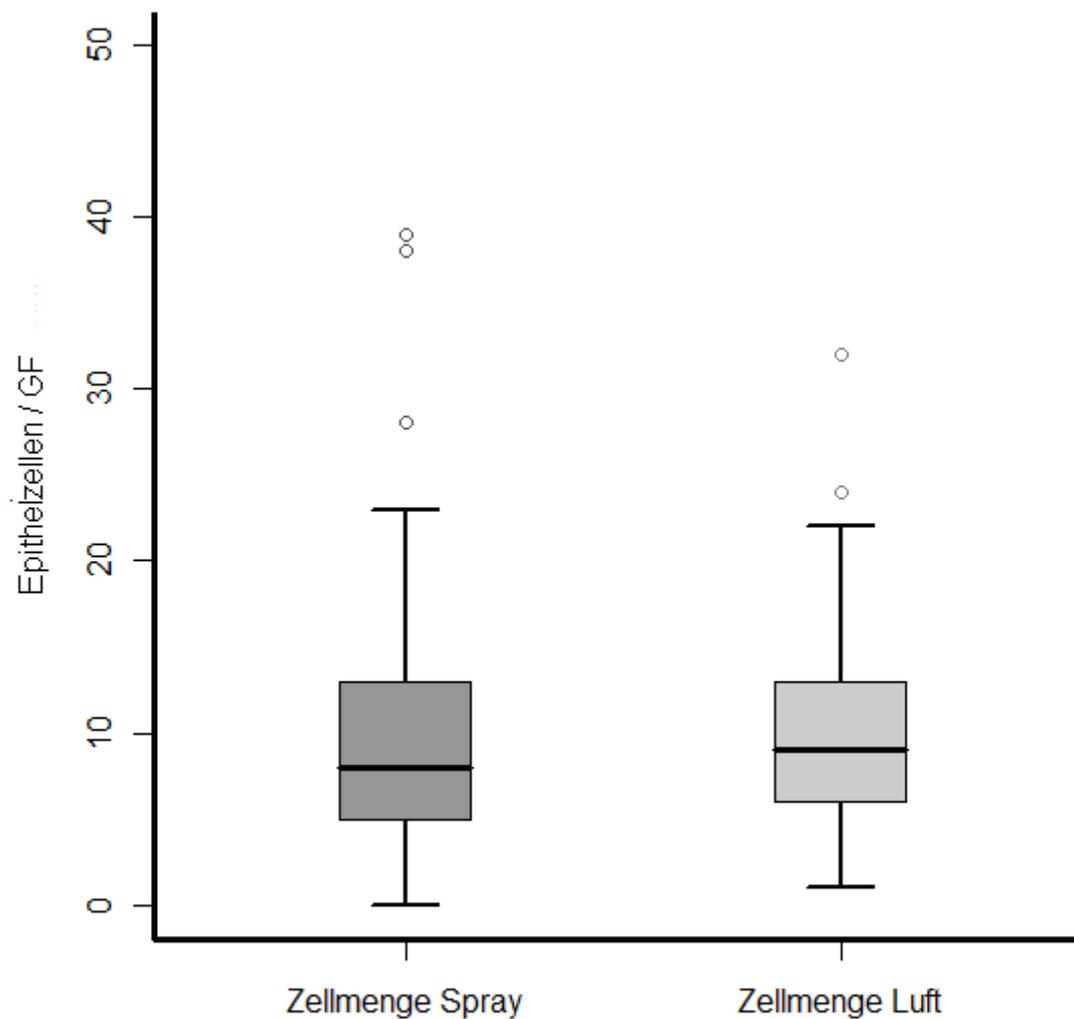


Abbildung 37: Epithelzellen pro Gesichtsfeld (GF) nach Fixierung mit Zytologiespray und nach Lufttrocknung ($n = 106$), dargestellt als Box-and-Whisker-Plot. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

4.3.2 Zykluseinteilung

105 (99 %) der 106 Hündinnen präsentierten in den gepaarten Proben ein zytologisch identisches Zyklusbild (Tabelle 32).

Tabelle 32: Anzahl der Ausstrichpaare (n = 106) nach Sprayfixierung und Lufttrocknung mit und ohne Übereinstimmung nach Einordnung in die entsprechenden Zyklusstadien.

	Übereinstimmung Spray . Luft (n)	Keine Übereinstimmung (n)	Gesamt (n)
Proöstrus	36	0	36
Östrus	45	1	46
Metöstrus	12	0	12
Anöstrus	12	0	12
Gesamt	105	1	106

4.3.3 Zellgrößen im Vergleich

Die ermittelten Zellgrößen nach Sprayfixierung und nach Lufttrocknung zeigten kaum statistisch signifikante Unterschiede. Lediglich die Mittelwerte der errechneten Kernfläche der Superfizialzellen wiesen statistisch signifikante Unterschiede auf ($p = 0,038$) (Tabelle 33). Die Kernfläche der luftgetrockneten Präparate war im Mittel größer als die der sprayfixierten Ausstriche. Parabasalzellen wurden bei zwölf Hündinnen vermessen, Intermediärzellen bei 23 Hündinnen, Superfizialzellen bei 19 und Schollen bei 13 Tieren.

Tabelle 33: Vergleich der Mittelwerte von Parabasal-, Intermediär- und Superfizialzellen sowie Schollen nach der Zellmessung nach zwei unterschiedlichen Fixierungsmethoden. Dargestellt sind die p-Werte. Lediglich die Kernfläche bei den Superfizialzellen unterscheidet sich signifikant ($p = 0,038$). Andere statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

	Parabasal- zellen (n = 12)	Intermediär- zellen (n = 23)	Superfizial- zellen (n = 19)	Schollen (n = 13)
Kern Länge	0,49	0,23	0,083	-
Kern Fläche	0,45	0,26	0,038	-
Zelle Länge	0,35	0,14	0,73	0,15
Zelle Breite	0,9	0,19	0,39	0,98
Zelle Fläche	0,26	0,088	0,35	0,36
Verhältnis Länge Kern . Länge Zelle	0,66	0,58	0,053	-

4.4. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern

4.4.1 Zyklusbeurteilung nach Entnahme von zwei unterschiedlichen Orten

Die gepaarten Zytologien von den unterschiedlichen Entnahmeorten wurden zum größten Teil in die gleichen Zyklusphasen eingeteilt. Es lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede vor (Tabelle 34). Erkennbare Unterschiede lagen nur bei der Beurteilung der Proben aus dem Proöstrus vor. Hier wurden mehr Vestibular- als Vaginalzytologien richtig beurteilt, was sich aber nicht als statistisch signifikant erwies. Insgesamt 81 (76 %) Untersucher haben die proöstrische Probe aus dem Vestibulum korrekt bewertet. Bei der vaginal entnommenen Zytologie konnten 68 (64 %) Studenten das Präparat richtig beurteilen. Die im Östrus entnommenen Proben wurden mit 103 (96 %, Vestibulum) und 106 (99 %, Vagina) zutreffenden Antworten von den insgesamt 107 Untersuchern deutlich besser erkannt (Anhang Tabelle 42).

Tabelle 34: Unterschiede in der Auswertung zwischen den Zytologien unterschiedlicher Entnahmeorte bei der gleichen Hündin. Dargestellt sind die p-Werte. Es existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede.

	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus
p. Wert	0,16	0,18	0,61	0,098

4.4.2 Zyklusbeurteilung nach Entnahme mit unterschiedlichen Tupfern

Bei der Probenentnahme mit feuchten und trockenen Tupfern zeigten sich im Proöstrus, Metöstrus und im Anöstrus statistisch signifikante Unterschiede bei der Zuordnung der Zytologien in die entsprechenden Zyklusphasen (Tabelle 35). Im Proöstrus bestimmten von 107 Untersuchern 61 (57 %) Personen die feucht entnommene Zytologie korrekt. Die trocken entnommenen Proben wurden dagegen von 84 (79 %) Studenten richtig angesprochen. Die im Östrus gewonnenen Proben konnten von 88 (82 %, feuchter Tupfer) und von 92 (86 %, trockener Tupfer) Studenten korrekt zugeordnet werden. Bei den im Metöstrus entnommenen Proben führten die feucht entnommenen Proben zu 90 (84 %) richtigen Antworten. Bei den trockenen Tupferproben waren es lediglich 69 (64 %) korrekte Antworten. Als statistisch relevant erwies sich dieses Ergebnis jedoch nicht. Im Anöstrus schnitten die feucht entnommenen Zytologien mit 84 (79 %) richtigen Zuordnungen sehr viel besser ab als die trocken entnommenen Proben mit 45 (42 %) korrekten Zuordnungen (Anhang Tabelle 42).

Tabelle 35: Unterschiede in der Auswertung zwischen der Entnahme mit trockenen und feuchten Tupfern bei der gleichen Hündin. Dargestellt sind die p-Werte. Bei den statistisch signifikanten Abweichungen werden die Entnahmemethoden mit mehr korrekten Antworten aufgeführt.

	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus
p. Wert	0,0016	0,43	0,0045	< 0,0001
Besser bewertete Methode	trockener Tupfer	*	feuchter Tupfer	feuchter Tupfer

Ergebnisse

4.4.3 Zyklusbeurteilung nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden

Nur in der Zyklusphase Östrus lagen statistisch signifikante Unterschiede vor ($p = 0,034$). Im Östrus wurde der sprayfixierte Ausstrich von 92 (86 %) Studenten richtig angesprochen. Die luftgetrocknete Zytologie konnte dagegen von 103 (96 %) Untersuchern korrekt eingeteilt werden (Anhang Tabelle 42). Die Zytologien aus Pro-, Met- und Anöstrus blieben ohne statistisch signifikante Unterschiede (Tabelle 36).

Tabelle 36: Unterschiede in der Auswertung zwischen den Zytologien nach unterschiedlichen Fixierungsmethoden bei der gleichen Hündin. Dargestellt sind die p-Werte. Bei statistisch signifikanten Abweichungen werden die Entnahmemethoden mit mehr korrekten Antworten ergänzt.

	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus
p. Wert	0,76	0,034	0,21	0,92
Besser bewertete Methode	*	Lufttrocknung	*	*

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Die Vaginalzytologie stellt einen essentiellen Bestandteil der gynäkologischen Untersuchung bei der Hündin dar (SIMMONS, 1970; GUYANT, 1988; WABERSKI und GÜNZEL-APEL, 1990; TAMMER et. al., 1994; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). Sowohl bei der Deckzeitpunktbestimmung als auch bei einer Vielzahl anderer Indikationen besitzt dieses diagnostische Verfahren eine große Bedeutung (DREIER, 1975/a und b; BRUNNER, 1983; TAMMER et. al., 1994; FÁY et al., 2003; JOHNSON, 2006; KUSTRITZ, 2006; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). Ein Vorteil der Vaginalzytologie ist die Einfachheit bei der Entnahme und ein schnell verfügbares Ergebnis (SIMMONS, 1970; GUYANT, 1988; BRUNNER, 1983; WEHREND, 2007).

Das Studium der Literatur hat gezeigt, dass für die Erstellung der Vaginalzytologie bereits eine große Menge an unterschiedlichen Methoden beschrieben wurde. Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, welches Entnahmeverfahren die meisten Vor- und Nachteile liefert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich insbesondere mit dem potentiellen Einfluss unterschiedlicher Entnahmelokalisationen und Fixierungen auf die Interpretation von exfoliativen Zytologien aus dem Vestibulovaginalkanal der Hündin.

Bei der Tupferprobenentnahme aus der Vagina mittels Spekulum handelt es sich um ein etabliertes Verfahren (DREIER, 1975 a/b; TAMMER et. al., 1994; GÜNZEL-APEL et al., 1999; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008), so dass es im eigenen Versuch als Goldstandard betrachtet wird. Die Vaginalzytologieentnahme erfolgt in der vorliegenden Arbeit so wie bereits von einer Vielzahl anderer Autoren beschrieben (TAMMER et. al., 1994; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). Einige Autoren berichten von einer möglichen Zytologieentnahme aus dem Vestibulum ohne Nutzung eines Spekulum (BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a und b; POST, 1985; GUYANT, 1988). DREIER (1975/a) gab an, dass die Abstriche aus der Vagina denen aus dem Vestibulum vorzuziehen sind. Eine Begründung für diese Aussage fehlte jedoch. HIEMSTRA et al. (2001) stellten fest, dass bis zu diesem Zeitpunkt noch kein optimaler Entnahmeort im Vestibulovaginalkanal definiert werden konnte und

empfohlen deshalb für eine genaue Einordnung des Zyklusstandes die zusätzliche Bestimmung der Plasmaprogesteronkonzentration. Nach den Aussagen von SCHUTTE (1967/a) und GUYANT (1988) hingegen lieferten beide Entnahmeorte qualitativ gleichwertige Ergebnisse. In der eigenen Arbeit wurden die zwei unterschiedlichen Entnahmeorte direkt miteinander verglichen. Entsprechen die Zytologieergebnisse aus dem Vestibulum den Ergebnissen aus der Vagina, so kann mit einem geringeren materiellen Aufwand eine aussagekräftige Zytologie aus dem Vestibulum gewonnen werden. Die Vestibularzytologie empfiehlt sich aufgrund ihrer Einfachheit für die Entnahme von Reihenuntersuchungen, wie sie zum Beispiel bei einer Hündin mit Stillen Hitze nötig ist, und kann gegebenenfalls vom Züchter selbst durchgeführt werden (HOLST und PHEMISTER, 2001). Die weitere Bearbeitung und Auswertung der Zytologie erfolgt anschließend durch den betreuenden Tierarzt.

Bei der vorangegangenen Literaturrecherche wurde die Vielzahl der Entnahmemöglichkeiten deutlich (SIMMONS, 1970; CHRISTIE et al., 1972; DREIER, 1975/a; BRUNNER, 1983; TAMMER et al., 1994; EHLERS, 2000; JOHNSON, 2006; JOHNSON, 2006; WEHREND, 2007). Wattetupfer wurden von den meisten Autoren bevorzugt, doch es herrschen unterschiedliche Meinungen über die Beschaffenheit der Tupfer. Ein Teil der Autoren bevorzugte trockene Wattetupfer (CHRISTIE, 1972; BELL et al., 1973; DORE, 1978; WOLLINGER, 1984; TAMMER et al., 1994; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008), der andere Teil präferierte mit isotonischer Kochsalzlösung angefeuchtete Tupfer (GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; GUYANT, 1988; EHLERS, 2000; JOHNSON, 2006). Einige Autoren verwendeten feuchte Tupfer nur bei trockener Vaginalschleimhaut und bei Abwesenheit von Vaginalfluor (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; HOLST und PHEMISTER, 2001). Ziel dieser Arbeit war es, die sinnvollere Entnahmemethode zu erfassen. Nach der Entnahme mit feuchten Tupfern ist zu bedenken, dass diese eine etwas längere Lufttrocknungszeit von mehreren Minuten benötigen als die Ausstriche, die mit trockenen Tupfern angefertigt werden.

Mit dieser Arbeit sollen unterschiedliche Verfahren der Entnahme und Aufarbeitung exfoliativer Zytologien aus dem Vestibulogenitaltrakt der Hündin evaluiert werden, um die Anfertigung einer Vaginalzytologie in der tierärztlichen Praxis zu vereinfachen und gleichzeitig eine hohe Qualität zu sichern.

5.2 Diskussion der Methodik

Die Zytologien wurden von Hündinnen einer heterogenen Gruppe hinsichtlich des Alters, der Rassen und der Haltung entnommen, um das Kollektiv in einer Tierarztpraxis widerzuspiegeln. FÁY et al. (2003) kritisierten, dass die meisten der bisherigen Untersuchungen und Studien zur Deckzeitpunktbestimmung in sehr gut ausgestatteten Kliniken durchgeführt und dafür Versuchshunde eingesetzt wurden. Der Großteil der vorgestellten Hündinnen befand sich im Proöstrus, Östrus oder Metöstrus. Nur wenige Tiere waren hormonell inaktiv und befanden sich im Anöstrus. Die daher teilweise sehr kleine Gruppengröße der anöstrischen Tiere konnte statistisch nicht immer ausgewertet werden. Dieses muss zwar bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden, ist jedoch nicht von großer Bedeutung, da die Bewertung einer Zytologie in praxi in erster Linie in den Zyklusphasen Proöstrus, Östrus und Metöstrus erfolgt (EHLERS, 2000).

Vor der gynäkologischen Untersuchung wurde stets eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt, um den Gesundheitszustand des Tieres zu erfassen. Als Ausschlusskriterium für die Versuchsteilnahme galt neben der offenen Form der Pyometra auch eine hochgradige Form der Vaginitis. Begründet liegt dies in der Tatsache, dass die dadurch bedingte sehr hohe Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Ausstrich eine Aussage über das epitheliale Zellbild erschweren oder verfälschen könnte. Es sollten bewusst nur physiologische hormon- und zyklusabhängige Veränderungen detektiert werden.

Obwohl die Färbung nach Papanicolaou eine exzellente Differenzierung der einzelnen Zellarten einer vaginalzytologie zulässt, so ist sie jedoch aufgrund des hohen Zeit- und Materialaufwandes in der Praxis nur sehr schwer durchführbar (BRUNNER, 1983; POST, 1985). Seit einigen Jahren sind Papanicolaou-Schnellfärbesets auf dem Markt, die aber immer noch fünf Minuten pro Ausstrich in Anspruch nehmen. FÁY et al. (2003) verglichen unterschiedliche Methoden zum Anfärben im Rahmen der Deckzeitpunktbestimmung. Sie kritisierten die aufwendigen Färbemethoden, welche in vorangegangenen Studien oft zum Einsatz kamen und empfahlen deshalb eine Schnellfärbemethode, welche somit besonders für Praktiker geeignet ist. Von der Papanicolaou-Färbung wurde deshalb in der eigenen Untersuchung abgesehen. Stattdessen wurde eine Schnellfärbemethode für Blutausstriche (Hemacolor®) gewählt, da sie in vielen Tierarztpraxen zur

Laborausstattung gehört und somit eine hohe Praxisrelevanz besitzt. Sie ist schnell durchführbar, kostengünstig und erlaubt eine ausreichend gute Differenzierung der einzelnen Epithel- und Blutzellen (BRUNNER, 1983; OLSON et al., 1984; POST, 1985; GUYANT, 1988; HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006). Zu beachten ist allerdings, dass sich Vaginalepithelzellen langsamer anfärben als Blutzellen und deshalb einige Tauchgänge mehr als vom Hersteller empfohlen durchgeführt werden müssen (BRUNNER, 1983; OLSON et al., 1984; HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006).

Die Auswertung der Zytologien erfolgte an Anlehnung an die Dissertation von EHLERS (2000), welche sich ebenfalls mit der Vaginalzytologie der Hündin beschäftigte. Hier wurde bereits eruiert, dass in der Literatur eine Vielzahl von Bewertungskriterien, Zellbeschreibungen und Zelleinteilungen hierfür vorhanden sind. In der eigenen Arbeit fand keine Differenzierung in basophile, mischfarbene und azidophile Superficialzellen statt, da nicht die dafür notwendige Papanicolaou-Färbung angewandt wurde. Auf die Spezialfärbung wurde aus oben genannten Gründen verzichtet. Schaum- und Metöstruszellen wurden in die Zytologiebewertung nicht mit einbezogen. Berücksichtigt wurden jedoch in dieser Arbeit auch keratinisierte Zellen, da jene vermehrt im Vestibulum vorkommen und laut einiger Autoren zu einer schlechteren Zytologieauswertung führen können (HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006).

Vergleich von unterschiedlichen Entnahmeorten

Bei dem Vergleich der Entnahmeorte wurde in der Untersuchung der Zytologien ein Schwerpunkt auf das Vorhandensein von keratinisierten Zellen gelegt, da diese von einigen Autoren als Störfaktoren für die Untersuchung angesehen wurden (HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006). GÜNZEL-APEL et al. (1999) empfahlen die Anwendung eines Röhrenspekulums, wodurch ein Kontakt des Tupfers mit Labien und Vestibularschleimhaut verhindert wird und somit eine Kontamination mit keratinisierten Zellen auf ein Minimum beschränkt wird.

Die Beantwortung der Frage, ob Unterschiede bezüglich der Zyklusaussage anhand von Plasmaprogesteronkonzentration, Vaginal- und Vestibularausstrichen bestehen, konnte nur bei einem Teilkollektiv der Hündinnen beantwortet werden. In diese

Untersuchung wurden Hündinnen (n = 47) einbezogen, bei denen im Rahmen der gynäkologischen Untersuchung zu den gepaarten Zytologien eine Plasmaprobe entnommen wurde. In der Plasmaprobe konnte mittels bereits evaluierten Verfahren die Progesteronkonzentration gemessen werden (HASE et al., 2000; HIEMSTRA et al., 2001). Progesteronkonzentrationen bis zu 2 ng / ml wurden in Anlehnung an JOHNSTON et al. (2001) und SEKI et al. (2010) dem Proöstrus zugeordnet. Eine Plasmaprogesteronkonzentration zwischen 2 und 15 ng / ml wurde in die Zyklusphase Östrus eingeordnet (JOHNSTON et al., 2001). Eine Progesteronkonzentration ab 15 ng / ml galt als bezeichnend für den Metöstrus (JOHNSTON et al., 2001). Hündinnen mit einer Progesteronkonzentration von weniger als 1 ng / ml und einer entsprechenden Anamnese wurden dem Anöstrus untergeordnet.

Vergleich von trockenen und feuchten Wattetupfern

Bei dem Vergleich dieser zwei Tupfervarianten wurden ausschließlich Proben aus der Vagina gewonnen, da die Vaginalzytologie die etablierte Methode darstellt.

Vergleich Zytologiesprayfixierung und Lufttrocknung

Um die optimale und zeitgleich praxisorientierte Fixierung der Ausstriche zu erfassen, wurden zwei Methoden miteinander verglichen. Einige Autoren nutzten immer unmittelbar nach Anfertigung der Ausstriche ein Zytologiespray (CHRISTIE et al., 1972; BELL et al., 1973; EHLERS, 2000; DREIER, 2010), unabhängig von der sich anschließenden Färbung. Andere Autoren fixierten die Ausstriche nach ausreichender Lufttrocknung in Ethanol oder den entsprechenden Fixierungslösungen der Schnellfärbekits (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; DREIER, 2010). In dieser Arbeit wurden die gepaarten Ausstriche zum einen direkt im feuchten Zustand mit Zytologiespray (Merckofix[®], Merck) fixiert, anschließend vier Tage luftgetrocknet und dann mit einer Schnellfärbung gefärbt. Die Vergleichsproben blieben vier Tage ohne Fixierung an der Luft liegen und wurden im Anschluss daran fixiert und mit einem Schnellfärbeset (Hemacolor[®], Merck) gefärbt. Ein Zeitraum von vier Tagen für die Lufttrocknung wurde aus dem Grund gewählt, da eine Postwurfsendung beim Versand der Proben aus der Praxis diese Zeit in Anspruch

nehmen kann. Häufig werden unbehandelte Ausstriche von Tierärzten entnommen und anschließend zu einem Experten zur Färbung und Auswertung geschickt. Es stellte sich die Frage, ob die Qualität des Ausstriches unter diesem Verfahren leidet. Nach vollständiger Aufarbeitung der Ausstriche wurden diese mit den bereits oben aufgeführten Schemata untersucht und ausgewertet. Zusätzlich wurden bei diesem Experiment die Zellgrößen bestimmt. Hierfür wurden bei 30 Hündinnen in den gepaarten Ausstrichen jeweils 30 Zellen ausgemessen und in die entsprechenden Zellgruppen eingeteilt. Die publizierten Größenangaben zu den einzelnen Zellgruppen variieren sehr stark in der Literatur. Die Einteilung der einzelnen Zellarten erfolgte in dieser Arbeit anhand der Größenbeschreibungen für die Zellen nach EHLERS (2000) und MANEKE (2002).

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern

Ziel dieses Experimentes war es zu erkennen, ob Unterschiede in der Auswertung durch verschiedene Personen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Entnahme- und Fixierungsmethoden vorliegen. Aus allen drei Versuchsgruppen wurde jeweils eine Hündin für jede der entsprechenden Zyklusphasen ausgewählt. Die Gruppe der Untersucher war in sich sehr inhomogen. Es befanden sich sowohl Studierende des 6. Semesters als auch des 8. Semesters unter ihnen. Alle Studierenden haben freiwillig an diesem Versuch teilgenommen. Sie haben alle eine kurze, einheitliche Einführung in die Materie der Vaginalzytologieauswertung erhalten, um eventuell bereits Erlerntes aus dem Studium aufzufrischen. Zusätzlich hat jeder Studierende zwei Hilfsblätter erhalten, auf welchen zum einen die unterschiedlichen Zellen als Schwarz-Weiß-Zeichnung mit kurzer Beschreibung dargestellt waren, und zum anderen eine übersichtliche Beschreibung der einzelnen Zyklusphasen (Anhang Abbildung A und B) vorlag. Mit Hilfe dieser Erläuterungen haben die Probanden die Ausstriche in die unterschiedlichen Zyklusphasen unterteilt. Auf eine Auszählung der Zellen und eine Einteilung der Parameter (z. B. Erythrozyten und Detritus) in nicht vorhanden%bis hochgradig vorhanden% wurde bewusst verzichtet, da die Skalierung dieser Parameter zu sehr von der Subjektivität der Untersucher und von Erfahrungswerten geprägt ist (EHLERS, 2000).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Einfluss der Entnahmelokalisationen

Zytologische Untersuchungen

Die Tupferprobenentnahme aus der Vagina stellt ein seit vielen Jahrzehnten etabliertes Verfahren dar (DREIER, 1975/a und b; TAMMER et al., 1994; GÜNZEL-APEL et al., 1999; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008). In der Literatur wird jedoch immer wieder auch über eine mögliche Zytologiegewinnung aus dem Vestibulum der Hündin geschrieben (BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a und b; POST, 1985; GUYANT, 1988; HIEMSTRA et al., 2001). Die Meinungen der Autoren im Hinblick auf die Vestibularzytologie variieren. Einige Autoren nehmen bevorzugt Proben aus der Vagina, sehen aber auch kein Problem in einer Probengewinnung aus dem Vestibulum (SCHUTTE, 1967/a, BELL et al., 1973; DREIER, 1975/a und b). Andere Autoren entnehmen Zytologien ausschließlich aus der Vagina (SCHUTTE, 1967/a; SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; GÜNZEL-APEL et al., 1999; TAMMER et al., 1994; WEHREND, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Vestibularzytologien mit einem Großteil der Untersuchungsergebnisse der Vaginalzytologien übereinstimmen. Das entspricht den Untersuchungsergebnissen von HIEMSTRA et al. (2001), welche Zytologien aus dem Vestibulovaginaltrakt mit den Progesteronkonzentrationen der entsprechenden Hündinnen verglichen haben. In der vorliegenden Arbeit konnten in den Vestibularausstrichen alle Epithelzellen problemlos angesprochen werden. Bei einem Großteil der Epithelzellen liegt eine deutlich positive Korrelation bezüglich der Anzahl zwischen beiden Entnahmelokalisationen vor. Einzige Ausnahme bilden die keratinisierten Epithelzellen aus dem Vestibulum. Auch der durchschnittliche Anteil der keratinisierten Zellen am Gesamtausstrich unterscheidet sich zwischen den Entnahmeorten. Sie kommen deutlich häufiger in den Vestibularausstrichen vor, was die Aussage von einigen Autoren bestätigt (WRIGHT und PARRY, 1989; HOLST und PHEMISTER, 2001). OLSON et al. (1984) und GUYANTS (1988) Aussage, dass es sich bei den keratinisierten Zellen um stark gefältete Schollen handelt, kann hiermit widerlegt werden, da die keratinisierten Zellen mit statistisch signifikantem

Unterschied häufiger im Vestibulum vorkommen. Keratinisierte Epithelzellen in den Vaginaausstrichen sind mit großer Wahrscheinlichkeit eine Verschleppung von Zellen, die durch das Einführen des Spekulum entstehen kann. Bei einigen Hündinnen wurde ein Spreizspekulum für die Vaginaltupferprobenentnahme angewandt, was eine Verunreinigung mit keratinisierten Zellen erhöht, da der Tupfer in Kontakt mit der Vestibularschleimhaut gelangen kann. Als andere Erklärung für das Vorkommen von keratinisierten Zellen im Vaginaausstrich kann die These von GUYANT (1988) angesehen werden, der besagt, dass vereinzelt stark gefältete Schollen das Bild von keratinisierten Zellen vortäuschen. Das Zyklusbild wird durch die höhere Anzahl von keratinisierten Zellen im Vestibulum in keinsten Weise negativ beeinträchtigt. Das widerlegt die Aussage von WRIGHT und PARRY (1989) und JOHNSON (2006), die die keratinisierten Zellen als störend für die Zytologieauswertung beschrieben haben. Keratinisierte Zellen traten in der vorliegenden Untersuchung unabhängig von der Zyklusphase auf, was für eine hormonelle Unabhängigkeit spricht.

Bei Betrachtung der Zytologien, unabhängig von der Zyklusphase, zeigten sich Unterschiede im Vorkommen von Basalzellen und Schollen. Beide Zellarten waren in größerer Anzahl in den Vaginaausstrichen nachzuweisen. Als mögliche Ursache kann ein potentieller Einfluss von Östrogen in Betracht gezogen werden, der zu einer deutlichen Proliferation der Schleimhaut führt (GÜNZEL und KOIVISTO, 1984). Da die Vaginalschleimhaut im Gegensatz zur Vestibularschleimhaut zur kutanen Schleimhaut zählt, fallen die hormonell bedingten Veränderungen hier stärker ins Gewicht als im Vestibulum (SMOLLICH und MICHEL, 1992). Die Schleimhaut im Vestibulum spricht nicht so stark auf die Östrogenwirkung an (SMOLLICH und MICHEL, 1992). Eine Ursache kann darin liegen, dass im Vestibulum die innere Körperoberfläche übergeht in die äußere Haut und das Vestibulum somit einige Eigenschaften der äußeren Haut besitzt (STÖHR et al., 1955).

Ein Grund für ein vermehrtes Vorkommen von Basalzellen in der Vagina im Vergleich zum Vestibulum konnte in der Literatur noch nicht gefunden werden.

Bei Betrachtung der Zykluseinteilung der entnommenen Zytologien fällt auf, dass ausschließlich abweichende Ergebnisse im Östrus vorkamen. Die Zytologie aus der

Vagina galt hierbei als „Goldstandard“. Die abweichenden Ausstriche der dazugehörigen Vestibularzytologien befanden sich zytologisch noch im Proöstrus. Da die Vaginalschleimhaut stärker auf Östrogeneinfluss reagiert als die Vestibularschleimhaut, ist das abweichende zytologische Bild eine logische Konsequenz daraus. Das gehäufte Auftreten der Schollen in den Vaginalausstrichen lässt sich wahrscheinlich auch auf die ausgeprägtere hormonell bedingte Proliferation und Exfoliation zurückführen. Dadurch, dass die Vaginalschleimhaut schneller im Zyklus voranschreitet als die Vestibularschleimhaut, kommt es auch zu einer stärkeren Präsentation der Schollen in den Vaginalzytologien. Drei bis sechs Tage nach dem Östradiol-Peak ist der Anteil der verhornten Zellen in der Vagina laut HOLST und PHEMISTER (2001) am höchsten. Für die Vestibularschleimhaut liegen dafür noch keine Untersuchungsergebnisse vor.

Ein vermehrtes Vorkommen von Intermediärzellen im Vestibulum im Vergleich zu den Vaginalzytologien ist vermutlich ebenfalls als Konsequenz aus der schwächeren beziehungsweise langsameren Östrogenwirkung an der Vestibularschleimhaut anzusehen. Die Zellen der Vestibularschleimhaut proliferieren wahrscheinlich nicht so schnell und liegen deshalb zu großen Teilen noch als Intermediärzellen vor, während Vaginalepithelien bedingt durch Östrogenwirkung als Superficialzellen oder als Schollen vorlagen. Da direkte Vergleiche der Wirkung von Östrogen an der Vestibular- und Vaginalschleimhaut bisher nicht existieren, sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, um diese offene Fragestellung zu klären.

Bei den untersuchten Parametern Detritus, Sekret und Bakterien lagen weder bei den Detritus- noch bei den Bakterienmengen nachweisliche Unterschiede zwischen den Entnahmeorten vor. Gleiches gilt für Erythrozyten und neutrophile Granulozyten. Die einzige statistisch signifikante Abweichung war bei der Sekretmenge zu erkennen. Sekret kam nachweislich häufiger in den Vaginal- als in den Vestibularausstrichen vor. Das lässt sich aus anatomischer Sicht begründen. Zwar sind im Vestibulum mehrere Glandulae vestibulares in der Schleimhaut lokalisiert (RIECK und KRATZHELLER, 1955), aber das Vestibulum fällt caudal steil nach ventral ab. Produziertes Sekret kann auf natürlichem Weg abfließen. Die Vagina dagegen verläuft horizontal, was einen natürlichen Abfluss von Sekret erschwert.

Die Zellverteilung in den Ausstrichen der zwei Entnahmeorte hat sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Vestibularzytologie demnach für eine Bestimmung der Zyklusphase absolut ausreichend ist. Erhöhungen der Östrogenkonzentration spiegeln sich, wenn auch nicht so deutlich wie in der Vagina, in der Vestibularschleimhaut wieder. In dem Ausstrich lassen sich sehr gut hormonell bedingte Epithelveränderungen der Hündin nachweisen und sie dient somit ebenso als Bioassay wie auch die Vaginalzytologie. Für verschiedene Indikationen kann die Vestibularzytologie demzufolge herangezogen werden. Es können sehr gut Hündinnen angesprochen werden, die sich nicht mehr im Anöstrus, sondern im Proöstrus befinden und für die somit eine Depotgestagengabe zur Läufigkeitsunterdrückung ein erhöhtes Risiko darstellt (TAMMER et al., 1994; WEHREND, 2007). Hündinnen nach unvollständiger Kastration mit einem Ovarian Remnant Syndrom können mit der Vestibularzytologie detektiert werden, da das Restovargewebe Östrogene produziert, die an der Vestibularschleimhaut Veränderungen hervorrufen. Es können Intermediär-, Superficialzellen und Schollen nachgewiesen werden. Die Hündinnen präsentieren dann trotz erfolgter Kastration ein proöstrisches oder östrisches Zellbild. Wichtig ist, dass die Zytologie in einer Phase entnommen wird, indem die Hündin für Rüden interessant erscheint oder klinische Läufigkeitssymptome präsentiert (WEHREND, 2007; TRASCH, 2008), da nur zu diesem Zeitpunkt das Ovarrestgewebe auch Östrogenen produziert und diese nur dann indirekt mit einer Zytologie nachgewiesen werden können. Auch Ovarialzysten, Vaginitiden oder eine Pyometra können mit der Vestibularzytologie diagnostiziert werden, da die für die entsprechenden Krankheiten auftretenden zytologischen Bilder im Vestibulum repräsentativ sind (GUYANT, 1988). Neutrophile Granulozyten, wie sie bei einer Vaginitis oder bei einer offenen Form der Pyometra vorliegen, werden auch bei einer Vestibularzytologie angesprochen (GUYANT, 1988; WEHREND, 2007). Eine Hündin mit Stiller Hitze kann mit Hilfe der Vestibularzytologie sehr gut detektiert werden, da der zytologische Wechsel vom Anöstrus zum Proöstrus gut dargestellt werden kann. Aufgrund der unkomplizierten Entnahmetechnik kann ein Züchter bei der Hündin in ihrer gewohnten Umgebung eine Zytologie aus dem Vestibulum entnehmen, wie es auch schon von HOLST und PHEMISTER (2001) beschrieben wurde. Auch GUYANT (1988) schrieb, dass die Entnahme einer Zytologie nicht zwingend durch einen Tierarzt durchgeführt werden muss, und empfiehlt deshalb die Entnahme durch eine Tiermedizinische

Fachangestellte. Für die Tupferprobengewinnung aus dem Vestibulum ist kein aufwendiges Instrumentarium nötig, was die Entnahme stark vereinfacht. Nach Entnahme durch den Hundebesitzer, Ausrollen der Probe auf einem Objektträger und einer kurzen Phase der Lufttrocknung des Ausstriches kann dieser im Anschluss in einer sicheren Transportbox zu einem Tierarzt geschickt werden, der daraufhin eine weitere Bearbeitung und Auswertung der Probe durchführt. Wenn anhand der Zytologie deutlich wird, dass eine Hündin in die Zyklusphase Proöstrus übergeht, sollte sie in regelmäßigen Abständen bei einem Tierarzt vorgestellt werden, da für die korrekte Deckzeitpunktbestimmung Vaginalzytologien und Bestimmungen der Progesteronkonzentration durchgeführt werden müssen. FÁY et al. (2003) behaupten, dass häufig Untersuchungen für Fertilität und Deckzeitpunktbestimmungen nicht in ausreichendem Maße durchgeführt werden, da die Besitzer für eine Diagnostik sehr weite Strecken zurücklegen müssen, finanziell eingeschränkt sind oder zeitlich keine häufigen Tierarztbesuche einrichten können. Dem könnte mit der durch den Züchter entnommenen Vestibularzytologie entgegengewirkt werden, da aufwendige Fahrten zum Tierarzt, unnötiger Stress und hohe Kosten so vermieden werden können.

Bei der konkreten Bestimmung des Deckzeitpunktes ist die Vestibularzytologie jedoch der Vaginalzytologie unterlegen, da die Östrogenwerte hier nicht so starke und offensichtliche Veränderungen hervorrufen wie am Vaginalepithel.

Zykluseinteilung unter Berücksichtigung der Plasmaprogesteronkonzentration

Zusätzlich wurden 47 Hündinnen nach Messung der Plasmaprogesteronkonzentration anhand dieser in die entsprechenden Zyklusphasen eingeteilt und es wurden die gepaarten Zytologien aus Vestibulum und Vagina mit den Progesteronkonzentrationen verglichen.

13 (28 %) der untersuchten Hündinnen wiesen eine Progesteronkonzentration von weniger als 2 ng / ml und wurden somit in den Proöstrus eingeteilt. Die Vestibularausstriche entsprachen zytologisch weitestgehend den hormonellen Zyklusaussagen. Nur drei von 13 Ausstrichen mussten aufgrund des zytologischen Bildes statt in den Proöstrus in den Östrus eingeteilt werden. Bei den Vaginaausstrichen hingegen konnte stärkere Abweichungen beobachtet werden.

Nur fünf der 13 Proben präsentierten eine proöstrisches Zellbild, die anderen acht Ausstriche dagegen mussten aufgrund der hohen prozentualen Anteile an Superficialzellen und Schollen in den Östrus eingeteilt werden. Auch EHLERS (2000) verglich Progesteronkonzentrationen mit den dazu gehörigen Zytologien und kam zu ähnlichen Ergebnissen. Hündinnen mit einem östrischen Zellbild präsentierten in der Studie von EHLERS (2000) häufig eine Progesteronkonzentration, die für eine Belegung noch deutlich zu niedrig ($< 8 \text{ ng / ml}$) war. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Grenze zwischen zytologischem Proöstrus und zytologischem Östrus mit einem Anteil der verhornten Zellen von 90 % in dieser Studie bereits relativ hoch angesetzt ist. Bei einer niedrigeren Grenzsetzung wären erheblich mehr Ausstriche dem Östrus zugeteilt worden. LINDE und KARLSSON (1984), POST (1985), SODERBERG (1986/a) und GOODMAN (1992) definierten die Grenze bei 80 % verhornter Zellen, was in dieser Studie die Divergenzen zwischen Zytologie und Hormonprofil verstärkt hätte. Einen Wert von mindestens 90 % abgeschilferten Zellen, wie er auch in dieser Arbeit angewandt wurde, verwendeten in ihren Arbeiten auch OLSON et al. (1984), GUYANT (1988), WRIGHT und PARRY (1989), HOLST und PHEMISTER (2001) und JOHNSON (2006). DREIER (1975/a) und KUSTRITZ (2006) gingen sogar soweit und setzten einen Wert von 100 % abgeschilferten Zellen mit einem Anteil von Schollen über 50 % voraus, um die Hündinnen in den Östrus einzuordnen.

Signifikante Abweichungen in der Zellmenge konnten bei Intermediärzellen, Superficialzellen, Schollen und keratinisierten Zellen beobachtet werden. Ähnlich wie bei den Zytologien aus Vestibulum und Vagina ohne Zykluseinteilung präsentiert sich auch hier das Ergebnis. Intermediärzellen und keratinisierte Zellen kommen deutlich häufiger im Vestibulum vor. Superficialzellen und Schollen treten signifikant vermehrt in der Vagina auf. Die Gründe dafür sind, wie oben schon erwähnt, eine vermutlich bessere Reaktion der Vaginalschleimhaut auf die Erhöhung der Östrogenkonzentration im Blut, so dass durch eine schnelle Schleimhautproliferation vermehrt Superficialzellen und Schollen entstehen konnten. Die keratinisierten Zellen haben ihren Ursprung in dem Vestibulum und sind deshalb stärker präsent in den Vestibularausstrichen (HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006).

Insgesamt 23 (49 %) der 47 Hündinnen wurden anhand der Hormonanalyse in den Östrus eingeteilt. Dass ein Großteil der untersuchten Hunde sich im Östrus befand,

resultiert daraus, dass die Hündinnen in den meisten Fällen im Rahmen einer Deckzeitpunktbestimmung in der Klinik vorstellig waren. Eine Bestimmung der Progesteronkonzentration wurde bei den meisten Hündinnen erst bei einem zytologischen Bild von mindestens 50 % verhornten Zellen durchgeführt. Progesteronkonzentrationen zwischen 2 und 15 ng / ml wurden als Werte angesehen, die den hormonellen Östrus definieren (JOHNSTON et al., 2001).

Von den Vestibularausstrichen mussten mehr als die Hälfte der Proben (12 von 23 Ausstrichen) dem Proöstrus eingeordnet werden, obwohl die Hündinnen eine eindeutige Plasmalogesteronkonzentration aufwiesen, die der Zyklusphase Östrus entsprach. Bei den Vaginalausstrichen mussten nur zwei Proben einer anderen Zyklusphase zugeordnet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen, dass die Vestibularzytologie in Ovulationsnähe keine adäquate Untersuchungsmethode zur Deckzeitpunktbestimmung darstellt, was die Aussage von DREIER (1975/a) unterstützt. DREIER (1975/a) hat die Entnahme aus dem Vestibulum als Alternative zur Vaginalzytologie vorgestellt. Er gab jedoch der Vaginalzytologie eindeutig den Vorrang ohne eine Angabe von Gründen.

Das Ergebnis des Vergleichs von Vaginalzytologien mit den entsprechenden Progesteronkonzentrationen in dieser Untersuchung sind somit besser ausgefallen, als die Ergebnisse, die FÁY et al. (2003) beschrieben haben. In der Studie wurden bei 207 Hündinnen Vaginalzytologie und Progesteronkonzentration mittels ELISA-Test verglichen. Bei einer Progesteronkonzentration von 7 ng / ml präsentierten 20 % der Hündinnen ein proöstrisches beziehungsweise frühöstrisches Zellbild. HIEMSTRA et al. (2001) berichten in einer Studie, dass nur bei 28 % der Hündinnen anhand der Vaginalzytologie der korrekte Deckzeitpunkt bestimmt werden konnte. LINDE und KARLSSON (1984) untersuchten 22 Hündinnen, von denen sechs (27 %) Tiere erst zwei bis drei Tage nach einer ovulatorischen Progesteronkonzentration eine östrische Vaginalzytologie präsentierten.

Von einer alleinigen Vaginalzytologie für die Ovulationsbestimmung ist abzuraten. Sie sollte immer mit einer Bestimmung der Progesteronkonzentration kombiniert werden (WRIGHT, 1990). Jedoch bringt die Vaginalzytologie in dieser Studie sehr viel bessere Ergebnisse als die Vestibularzytologie. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei den Intermediärzellen, Schollen und keratinisierten Zellen beobachtet. Wie in den vorherigen Ergebnissen kamen auch hier mehr Schollen in

den Vaginaausstrichen als in den Vestibularzytologien vor, wohingegen die keratinisierten Zellen und die Intermediärzellen vermehrt in den Vestibularausstrichen vorhanden waren. Die Vaginaausstriche waren in der zytologischen Bewertung bereits viel weiter fortgeschritten als die Vestibularzytologien, was die These der besseren Wirkung einer erhöhten Östrogenkonzentration an der Vaginalschleimhaut aus den vorangegangenen Abschnitten unterstreicht.

Neun (19 %) der 47 Hündinnen wiesen eine Plasmaprogesteronkonzentration von mehr als 15 ng / ml auf und wurden somit in den Metöstrus eingeteilt. Sowohl fünf Hündinnen aus der Vestibular- als auch fünf Hündinnen aus der Vaginalgruppen wiesen den Hormonwerten entsprechende Zellbilder auf. Die vier anderen Hunde aus der Gruppe der Vaginalzytologien präsentierten trotz Progesteronkonzentrationen von weit über 15 ng / ml noch ein östrisches Zellbild. Bei den Vestibularzytologien musste sogar bei zwei Hündinnen anhand der Zytologie von einem Proöstrus ausgegangen werden. Auch hier zeigt sich, dass die Vaginalschleimhaut schneller im Zyklusgeschehen voranschreitet als die Vestibularschleimhaut. Nur zwei Hündinnen zeigten Abweichungen zwischen Vestibular- und Vaginalzytologien. Bei diesen Tieren präsentierten beide Vaginaausstriche ein östrisches Bild und beide Vestibularzytologien ein proöstrisches Zellbild. Auffällig ist, dass im Metöstrus die vom Progesteronwert abweichenden Zytologien aus Vagina und Vestibulum, anders als die Zytologien im Proöstrus, noch nicht so weit fortgeschritten sind wie die Hormonkonzentrationen der Tiere es eigentlich vermuten lassen würden.

Nur zwei der 47 Hündinnen befand sich im Anöstrus. Wie bereits erwähnt, wurden die meisten Hündinnen im Proöstrus oder im Östrus vorgestellt. Das erklärt die sehr kleine Probenzahl der anöstrischen Tiere. Sowohl die Vestibular- als auch die Vaginalzytologie präsentierten ein identisches Zellbild, was eindeutig dem Anöstrus entsprach. Eine statistische Auswertung konnte anhand der kleinen Probenzahl nicht durchgeführt werden.

5.3.2 Einfluss von trockenen und feuchten Tupfern

Zytologische Untersuchungen

Bei der vorangegangenen Literaturrecherche wurde bereits deutlich, dass es verschiedene Methoden und Geräte gibt, um Zellmaterial für einen Ausstrich zu gewinnen. Einige Autoren bevorzugen eine Drahtöse, um mit dieser Zellmaterial vom Vaginaldach zu entnehmen (RIECK und KRATZHELLER, 1955; DREIER (1975/a und b; TAMMER et al., 1994). Auch eine Aspiration von Zellmaterial wird von einigen Autoren praktiziert (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; ALLEN, 1985; GÜNZEL-APEL et al., 1999; JOHNSON, 2006). Einige von ihnen empfehlen die Aspiration von Zellmaterial nur bei Hündinnen mit trockener Schleimhaut. Der Großteil der Autoren verwendete Wattetupfer, entweder in trockener Form (SIMMONS, 1970; CHRISTIE et al., 1972; BELL et al., 1973; DORE, 1978; BRUNNER, 1983; TAMMER et al., 1994; HOLST und PHEMISTER, 2001; WEHREND, 2007; TRASCH, 2008) oder mit isotonischer Kochsalzlösung benetzt (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; HIEMSTRA et al., 2001; HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006). Auch bei dieser Methode berichten einige Autoren von der Notwendigkeit eines angefeuchteten Tupfers nur, falls die Hündin zu geringe Mengen Vaginalsekret besitzt. Es konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Hündinnen die angefeuchteten Wattetupfer in den Zyklusphasen Anöstrus und Metöstrus besser tolerierten und weniger Abwehrbewegungen zeigten als bei der Verwendung von trockenen Tupfer.

Die gepaarten Tupferproben der insgesamt 106 beprobten Hündinnen waren allesamt auswertbar. Ein sehr deutlicher Unterschied lag in der Zellmenge pro Gesichtsfeld vor. Mit den feuchten Tupfer konnten eine deutliche größere Menge an Zellen auf den Objektträger aufgetragen werden. Es bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellmenge zwischen trocken und feucht entnommenen Tupfern. Das Ergebnis bestätigt die von MERKT et al. (1980) aufgestellte Theorie. Die Autoren gingen davon aus, dass trockene Tupfer feuchtigkeitsabstoßend wirken und deshalb schlechter Genitalsekret aufnehmen. Die Menge an aufgenommenem Zellmaterial erhöht sich demnach mit feuchten Tupfern (WAELCHI et al., 1988; DASCANIO, 2003). Zusätzlich soll sich sowohl die Qualität, als auch die Struktur und

Intaktheit der gewonnenen Zellen erhöhen (MERKT und VON LEPEL, 1970; WAELCHI et al., 1988; DASCANIO, 2003).

Die einzelnen Zelltypen zeigen größtenteils keine Unterschiede bezüglich ihrer Menge bei den unterschiedlichen Entnahmemethoden. Nur bei den Intermediärzellen lagen Differenzen vor; jene waren statistisch signifikant häufiger bei den trocken entnommenen Zytologien nachweisbar. Eine Erklärung dafür konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Es lag bei allen Zellarten eine positive Korrelation vor, die statistisch signifikant war. Einzige Ausnahme bildeten die keratinisierten Zellen, die in vereinzelt Ausstrichen vorkamen und vermutlich nur auf technische Mängel bei der Entnahme hinwiesen.

In Bezug auf das Vorkommen von Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Demnach verursachte die trockene Entnahmemethode keine makroskopischen Läsionen in der Schleimhaut, jedoch war der trockene Tupfer für eine Hündin mit trockener Vaginalschleimhaut deutlich unangenehmer bei der Entnahme. In den trocken entnommenen Proben waren mit statistischer Signifikanz häufiger die Parameter Bakterien, Sekret und Detritus als bei feuchten Tupfern zu finden. Möglicherweise bewirkt die zur Benetzung der Tupfer verwendete isotonische Kochsalzlösung am Wattekopf zu einem Verdünnungseffekt.

Ein weiterer Aspekt sind die in Ausstrichen vorgefundenen Wattefäden. DREIER (2010) bevorzugte die Drahtöse im Vergleich zu dem Wattetupfer, weil bei der Entnahme mit einer Drahtöse keine Watteanteile in den Ausstrich gelangen. In dieser Studie konnte deutlich gemacht werden, dass die Entnahme mit einem feuchten Tupfer diese Watteanteile in den Ausstrichen um ein Vielfaches im Vergleich zur trockenen Entnahme reduzieren konnte. Die Menge der Wattefäden in den Ausstrichen zeigt eine geringe positive Korrelation, so dass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass möglicherweise die Ausrolltechnik einen Teil dazu beiträgt. Jedoch muss erwähnt werden, dass die Watteanteile in den Ausstrichen das zytologische Zyklusbild nicht negativ beeinträchtigen.

Der Anteil der freien Zellkerne ohne Zytoplasmasaum war in den feucht entnommenen Tupferproben statistisch signifikant sehr viel höher. Das widerlegt die Aussage von MERKT und VON LEPEL, (1970), WAELCHI et al. (1988) und DASCANIO (2003), welche behaupteten, dass befeuchtete Tupfer die Unversehrtheit

der gewonnenen Zellen erhöhen. Die positive Korrelation der freien Zellkerne bei trocken und feucht entnommenen Tupfern ist hochsignifikant, so dass in Betracht gezogen werden muss, dass die jede Hündin individuell am Vorkommen der freien Zellkerne beteiligt ist. BRITTON (1982) und OLSON et al. (1984) sahen als Erklärung für Verformungen und Zelldeformationen ein zu straffes Ausrollen der Tupferproben an, nicht jedoch die Beschaffenheit der Tupfer.

Die Zellen lagen in den feuchten Ausstrichen vermehrt in Nesterformation, in den trocken hergestellten Ausstrichen dagegen vermehrt einzeln vor. Dies könnte auf die Zellmenge zurückgeführt werden, da mittels feuchter Tupfer sehr viel größere Zellmengen gewonnen werden konnten und die Zellen somit schneller eine Nesterformation bilden können. BRITTON (1982) gab an, dass ein zu vorsichtiges Ausrollen der Tupfer zu vermehrter Häufchenbildung der Zellen führt. Dass nicht allein die Ausrolltechnik, wie von BRITTON (1982) behauptet, sondern auch die Beschaffenheit des Wattetupfers eine Rolle für die Anordnung der Zellen spielt, konnte erstmalig mit dieser Studie gezeigt werden.

Die Zykluseinteilung zeigte bei den gepaarten Proben sehr viele Übereinstimmungen. Von den insgesamt 106 Hündinnen präsentierten 104 (98 %) Hündinnen in den trocken und in den feucht entnommenen Ausstrichen ein ähnliches zytologisches Bild und wurden in die gleiche Zyklusphase eingeordnet. Für die Ansprechbarkeit der Zyklusphase ist es folglich irrelevant, ob der Tupfer feucht oder trocken für die Zytologiegewinnung genutzt wird.

5.3.3 Einfluss von unterschiedlichen Fixierungsmethoden

Zytologische Untersuchungen

Bei 106 Hündinnen wurde unter Verwendung gepaarter Vaginalesstriche die Fixierung mit einem Zytologiespray (Merckofix[®], Fa. Merck) mit einer Lufttrocknung verglichen.

Bezüglich der Menge an unterschiedlichen Zellarten konnte in den gepaarten Ausstrichen kein Unterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis war allerdings zu

erwarten, da das Spray die bereits auf dem Objektträger vorhandenen Zellen fixieren soll und nicht zu einer besseren Entnahmetechnik beitragen kann.

Erythrozyten und neutrophile Granulozyten wiesen mengenmäßig keine Unterschiede beim Vergleich beider Fixierungsmethoden auf. Anders verhielten sich die Parameter Sekret und Bakterien, welche jeweils in den luftgetrockneten Zytologien in größeren Mengen vorkamen als in den sprayfixierten Ausstrichen. Durch das Auftragen des Zytologiesprays kann möglicherweise eine Verdünnung des Ausstrichmaterials verursacht werden, was zu einer Verringerung der Menge von Bakterien und Sekret im mikroskopischen Bild führt. Für die Beurteilung der Zellen und eine korrekte Einteilung in die entsprechenden Zyklusphasen ist dieser Aspekt jedoch nicht von Bedeutung. Für eine Beurteilung der Ausstriche aus zuchthygienischer Sicht, wie sie unter anderem von DREIER (1975/a) beschrieben wird, wäre es von Nachteil, wenn die Menge der Bakterien auf dem Objektträger verdünnt wird, da die Gefahr eines falsch negativen Befundes besteht.

Sowohl bei den freien Zellkernen als auch bei den Parametern Detritus, Erythrozyten und neutrophile Granulozyten konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Fixierungsmethoden festgestellt werden. Alle bisher aufgeführten Parameter stehen in einer statistisch signifikanten positiven Korrelation zueinander. Von aufgerollten Zellrändern waren in erster Linie die größeren Zellen betroffen. Hier lag ein deutlicher Unterschied im Bezug auf die Menge vor. Die aufgerollten Zellränder konnten sehr viel häufiger in den luftgetrockneten Ausstrichen nachgewiesen werden. Dass ohne sofortige Fixierung Zellalterationen möglich sind, beschreibt auch die Produktinformation des Fixiersprays Merckofix[®] der Firma Merck. Probleme bei der Zuordnung in die korrekte Zyklusphase traten jedoch trotz aufgerollter Zellränder nicht auf.

Die Zellverteilung blieb trotz der unterschiedlichen Fixierungsmethoden ohne Unterschiede. Gleiches galt für die Zellmenge pro Gesichtsfeld. Da auch hier keine Unterschiede zu finden waren, schien bei den Zellen kein Verdünnungseffekt stattzufinden.

Insgesamt 105 (99 %) der 106 untersuchten Hündinnen präsentierten in den gepaarten Zytologieausstrichen (Lufttrocknung im Vergleich zur Sprayfixierung) ein Zellbild einer identischen Zyklusphase. Somit ist es für die Einteilung in die

entsprechenden Zyklusabschnitte nicht relevant, ob die Ausstriche für einige Tage Lagerungszeit mit einem Zytologiespray fixiert werden. Auf die Anwendung eines Fixiersprays kann bei einer Lagerung von nur wenigen Tagen verzichtet werden.

Zellgrößen im Vergleich

Das Zytologiespray Merckofix[®] schützt nach Angaben in der Produktinformation der Firma Merck die Zellen vor Austrocknung und vor dadurch bedingten Veränderungen der Zellform. In dieser Studie konnten bei Betrachtung der zwei unterschiedlichen Fixierungsmethoden keine Unterschiede in der Zellgröße festgestellt werden. Nur die Kernfläche der Superficialzellen wies statistisch signifikante Unterschiede auf. Die Kernfläche der Superficialzellen präsentierte sich in den luftgetrockneten Ausstrichen größer als in den sprayfixierten Ausstrichen. Jedoch muss erwähnt werden, dass die Superficialzellen die Zellart mit der größten Varianz in der Kerngröße darstellen und somit der Einfluss der Fixierungsmethode eine eher untergeordnete Rolle spielt. Hinzu kommt, dass in den gepaarten Ausstrichen nur eine identische Menge an Superficialzellen, nicht aber die gleichen Zellen vermessen wurden. So kann es sein, dass in einem Ausstrich vermehrt Superficialzellen mit großen Kernen und in dem anderen Ausstrich vermehrt Superficialzellen mit pyknotischen Kernen ausgemessen wurden. Diese Veränderungen der Kerngröße sind für die Interpretation der Vaginalzytologie irrelevant.

Es muss allerdings erwähnt werden, dass das Spray laut Hersteller besonders für solche Präparate von großer Bedeutung ist, die im Anschluss nach der Entnahme nach Papanicolaou gefärbt werden sollen. In dieser Studie wurde für die Lufttrocknung aus bereits erwähnten Gründen eine Zeit von vier Tagen veranschlagt. Es ist jedoch gut möglich, dass es zu deutlicheren Zellveränderungen nach einer längeren Trocknungszeit ohne Fixierung kommen kann. Um das beurteilen zu können, müssten jedoch weiterführende Untersuchungen angeschlossen werden.

5.3.4 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei mehreren Untersuchern

Es nahmen 107 Studierende aus dem 6. und dem 8. Semesters an dieser Studie teil. Von jedem Teilnehmer mussten insgesamt 24 Ausstriche untersucht und anschließend in die entsprechenden Zyklusphasen eingeteilt werden.

Zwischen den Zytologien, einmal aus der Vagina und einmal aus dem Vestibulum derselben Hündin entnommen, gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die meisten korrekten Einteilungen haben Ausstriche von einer im Östrus befindlichen Hündin erfahren. Der Östrus stellte auch die Zyklusphase mit den meisten Übereinstimmungen trotz unterschiedlicher Entnahmeorte dar. Die Ausstriche, die bei einer Hündin im Proöstrus entnommen wurden, wiesen bezüglich der Zykluseinteilung die geringsten Übereinstimmungen auf. Die Zytologie, welche aus dem Vestibulum stammte, verfügte mit 76 % über mehr richtige Antworten bei der Zykluseinteilung als die vaginal entnommene Probe (64 %).

Die Zytologien, die vergleichend mit trockenen und feuchten Tupfern entnommen wurden, konnten keinen hohen Anteil an übereinstimmenden Antworten präsentieren. Statistisch signifikante Unterschiede in den Antworten lagen bei den Proben aus Pro-, Met- und Anöstrus vor. Lediglich die Zytologien, die bei einer Hündin im Östrus entnommen wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zykluseinteilung. Auch in dieser Versuchsreihe hatten die gepaarten Ausstriche der Hündin im Östrus die meisten korrekten Einteilungen erhalten. Auch EHLERS (2000) wies nach, dass Zytologien, die im Östrus entnommen wurden, von unterschiedlichen Untersuchern am besten angesprochen und richtig erkannt wurden. In den Zyklusphasen Metöstrus und Anöstrus erbrachten die feucht entnommenen Tupfer deutlich bessere Ergebnisse bezüglich einer richtigen Zuordnung (84 % im Metöstrus und 79 % im Anöstrus) im Vergleich zu den trockenen Tupfern (64 % und 42 %). Im Anöstrus lagen bei den feucht entnommenen Proben fast doppelt so viele richtige Antworten wie bei den trocken entnommenen Tupferproben vor. Metöstrus und Anöstrus stellen Zyklusphasen dar, in denen kaum Vaginalfluor vorhanden ist und die Schleimhaut der Hündin relativ trocken ist. Einige Autoren (SIMMONS, 1970; BRUNNER, 1983; GÜNZEL und KOIVISTO, 1984; HIEMSTRA et al., 2001; HOLST und PHEMISTER, 2001; JOHNSON, 2006) vertraten die Meinung, dass sich bei entsprechenden Hündinnen feuchte Tupfer besser für eine Probenentnahme eignen als trockene Tupfer. Das konnte in diesem Versuch bestätigt werden. Die Hauptursache in der besseren Bewertung und Einteilung in die entsprechende Zyklusphase wird vermutlich in der deutlich höheren Zellmenge liegen, die mit feuchten Tupfern gewonnen werden konnte.

Bei den luftgetrockneten Ausstrichen im Vergleich zu den sprayfixierten Ausstrichen zeigten die gepaarten Zytologien, die bei einer Hündin im Östrus entnommen wurden, die einzigen statistisch signifikanten Unterschiede. Es wurden 86 % der sprayfixierten und 96 % der luftgetrockneten Ausstriche richtig als Östrus eingeteilt. Warum die Zytologien im Östrus in diesem Versuch die größte Differenz erzielten, ist unklar. Jedoch sind die korrekten Antworten mit 86 % und 96 % insgesamt als gut einzustufen.

Die meisten korrekten Zykluseinteilungen haben die Proben der Hündin im Proöstrus erhalten. Insgesamt war bei dem Vergleich der Lufttrocknung mit der Sprayfixierung aufgefallen, dass die Übereinstimmung in den Antworten sehr hoch war und, außer bei den Östruszytologien, um maximal eine korrekte Antwort von einander abweicht. Dadurch wird deutlich, dass das zytologische Bild durch die Lufttrocknung oder die Sprayfixierung nicht beeinflusst wird.

Auch wenn die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht in allen der hier durchgeführten Vergleichsuntersuchungen sehr hoch ausfällt, so wurde trotzdem deutlich, dass es bestimmte Methoden gibt, die besser für die Interpretation der Zyklusphasen geeignet sind. Es lassen sich meistens Zytologien aus dem Östrus besser ansprechen als die Zytologien aus anderen Zyklusphasen. Mit den feucht entnommenen Proben kann mehr Zellmaterial gewonnen werden, was besonders bei der mikroskopischen Untersuchung von Zytologien aus Metöstrus und Anöstrus wichtig ist. Für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Untersuchung ist jedoch, abgesehen von den unterschiedlichen zytologischen Bildern, eine Vielzahl von Gründen zu nennen. Die Studierenden erhielten zwar alle eine identische kurze Einführung und die gleichen Unterlagen zur Unterstützung, jedoch haben sich einige Teilnehmer zusätzlich noch ausführlicher auf die Versuchsteilnahme vorbereitet. Einige konnten sich noch sehr gut an bereits Erlerntes erinnern. Allen gemeinsam war jedoch die fehlende Erfahrung. Anhand der Fehlerquoten und der Anzahl richtiger Antworten konnte nicht zwischen dem 6. und dem 8. Semester unterschieden werden.

Wie wichtig die korrekte Einarbeitung und Übung bei der Zytologieentnahme ist, bemerkten MOKATE et al. (2006), die bei einer Studie Schwächen in dem theoretischen Wissen und den praktischen Fähigkeiten von Humanmedizinern

feststellten. In der Humanmedizin sind standardisierte Schulungen für die Entnahme von Zervikalzytologien schon lange fest etabliert (MOKATE et al., 2006).

Aufgrund der hohen Gesamtzahl der Ausstriche in diesem Versuch hat sich vermutlich nicht jeder Untersucher gleichviel Zeit bei der Durchmusterung der einzelnen Zytologien genommen und nicht immer fand eine mäanderförmige Durchmusterung der Ausstrich statt. Dadurch konnten zyklusspezifische Zellmuster übersehen werden und es erfolgte dadurch möglicherweise eine Einteilung in die falsche Zyklusphase. Hinzu kommt der nicht unwesentliche Aspekt der Subjektivität der einzelnen Untersucher, den auch EHLERS (2000) bei der Beurteilung des Gesamtausstriches durch verschiedene Personen diskutierte. Doch auch mit einem standardisierten Untersuchungsverfahren für die Zytologie konnte EHLERS (2000) dieser Subjektivität nicht entgegen wirken.

5.4 Schlussbetrachtung und Fazit für die Praxis

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Entnahmeorte und Entnahmemethoden für die Gewinnung einer Zytologie aus dem Vestibulovagnialkanal der Hündin verglichen. Es konnten sowohl Vorteile als auch Nachteile der einzelnen Methoden aufgezeigt werden.

Die in der Praxis oft angewandte Schnellfärbemethode (Hemacolor[®]) kann für die Zytologien aus Vagina und Vestibulum gut übernommen werden, da die Färbung absolut ausreichende Ergebnisse erzielt.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich die Entnahme einer Zytologie aus dem Vestibulum ebenso gut zur Darstellung der Zyklusphasen eignet wie die Vaginalzytologie. Mit einer Tupferprobenentnahme aus dem Vestibulum ist es möglich, ohne instrumentellen Aufwand gute Zytologien zu gewinnen. Vestibularzytologien können so auch von Tiermedizinischen Fachangestellten oder von Züchtern entnommen werden. Letzteres hat den Vorteil, dass die Zytologien, zum Beispiel im Rahmen einer Reihenuntersuchung der Hündin Zuhause entnommen werden können. So können aufwendige und für die Hündin manchmal unangenehme Fahrten zum Tierarzt vermieden werden. Anhand der Vergleiche der Vestibularzytologien mit den Vaginaausstrichen und den Progesteronkonzentrationen der Hündinnen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich

die Vestibularzytologie für die Deckzeitpunktbestimmung nicht eignet. Im Rahmen der Deckzeitpunktbestimmung sollte die Vaginalzytologie mit einer Messung der Progesteronkonzentration kombiniert werden.

Es konnte dargestellt werden, dass sich angefeuchtete Tupfer besser für die Gewinnung von Zytologien bei Hündinnen mit einer trockenen Vaginalschleimhaut, wie es im Metöstrus und Anöstrus häufig der Fall ist, eignen. Durch eine höhere Menge an gewonnenem Zellmaterial können die Epithelzellen leichter angesprochen werden. Für eine quantitative Bestimmung der Bakterien eignet sich die Entnahme mit feuchten Tupfern allerdings nicht, da die Bakterienmenge durch die isotonische Kochsalzlösung herabgesetzt wird.

Eine Anwendung von Zytologiespray ist für einen kurzen Zeitraum ohne Fixierung nicht zwingend erforderlich. Zu längeren Lagerungszeiten über vier Tage ohne Zytologiespray und ohne Fixierung kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden.

6 Zusammenfassung

Die Vaginalzytologie ist seit vielen Jahrzehnten ein fester Bestandteil der Deckzeitpunktbestimmung bei der Hündin. In der Literatur gibt es eine Vielzahl von Aussagen hinsichtlich der Entnahmetechnik und weiteren Bearbeitungsmethoden der Zytologie. Mit Hilfe dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Standardisierung der Entnahme der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin geleistet werden. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es herauszufinden, inwieweit die Entnahme der Zytologie und die anschließende Fixierung verbessert werden können.

Vergleichend betrachtet wurden in dieser Arbeit die folgenden Aspekte:

- Entnahmeort Vagina - Entnahmeort Vestibulum
- Entnahme mit trockenem Tupfer . Entnahme mit feuchtem Tupfer
- Sprayfixierung . Lufttrocknung mit anschließender Zellvermessung
- Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern

Insgesamt wurden von 332 Hündinnen gepaarte Zytologien entnommen. Die Färbung der Zytologien erfolgte mit einer praxistauglichen Schnellfärbung (Hemacolor[®], Merck). Zusätzlich wurde bei 47 Hündinnen im Rahmen des Vergleiches der Entnahme aus Vagina und Vestibulum die Messung der Plasmaprogesteronkonzentration mittels Immunoanalyzer (mini Vidas[®], bio Meriéux) im klinikeigenen Labor durchgeführt.

Folgende relevanten Ergebnisse konnten erhoben werden:

Einfluss der Entnahmeorte Vestibulum und Vagina auf die Auswertung der exfoliativen Zytologie:

- In den Zytologien aus dem Vestibulum waren signifikant mehr keratinisierte Zellen enthalten ($p < 0,0001$), die die Ansprechbarkeit der Zyklusphase jedoch in keinsten Weise behinderten.

- Basalzellen ($p = 0,0078$) und Schollen ($p < 0,0001$) konnten häufiger in Vaginalesstrichen detektiert werden. Intermediärzellen kamen dagegen vermehrt in den Vestibularausstrichen vor ($p < 0,0001$).
- Sekret kommt häufiger in den Vaginal- als in den Vestibularausstrichen vor ($p = 0,032$).
- Bei der Einteilung in die entsprechenden Zyklusphasen kam es lediglich in der Zyklusphase Östrus zu Abweichungen im zytologischen Bild. Während die Vaginalzytologien ($n = 46$) bereits alle ein östrisches Bild präsentierten, konnte in fast der Hälfte ($n = 20$) der Vestibularzytologien noch ein proöstrisches Zytologiebild nachgewiesen werden.
- Im Vergleich der gepaarten Zytologien mit der Progesteronkonzentration zeigte die Vaginalzytologie mehr Übereinstimmungen mit den Progesteronkonzentrationen als die Vestibularzytologie. Besonders deutlich konnte die Abweichung im Östrus beobachtet werden: Bei einer östrischen Progesteronkonzentration präsentierten 91 % der Vaginalzytologien ein östrisches Zellbild, was jedoch nur bei 48 % der Vestibularausstriche der Fall war. Die übrigen Vestibularzytologien präsentierten trotz östrischen Progesteronkonzentrationen ein proöstrisches Zellbild.
- Für eine korrekte Deckzeitpunktbestimmung eignet sich die Vestibularzytologie nicht, da die Vestibularschleimhaut nicht so schnell auf eine Östrogenkonzentrationserhöhung im Blut reagiert wie jene in der Vagina.

Einfluss von trockenen und feuchten Tupfern auf die Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie:

- Die Zellmenge pro Gesichtsfeld war bei feucht entnommenen Zytologien deutlich höher ($p < 0,0001$).
- Bakterien, Detritus und Sekret konnten deutlich weniger in feucht entnommenen Ausstrichen dargestellt werden ($p < 0,0001$).
- Freiliegende Zellkerne konnten signifikant mehr in den feucht entnommenen Zytologien nachgewiesen werden ($p < 0,0001$).
- Wattefäden waren deutlich mehr in den trocken entnommenen Zytologien vorhanden ($p < 0,0001$), haben die Interpretation jedoch nicht negativ beeinträchtigt.

Zusammenfassung

- In den trocken gewonnenen Zytologien lagen die Zellen vermehrt einzeln vor, in den feucht entnommenen Ausstrichen dagegen öfter in einer Nesterformation ($p = 0,003$).
- 98 % der gepaarten Zytologien, die mit trockenen und feuchten Tupfern entnommen wurden, präsentierten identische Zyklusphasen.

Einfluss von unterschiedlichen Fixierungsmethoden nach Entnahme auf die Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie:

- Es wurden keine Unterschiede in der Menge der Zellen festgestellt.
- In den luftgetrockneten Ausstrichen waren mehr Bakterien und Sekret vorhanden als in den sprayfixierten Zytologien ($p = 0,0005$).
- Zellen mit aufgerollten Zellrändern wurden vermehrt in den Ausstrichen nachgewiesen, die nicht sprayfixiert wurden ($p = 0,0011$).
- 99 % der gepaarten Zytologien, die nach Entnahme mit Spray fixiert oder einer Lufttrocknung unterzogen wurden, präsentierten in ihren zytologischen Bildern die gleichen Zyklusphasen.
- Bei der Zellvermessung der gepaarten Ausstriche zeigte lediglich die Kerngröße der Superficialzellen Abweichungen. Die Kernfläche in den luftgetrockneten Ausstrichen war im Mittel größer als die in den sprayfixierten Ausstriche ($p = 0,038$).

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern:

- Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Entnahmeorte traten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Zykluseinteilung auf.
- Im Vergleich der trockenen und feuchten Tupfer wurden die Zytologien aus dem Proöstrus besser nach Entnahme mit den trockenen Tupfern erkannt ($p = 0,0016$). Im Met- und im Anöstrus zeigten die feucht entnommenen Tupfer eine höhere Reproduzierbarkeit bei der korrekten Zykluseinteilungen (MÖ: $p = 0,0045$; AÖ: $p < 0,0001$).
- Im Vergleich der luftgetrockneten und sprayfixierten Ausstriche konnten die luftgetrockneten Ausstriche im Östrus besser angesprochen werden ($p = 0,034$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Zytologien aus dem Vestibulum der Hündin einen adäquaten Ersatz für die Vaginalzytologie darstellen. Sie können ohne einen instrumentellen Aufwand gewonnen werden und repräsentieren das zyklische Geschehen bei der Hündin sehr gut. Allerdings ist die Vestibularzytologie nicht dazu geeignet, den optimalen Deckzeitpunkt zu detektieren, da die Veränderungen einer erhöhten Östrogenkonzentration nicht so ausgeprägt sind wie am Vaginalepithel der Hündin. Die etablierten Methoden der Vaginalzytologie in Kombination mit der Progesteronkonzentrationbestimmung bleiben der *sGoldstandard* für die Deckzeitpunktbestimmung.

Mit befeuchteten Tupfern können größere Zellmengen gewonnen werden und das Ausstrichhintergrundbild erscheint klarer, da Bakterien, Detritus, Sekret und Wattefäden in geringeren Mengen als in den trockenen entnommenen Ausstrichen vorliegen. Eine Fixierung mit Zytologiespray ist bei einer Lagerung bis zu vier Tagen nicht zwingend notwendig, liefert aber schönere Zellbilder ohne aufgerollte Zellränder.

7 Summary

Vaginal cytology has been an inherent part of determining the optimum time for insemination in bitches for several decades. Veterinary literature addresses any number of techniques to collect specimens for cytological analysis and the subsequent method of processing. This paper aims to contribute to the introduction of standardization of the method of collection of an exfoliative vaginal cytology specimen from a bitch. The investigation was designed to discover the extent to which the collection and fixation of a cytology specimen could be improved.

The investigation compared the following:

- collection from the vagina . collection from the vestibule
- collection with a dry swab . collection with a damp swab
- spray fixation . air drying followed by measurement of cells
- replicability of the results produced by different examiners

Paired smears were collected from 332 bitches. The cytology specimens were stained using an efficient and rapid staining method (Hemacolor®, Merck). As part of the investigative analysis of smears from the vagina and vestibule, the plasma progesterone concentration was also measured in the clinic's own laboratory using an immuno assay analyzer (mini Vidas®, bio Meriéux).

The following relevant results were documented:

Influence of the site for obtaining the smear, vestibule or vagina, on the analysis of exfoliative cytology specimens:

- Smears from the vestibule contained significantly more keratinized cells ($p < 0.0001$), which however, only minimally reduce the responsiveness of the cycle phase.
- Basal cells ($p = 0.0078$) and squames ($p < 0.0001$) could be detected more frequently in vaginal smears. Intermediate cells occurred more frequently in vestibule smears ($p < 0.0001$).
- Secretion was present more frequently in the vaginal smears than the vestibule smears ($p = 0.032$).

- After separation into the different cycle stages, only the estrus phase showed any deviations in the cytological findings. Whereas the vaginal cytology specimens (n = 46) all presented the estrus phase, nearly half (n = 20) of the vestibule smears also presented a proestrus cytological image.
- Comparison of the paired smears with the progesterone concentration analyses produced greater conformity of the vaginal smears with the progesterone concentrations than the smears from the vestibule. The difference between the two sites was more apparent in the estrus phase. For one concentration of progesterone, 91% of the vaginal cytology specimens indicated the estrus phase, compared with only 48% of the vestibule smears. The remaining smears from the vestibule showed a proestrus image, even though the progesterone concentration indicated an estrus cell phase.
- Smears from the vestibule is unsuitable for correct determination of the optimum time of mating as the vestibule mucous membrane does not react as quickly to an increase in the concentration of estrogen in the blood as the vaginal mucous membrane.

Influence of dry and damp cotton swabs on analysis of the exfoliative vaginal cytology:

- The quantity of cells per field of view was significantly greater for a damp swab cytologic specimen ($p < 0.0001$).
- Bacteria, detritus and secretion were significantly less represented in smears collected with a damp swab ($p < 0.0001$).
- Exposed cell nuclei were significantly more in evidence in the damp cytological specimens ($p < 0.0001$).
- Cotton wool fibers occurred significantly more frequently in smears collected with a dry swab ($p < 0.0001$), but did not however negatively affect the interpretation.
- Isolated cells were found more frequently in the dry swab cytology specimens and nested formations of cells more frequently found in the specimens collected with a damp swab ($p = 0.003$).
- 98 % of the paired cytology specimens, collected both with a dry and damp swab, presented identical cycle phases.

Summary

The effect of fixation method on analysis following collection of the exfoliative vaginal cytology specimens:

- No difference in the quantity of cells was established.
- There were more bacteria and secretion present in the air dried smears than in the spray fixed cytologic specimens ($p = 0.0005$).
- There were more cells with folded cell margins confirmed in the smears which were not fixed by spray ($p = 0,0011$).
- 99 % of the paired cytologic specimens, which had been spray fixed after collection or air dried, displayed the same cycle phase in the cytologic images.
- Measurement of the cells from the paired smears showed deviations only in the size of the nucleus of the superficial cells. The surface area of the nucleus of the air dried smears was on average larger than that of the spray fixed smears ($p = 0.038$).

Replicability of the results for different investigators:

- Comparison of the different collection sites (vagina . vestibule) produced no statistically significant differences in the cycle classification.
- Comparison of the dry and damp swabs indicates that the smears from the proestrus phase were easier to identify when collected with a dry swab ($p = 0.0016$). The specimens collected with a damp swab showed a higher replicability of correct cycle classification ($p = 0.0045$; $p < 0.0001$) in the diestrus and anestrus phases.
- Comparison of the air dried and spray fixed smears showed better responsiveness of the air dried smears in the estrus phase ($p = 0.034$).

The results of the study show that cytology specimens from the vestibule of a bitch are an adequate replacement for vaginal cytology specimens from bitches. Such specimens can be collected without the complex use of instruments and depict the cyclical changes in a bitch very well. However, vestibule cytology is not suitable for detecting the optimum insemination time as changes in the raised estrogen concentration are not as pronounced as in the vaginal epithelium of the bitch. Conventional vaginal cytology methods in combination with progesterone

concentration determination remain the gold standard in detecting the optimum time for insemination. A larger quantity of cells can be collected with damp swabs and the smear background is clearer as bacteria, detritus, secretion and cotton wool fibers are not as prevalent as in dry collected smears. Fixation with cytology spray is not strictly necessary, but does produce better images of cells without folded cell margins.

8 Anhang

Interpretation der Vaginal- und Vestibularzytologien

Proöstrus (PÖ):	viele Erythrozyten Parabasalzellen Intermediärzellen vereinzelt Superfizialzellen
Östrus (O):	> 90 % Superfizialzellen und Schollen wenig bis keine Erythrozyten Hintergrund klar deutliche Nesterbildung
Metöstrus (MO):	Parabasalzellen Intermediärzellen vereinzelt Superfizialzellen viele neutrophile Granulozyten
Anöstrus (AO):	insgesamt wenig Zellen Parabasalzellen Intermediärzellen

Zelltyp	Parabasalzellen	Intermediärzellen	Superfizialzellen	Schollen	Nesterbildung	Erys	NG
PÖ	++	++	+ / -	-	-	+++	+ / -
Ö	-	+	+++	+++	+++	+ / -	-
MÖ	+	++	+ / -	-	-	+ / -	+++
AÖ	+++	+++	-	-	-	+ / -	+ / -

Abbildung 38: Hilfsblatt zur Interpretation der Vestibular- und Vaginalzytologien für die anschließende Einordnung der Ausstriche in die entsprechende Zyklusphase.

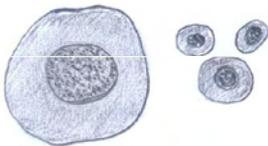
Kurzbeschreibung der Zelltypen in Vestibular- und Vaginalzytologien



Basalzellen

Runde bis zylindrische Form, mit randständigem Kern. Schmäler Zytoplasmasaum.

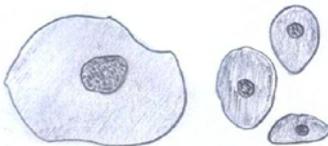
Größe: 10 – 20 µm



Parabasalzellen

Runde bis ovale Zellen mit mittelständigem Kern. Kern-Zytoplasmaverhältnis ist hoch.

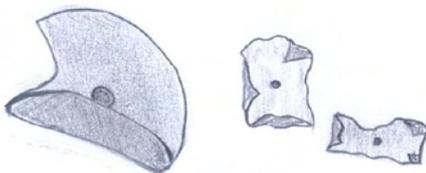
Größe: 15 – 25 µm



Intermediärzellen

Längliche Form, ellipsoid, Kern meistens randständig. Kern-Zytoplasmaverhältnis zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Typische „Spiegelei-Form“.

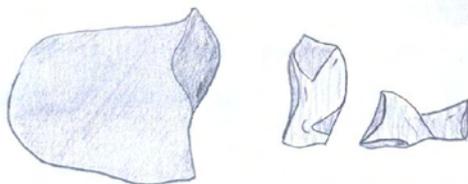
Größe: 20 – 30 µm



Superficialzellen

Polygonale, eckige Form. Der Kern kann sowohl normal als auch stark pyknotisch sein. „Potato chips“.

Größe: 35 – 60 µm



Schollen

Entsprechen in Form und Größe den Superficialzellen, besitzen jedoch keinen Kern.

Abbildung 39: Kurzbeschreibung der Zelltypen in Vestibular- und Vaginalzytologien (modifiziert nach EHLERS, 2000).

Anhang

Name: _____ Semester: _____

Proben-Nr.	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus	Nicht auswertbar/ zu unsicher (Begründung)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					

Bitte ein Kreuz im richtigen Feld der entsprechenden Zyklusphase setzen.
 Wenn die Probe für Sie nicht auswertbar erscheint, bitte eine kurze Begründung eintragen!

Abbildung 40: Formblatt zum Eintragen der diagnostizierten Zyklusphasen einzelner Ausstriche. Die Ausstriche wurden im Vorfeld alle mit Nummern versehen.

Tabelle 37: Ergebnisse der Rangkorrelationsanalysen nach Spearman bei dem Vergleich der Entnahmeorte Vestibulum und Vagina. Berücksichtigt wurden alle Hündinnen ($n = 120$) unabhängig von der Zyklusphase. Dargestellt sind der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der p-Wert.

Zelltyp / Parameter	r_s	p
Basalzelle	0,53	< 0,001
Parabasalzelle	0,9	< 0,001
Intermediärzelle	0,9	< 0,001
Superficialzelle	0,9	< 0,001
Scholle	0,91	< 0,001
Keratinisierte Zellen	0,42	< 0,001
Erythrozyten	0,8	< 0,0001
Neutrophile Granulozyten	0,81	< 0,0001
Bakterien	0,64	< 0,0001
Detritus	0,66	< 0,0001
Sekret	0,48	< 0,0001

Tabelle 38: Ergebnisse der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen den Entnahmeorten Vestibulum und Vagina bei den einzelnen Zellarten. Die Hündinnen wurden in die entsprechenden Zyklusstadien unterteilt. Die Zyklusphase Anöstrus konnte aufgrund der kleinen Probenzahl nicht statistisch ausgewertet werden. (BZ = Basalzellen, PZ = Parabasalzellen, IZ = Intermediärzellen, SZ = Superficialzellen, Scho = Schollen, KZ = Keratinisierte Zellen). Dargestellt sind der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der p-Wert.

	Proöstrus			Östrus			Metöstrus		
	n	r_s	p	n	r_s	p	n	r_s	p
BZ	13	0	1	23	0	1	9	0	1
PZ	13	0,72	0,0057	23	-0,066	0,77	9	0,85	0,0035
IZ	13	0,72	0,0053	23	0,6	0,0026	9	0,97	< 0,001
SZ	13	0,56	0,046	23	0,53	0,0087	9	0,97	< 0,001
Scho	13	0,64	0,018	23	0,88	< 0,001	9	0,93	0,002
KZ	13	0,35	0,24	23	0,54	0,0083	9	-0,31	0,42

Tabelle 39: Ergebnisse der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zwischen den Entnahmeorten Vestibulum und Vagina bei den verschiedenen Parametern. Die Hündinnen wurden in die verschiedenen Zyklusstadien unterteilt. Die Zyklusphase Anöstrus konnte aufgrund der kleinen Probenzahl nicht statistisch ausgewertet werden (Ery = Erythrozyten, NG = Neutrophile Granulozyten, Bakt = Bakterien, Det = Detritus, Sek = Sekret). Dargestellt sind der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der p-Wert.

	Proöstrus			Östrus			Metöstrus		
	n	r_s	p	n	r_s	p	n	r_s	p
Ery	13	0,69	0,0091	23	0,6	0,0025	9	0,65	0,055
NG	13	0,00	1,0	23	1,0	< 0,0001	9	0,72	0,03
Bakt	13	0,28	0,35	23	0,77	< 0,0001	9	0,56	0,11
Det	13	0,48	0,096	23	0,74	0,0001	9	0,00	1,0
Sek	13	0,63	0,022	23	0,88	< 0,0001	9	- 0,25	0,52

Anhang

Tabelle 40: Test auf Korrelation nach Spearman zwischen den feucht und trocken gewonnenen Zytologien bei Hündinnen (n = 106) aller Zyklusphasen. Dargestellt sind jeweils der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der entsprechende p-Wert.

	r_s	p
Basalzellen	0,48	< 0,001
Parabasalzellen	0,91	< 0,001
Intermediärzellen	0,93	< 0,001
Superfizialzellen	0,92	< 0,001
Schollen	0,93	< 0,001
Keratinisierte Zellen	0,14	0,15
Zellmenge / Gesichtsfeld	0,71	< 0,001
Erythrozyten	0,67	< 0,0001
Neutrophile Granulozyten	0,8	< 0,0001
Bakterien	0,7	< 0,0001
Detritus	0,77	< 0,0001
Sekret	0,38	0,0001
Freiliegende Zellkerne	0,68	< 0,0001
Wattefäden	0,51	< 0,0001

Tabelle 41: Test auf Korrelation nach Spearman zwischen den unterschiedlich fixierten Zytologien bei Hündinnen (n = 106) aller Zyklusphasen. Dargestellt sind jeweils der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und der entsprechende p-Wert.

	r_s	p
Basalzellen	0,0	1,0
Parabasalzellen	0,9	< 0,001
Intermediärzellen	0,95	< 0,001
Superfizialzellen	0,95	< 0,001
Schollen	0,94	< 0,001
Keratinisierte Zellen	0,25	0,011
Zellmenge / Gesichtsfeld	0,76	< 0,001
Erythrozyten	0,81	< 0,0001
Neutrophile Granulozyten	0,88	< 0,0001
Bakterien	0,73	< 0,0001
Detritus	0,82	< 0,0001
Sekret	0,72	< 0,0001
Freiliegende Zellkerne	0,84	< 0,0001
Aufgerollte Zellränder	0,56	< 0,0001

Anhang

Tabelle 42: Anzahl der richtig angekreuzten Antworten bei den entsprechenden Zytologien bei dem Versuch der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei unterschiedlichen Untersuchern (n = 107).

	Proöstrus	Östrus	Metöstrus	Anöstrus
Vestibulum	81	103	97	76
Vagina	68	106	96	85
Trockener Tupfer	84	92	69	45
Feuchter Tupfer	61	88	90	84
Luftgetrocknete Zytologie	100	103	70	86
Sprayfixierte Zytologie	99	92	71	86

9 Literaturverzeichnis

AKIHARA, Y.; SHIMOYAMA, Y.; KAWASAKO, K.; KOMINE, M.; HIRAYAMA, K.; KAGAWA, Y.; OMACHI, T.; MATSUDA, K.; OKAMOTO, M.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H. (2007)

Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovarian Cysts
J Vet. Med. Sci. 69, 1033-1037

ALLEN, W. E. (1985)

Abnormal vaginal cytology in a fertile bitch
J. Small Anim. Pract. 26, 343-347

ALLEN, W. E. (1994)

Vaginale Veränderungen von klinischer Bedeutung
In: ALLEN, W. E.: Fruchtbarkeit und Geburtshilfe beim Hund
Enke-Verlag Stuttgart, 12-18

ARBEITER, K. (1961)

Der Scheidentumor bei der Hündin und seine operative Behandlung
Wien. Tierärztl. Mschr. 48, 749-755

ARBEITER, K.; GEIGENMÜLLER, H. (1969)

Genitalerkrankungen der Hündin . Diagnose und Therapie
Wien. Tierärztl. Mschr. 6, 232-236

ARBEITER, K. (1975)

Die klinische Betreuung der Zuchthündin
Kleintierpraxis 20, 109 -114

ARNOLD, S. (1994)

Erkrankungen von Vagina, Vestibulum und Vulva

In: NIEMAND, H. G. und SUTER, P. F.: Praktikum der Hundeklinik, 8. Auflage
Blackwell-Wissenschafts-Verlag Berlin, 863 . 866

ARNOLD, S.; HUBLER, M.; HAUSER, B.; KASER-HOTZ, B.; RÜSCH, P. (1996)

Uterine serosal inclusion cysts in a bitch

J. Small Anim. Pract. 37, 235-237

BAIER, W.; RÜSSE, M. (1962)

Die Vaginoskopie der Hündin

Wien. Tierärztl. Mschr. 49, 30-36

BARNER, D. (2007)

Vaginopathien bei der Hündin . eine retrospektive Studie

Vet. Med. Diss. Giessen

BARRETT, R. P. (1976)

Exfoliative vaginal cytology of the dog using Wright's Stain

Vet. Med. 71, 1236-1238

BECCAGLIA, M.; BATTOCCHIA, M.; SIRONI, G.; LUVONI, G. C. (2007)

Unusual vaginal angiomatous neof ormation in a 3-year old pug

Reprod. Domest. Anim. 43, 144-146

BELL, E. T.; CHRISTIE; D. W. (1971/a)

Erythrocytes and Leucocytes in the Vaginal Smear of the Beagle Bitch

Vet. Rec. 88, 546-549

BELL, E. T.; CHRISTIE; D. W. (1971/b)

The Evaluation of Cellular Indices in Canine Vaginal Cytology

Brit. Vet. J. 127, 63-65

BELL, E. T.; BAILEY, J. B.; CHRISTIE, D. W. (1973)

Studies on vaginal cytology during the canine oestrus cycle

Res. vet. Sci. 14, 173-179

BRITTON, B.A. (1982)

Endometrial change in the annual reproductive cycle of the mare

J. Reprod. Fert. Suppl., 32, 175-180

BRUNNER, F. (1983)

Praxisnahe Schnellfärbemethoden zur Vaginalzytologie bei der Hündin

Tierärztl. Praxis 11, 269-277

BURKE, T. J. (1986)

Vaginitis

In: BURKE, T. J.: Small Animal Reproduction and Fertility, 2nd Edition

Lea and Febiger, Philadelphia, 276. 279

CHRISTIE, D. W.; BELL, E. T. (1970)

Changes in rectal temperature during the normal oestrous cycle in the Beagle bitch

Br. Vet. J. 127, 93-98

CHRISTIE, D. W.; BAILEY, J. B.; BELL, E. T. (1972)

Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrus cycle

Br. Vet. J. 128, 301. 310

CONCANNON, P. W.; POWERS, M. E.; HOLDER, W.; HANSEL, W. (1977)

Pregnancy and parturition in the bitch

Biol. Reprod. 16, 517-526

CONCANNON, P. W.; YEAGER, A.; FRANK, D.; LYAMPILLAI, A. (1990)

Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs

J. Reprod. Fertil. 88, 99-104

DASCANIO, J. J. (2003)

Endometrial cytology

In: ROBINSON, N.E. (Hrsg.): Current therapy in equine medicine, 5. Auflage

Saunders Philadelphia, 226-228

DE BRITO, C. P.; DE OLIVEIRA, C. M. SOARES, F. A.; FAUSTINO, M.; DE OLIVEIRA, A. (2006)

Immunohistochemical determination of estrogen receptor- in vaginal and tumor tissues of healthy and TVT-affected bitches and their relation to serum concentrations of estradiol-17 and progesterone

Theriogenology 66, 1587-1592

DORE, M. A. (1978)

The role of the vaginal smear in the detection of metoestrus and anoestrus in the bitch

J. Small Anim. Pract. 19, 561-572

DREIER, H. K. (1975/a)

Diagnostische Möglichkeiten mit der Vaginalsemearuntersuchung bei der Hündin

Kleintierpraxis 20, 48-54

DREIER, H.-K. (1975/b)

Möglichkeiten der Läufigkeitskontrolle und der Deckvorbereitung bei der Hündin

Wien. tierärztl. Mschr. 62, 349. 351

DREIER, H.-K. (2005)

Genitaltrakt

In: KRAFT, W.; DÜRR, U. M. (Hrsg.): Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, 6. Auflage

Schattauer-Verlag Stuttgart, 220-224

DREIER, H.-K. (2010)

Gynäkologie

In: DREIER, H.-K.: Klinik der Reproduktionsmedizin des Hundes

Schlütersche Verlagsgesellschaft Hannover, 16. 37

DURRANT, B. S.; RAVIDA, N.; SPADY, T.; CHENG, A. (2006)

New technologies for the study of carnivore reproduction

Theriogenology 66, 1729-1736

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. (1991)

Das Urogenitalsystem

IN: BUDRAS, K. D.; GOLLER, H.; HOFMANN, R. R.; HUMMEL, G.; WEYRAUCH, K. D. (Hrsg.): Anatomie der Haustiere

Enke Verlag Stuttgart, 183-230

EHLERS, J. P. (2000)

Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Vaginalzytologie und ihr Einsatz bei der Bestimmung des optimalen Belegungszeitraumes

Vet. Med. Diss. München

ERÜNAL-MARAL, N.; FINDIK, M.; ASLAN, S. (2000)

Use of Exfoliative Cytology for Diagnosis of Transmissible Venereal Tumour and Controlling the Recovery Period in the Bitch

Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 107, 175. 180

EVANS, H. M.; COLE, H. H. (1931)

An introduction to the study of the oestrus cycle of the dog
Memoirs of the University of California 9, 65-103

FAULKNER, R. T.; JOHNSON, S. E. (1980)

An Ovarian Cyst in a West Highland White Terrier
Vet. Med. Small Anim. Clinic. 92, 1375-1377

FÁY, J.; MEZÖ, T.; SOLTI, L.; WÖLFING, A.; ABONYI - TÓTH, Z. (2003)

Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch
Acta Vet. Hun. 51 (3), 385-394

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
J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 107-108

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. (2004)

Vaginal defects, vaginitis and vaginal infection
In: FELDMAN, E. C. and NELSON, R. W.: Canine and Feline Endocrinology
and Reproduction, 3. Edt.
W.B. Saunders Company Philadelphia, 901. 918

GOODMAN, M. (1992)

Canine Ovulation Timing
Problems in Vet. Med. 3, 433-444

GROPETTI, D.; PECILE, A.; ARRIGHI, S.; DI GIANCAMILLO, A.; CREMONESI, F.
(2010)

Endometrial cytology and computerized morphometric analysis of epithelial
nuclei: A useful tool for reproductive diagnosis in the bitch
Theriogenology 73, 927-941

GÜNZEL, A.-R.; KOIVISTO, P. (1984)

Aktuelles zum Sexualzyklus der Hündin . diagnostische Möglichkeiten durch vaginalzytologische Untersuchungen mittels Testsimplets.

Prakt. Tierarzt 65, 161-172

GÜNZEL, A.-R.; KOIVISTO, P.; FOUIGNER, J. A. (1986)

Electrical resistance of vaginal secretion in the bitch

Theriogenology 25, 559-569

GÜNZEL-APEL, A.-R. (1994)

Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund

Gustav Fischer Verlag VET spezial, 54

GÜNZEL-APEL, A.-R.; LÜBKE, A.; ROHDE, J. (1999)

Vergleichende Untersuchung der vaginalen und uterinen Zytologie und Keimflora im Sexualzyklus und Puerperium von Beaglehündinnen

Tierärztl. Praxis 27, 112-119

GÜNZEL-APEL, A.-R.; ZABEL, S.; BUNCK, C. F.; DIELEMANN, S. J.; EINSPANIER, A.; HOPPEN, H.-O. (2006)

Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Sheperd dogs

Theriogenology 66, 1431. 1435

GUYANT, L. (1988)

Canine Vaginal Cytology

Vet. technician 9, 513-520

HASE, M.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. (2000)

Plasma LH und Progesterone Levels before and after Ovulation and Observation of Ovarian Follicles by Ultrasonographic Diagnosis System in Dogs

J. Vet. Med. Sci. 62, 243-248

HASHIMOTO, A.; HIRAI, K.; FUKUSHI, H.; FUJIMOTO, Y. (1983)

The vaginal lesions of a bitch with a history of Canine Herpesvirus infection
Jpn. J. Vet. Sci. 45, 123-126

HERRON, M. A. (1983)

Tumors of the canine genital system
J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 19, 981-994

HIEMSTRA, M., SCHAEFERS-OKKENS, AC., TESKE, E., KOOISTRA, HS. (2001)

The reliability of vaginal cytology in determining the optimal mating time in the bitch
Tijdschr. Diergeneeskd. 126, 685-689

HOLDT, B. M. VON; OSTRANDER, E. A. (2006)

The singular history of a Canine Transmissible Tumor
Cell 126, 445-447

HOLLER, W.; HOLZMANN, A. (1982)

Vaginaltumor bei einer Hündin
Tierärztl. Praxis 10, 115-118

HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. (2001)

Vaginal Cytology
In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (Hrsg.): Canine and Feline Theriogenology
W.B. Saunders Company Philadelphia, 32. 39

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 vaginal in domestic bitches
J. Reprod. Fert. , Suppl. 39, 277-287

JOHNSON, C. A. (1991)

Diagnosis and treatment of chronic vaginitis in the bitch

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 523-531

JOHNSON, C. A. (2006)

Fortpflanzungsstörungen

In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H. (Hrsg.): Labordiagnostik in der Kleintierpraxis

Urban & Fischer Verlag München, 377. 383

JOHNSON, C. A. (2008)

Pregnancy management in the bitch

Theriogenology 70, 1412-1417

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. (2001)

The Canine Estrous Cycle

In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. (Hrsg.): Canine and Feline Theriogenology

W.B. Saunders Company Philadelphia, 16-31

KANG, T. B.; HOLMBERG, D. L. (1983)

Vaginal Leiomyoma in a Dog

Can. Vet. J. 24, 258-260

KLÖTZER, I. (1974)

Untersuchungen über den elektrischen Widerstand des Vaginalschleimes bei der Hündin

Kleintierpraxis 19, 125-130

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. (2005)

Weibliche Geschlechtsorgane

In: Anatomie der Haussäugetiere, 1. Auflage

Schattauer-Verlag Stuttgart, 431-433

KUSTRITZ, M. V. R. (2006)

Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract
Theriogenology 66, 567-574

KYLES, A. E.; VADEN, S.; HARKLE, E. M., STONE, E. A. (1996)

Vestibulovaginal stenosis in dogs: 18 cases (1987 . 1995)
J. Am. Vet. Med. Assoc. 209, 1889-1893

LAGING, C.; KRÖNING, T. (1989)

Beobachtungen zum Übertragbaren Venerischen Tumor (Sticker) beim Hund
Tierärztl. Praxis 17, 85-87

LEISER, R. (1990)

Weibliche Geschlechtsorgane

In: MOISMANN, W.; KOHLER, T. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und
mikroskopischer Anatomie der Haussäugetiere.

Paul Parey Verlag, Berlin, 232-248

LIEBICH, H.-G. (1998)

Weibliche Geschlechtsorgane

In: LIEBICH, H.-G.: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, 3. Auflage
Schattauer-Verlag, Stuttgart, 299-301

LINDE, C.; KARLSSON, I. (1984)

The correlation between the cytology of the vaginal smear und the time of
ovulation in the bitch

J. Small Anim. Pract 25, 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

J. Small Anim. Prac. 24, 1. 15

LINDSAY, F. E. F.; CONCANNON, P. W. (1986)

Normal canine vaginoscopy

In: BURKE, E. T. (Hrsg.): Small Animal Reproduction and Infertility

Lea & Ferbiger, Philadelphia, 96-11

LULICH, J. P. (2006)

Endoscopic vaginoscopy in the dog

Theriogenology 66, 588-591

MANEKE, N. (2002)

Untersuchung zur Beschreibung von Vaginalzellen der Hündin als ein Beitrag zur objektiven Zyklusdiagnostik.

Vet. Med. Diss. Berlin

MANOTHAIUDOM, K.; JOHNSTON, S. D. (1991)

Clinical approach to vaginal / Vestibular masses in the bitch

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 509-521

McENTEE, K.; NIELSEN, S. W. (1976)

Tumours of the female genital tract

Bull. World Health Organ., 53, 217-226

MERKT, H., LEPEL, J. VON (1970)

Die Entnahme von Proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie Behandlungshinweise

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77, 518-521

MERKT, H.; BISPING, W.; GÜNZEL-APEL, A.-R. (1980)

Die Tupferprobe in der gynäkologischen Untersuchung der Stute

Prakt. Tierarzt, 4, 301-308

MESTRE, J.; WANKE, M.; SUCHEYRE, S. (1990)

Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 during oestrus in the bitch
J. Small Anim. Pract. 31, 568-570

MILLER, D. M. (1995)

Ovarian remnant syndrome in dogs and cats: 46 cases (1988 . 1992)
J. Vet. Diagn. Invest. 7, 572. 574

MILLS, J. N.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. (1979)

Cyclical changes of vaginal cytology in the cat
Can. Vet. J. 20, 95. 101

MOKATE, T.; ABIDOGUN, K.; WATSON, A. J. S. (2006)

The quality of smear taking training for hospital medical trainees
Cytopathology 17, 361-365

NITSCHKE, T. (1970)

Diaphragma pelvis, Clitoris und Vestibulum vaginae bei der Hündin
Anatom. Anzeiger 127, 76-125

OLSON, P. N.; HUSTED, P. W.; ALLEN, T. A.; NETT, T. M. (1984)

Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 14, 927-946

ÖZYURTLU, N., S. AY, S., ALACAM, E. (2006)

Evaluation of Vaginal Smears, and Progesterone and Relaxin Levels in Pregnant, and Overt and Covert Pseudopregnant Bitches
Turk. J. Anim. Sci. 30, 465-470

PARK, M.-S.; KIM, Y.; KANG, M.-S; OH, S.-Y; CHO, D.-Y; SHIN, N.-S.; KIM, D.-Y.
(2006)

Disseminated transmissible venereal tumor in a dog
J. Vet. Diagn. Invest. 18, 130-133

PÉREZ, C. C.; RODRÍGUEZ, I.; DORADO, J.; HIDALGO, M. (2005)

Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches
Vet. Rec. 156, 648-650

POST, K. (1985)

Canine vaginal cytology during the estrous cycle
Can. Vet. J. 26, 101-104

RIECK, G. W.; KRATZHELLER, K. (1955)

Zytologie des desquamierenden Vaginalepithels der Hündin und ihre
Anwendung für die Zytodiagnostik
Zentralblatt der Veterinärmedizin 2, 82-101

ROWLEY, J. (1980)

Cystic ovary in a dog: a case report
Vet. Med. Small Anim. Clinic. 75, 1888

SACHS, L. (1992)

Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden, 7. Auflage
Springer Verlag . Berlin Heidelberg New York, 632

SALOMON, F.-V.; GEYER, H.; GILLE, U. (2005)

Harn- und Geschlechtsapparat
In: SALOMON, F.-V.; GEYER, H. (Hrsg.): Anatomie für die Tiermedizin
Enke Verlag, Stuttgart, 387-388

SANDERSLEBEN, J. VON (1989)

Systematik der Geschwülste

In: SANDERSLEBEN, J. VON; K. DÄMMRICH; E. DAHME (Hrsg.):

Pathologische Histologie der Haustiere, 3. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Jena . Stuttgart, 44-75

SCHANEN, H.; FEHR, M. (1998)

Erkrankungen der Scheide bei der Hündin . Differenzialdiagnosen des
Symptoms Scheidenausfluß

Prakt. Tierarzt 79, 924-933

SCHUTTE, A. P. (1967/a)

Canine vaginal cytology . I. Technique and cytological morphology

J. Small Anim. Pract. 8, 301-306

SCHUTTE, A. P. (1967/b)

Canine vaginal cytology . II. Cyclic changes

J. Small Anim. Pract. 8, 307-311

SEKI, M.; WATANABE, N.; ISHII, K.; KINOSHITA, Y.-i.; AIHARA, T.; TAKEIRI, S.;
OTOI, T. (2010)

Plasma progesterone profiles in Beagle bitches with and without the whelping
experience

Acta Vet. Hun. 58, 117-124

SHILLE, V.; CALDERWOOD-MAYS MB; THATCHER MJ (1984)

Infertility in a bitch associated with short interestrus intervals and cystic
follicles: a case report

J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 20, 171. 176

SIMMONS, J. (1970)

The Vaginal Smear and its Practical Application

Vet. Med. 65, 369-373

SMOLLICH, A.; MICHEL, G. (1992)

Geschlechtssystem

In: SMOLLICH, A. (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haustiere, 2. Auflage
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 322-327

SODERBERG, S. F. (1986/a)

Canine Breeding Management

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 16, 419-433

SODERBERG, S. F. (1986/b)

Vaginal Disorders

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 16, 543. 559

SOKOLOWSKI, J. H.; ZIMBELMAN, R. G.; GOYINGS, L. S. (1973)

Canine reproduction: Reproductive organs and related structures of the
nonparous, parous, and postpartum bitch

Am. J. Vet. Res. 34, 1001-1013

STÖHR, P.; MÖLLENDORF, W. VON; GOERTLER, K. (1955)

Geschlechtsorgane

In: STÖHR, P.; v. MÖLLENDORF, W.; GOERTLER, K. (Hrsg.): Lehrbuch der
Histologie, 27. Auflage

Gustav Fischer Verlag, Jena, 419

STRATMANN, N.; WEHREND, A. (2007)

Unilateral ovariectomy and cystectomy due to multiple ovarian cysts with
subsequent pregnancy in a Belgian sheperd dog

Vet. Rec. 26, 321-322

SUTTER-STEINMANN, N.; PARVIS, A. (2005)

Tumoren der Geschlechtsorgane

In: KESSLER, M. (Hrsg.): Kleintieronkologie, 2. Auflage

Parey Verlag, Stuttgart, 357-374

TAMMER, I.; BLENDINGER, K.; SOBIRAJ, A.; BOSTEDT, H. (1994)

Über den Einsatz der exfoliativen Vaginalzytologie im Rahmen der gynäkologischen Befunderhebung bei der Hündin

Tierärztl. Prax. 22, 199-207

THACHER, C.; BRADLEY, R. (1983)

Vulvar and vaginal tumors in the dog: A retrospective study

J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 690-692

TRASCH, K.; WEHREND, A.; BOSTEDT, H. (2006)

Follow-up Untersuchungen von Hündinnen nach konservativer Behandlung der Pyometra mit Antigestagenen

Prakt. Tierarzt 87, 174-180

TRASCH, K. (2008)

Gynäkologie bei der Hündin

CVE Kleintier 2, 9-14

VADEN, P. (1978)

Surgical treatment of polycystic ovaries in the dog: a case report

Vet. Med. Small Anim. Clinic. 73, 1160

WABERSKI, D.; GÜNZEL, APEL, A.-R. (1990)

Zyklusdiagnostik als Grundlage für fruchtbarkeitsfördernde und . hemmende Maßnahmen bei der Hündin

Kleintierpraxis 35, 573. 580

WAEELCHI, R.O., CORBOZ, L., WINDER, N.C. (1988)

Comparison of histological, cytological and bacteriological findings in the endometrium of the mare

J. Vet. Med. A., 35, 442-449

WALLACE, M. S. (1991)

The Ovarian Remnant Syndrome in the Bitch and Queen

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 501-507

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J. (1995)

Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy

J. Small Anim. Pract. 36, 201-205

WATTS, J. R.; WRIGHT, P. J.; Lee, C. S.; WHITHEAR, K. G. (1997)

New techniques using transcervical uterine cannulation for the diagnosis of uterine disorders in bitches

J. Reprod. Fertil., Suppl. 51, 283-293

WEHREND, A. (2007)

Durchführung und Interpretation der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin

Spektrum Tiermedizin 9, Veterinärspiegel Verlag, Berlin

WEISS, E.; KÄUFER-WEISS, I. (1999)

Geschlechtsorgane

In: DAHME, E. UND WEISS, E. (Hrsg): Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, 5. Auflage

Enke-Verlag, Stuttgart, 310-311

WOLLINGER, F. (1984)

Normo- und Pathozyklie der Hündin . Diagnose und Therapie

Tierärztl. Prax. 12, 85-91

WRIGHT P. J.; PARRY, B. W. (1989)

Cytology of the canine reproductive system

Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 19, 851-874

WRIGHT, P. J. (1990)

Application of vaginal cytology and plasma progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch

J. Small Anim. Pract. 31, 335-340

YANG, T. J. (1988)

Immunobiology of a spontaneously regressive tumor, the canine transmissible venereal sarcoma (review)

Anticancer Res. 8, 93-96

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Stellen entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der sSatzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis%o niedergelegt sind, eingehalten.

Katrin Röttger

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. vet. Axel Wehrend für die Überlassung dieses interessanten und praxisnahen Themas. Vor allem möchte ich mich bedanken für die ständige, sorgfältige und zeitnahe Beratung und Bearbeitung in allen Phasen der Arbeit, die zur Fortsetzung der Arbeit und zu ihrem Abschluß geführt hat.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei Frau Dr. Sandra Goericke-Pesch und Frau Dr. Nina Stratmann für die Hilfestellung in den ersten Monaten, für die klinische Ausbildung und die aufbauenden Worte: *„Klar schaffst Du das!“*

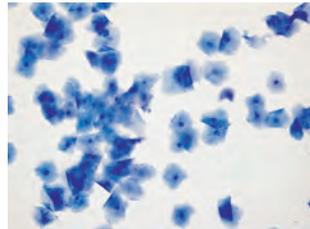
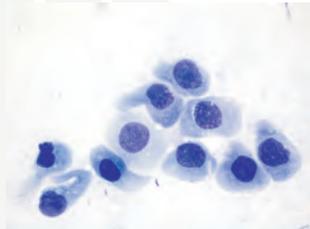
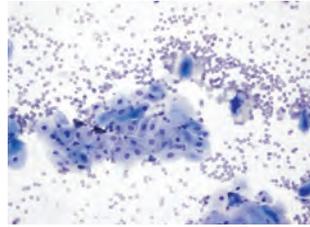
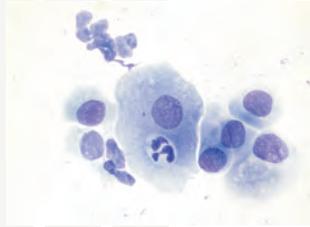
Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Damm und Frau Feller für die durchgeführten Hormonanalysen bedanken.

Vielen Dank an Herrn Dr. Failing und Herrn Schaubmar von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und für die hilfreiche Betreuung bei statistischen Fragen.

Ein besonderer Dank geht an das gesamte ehemalige Doktoranden-Team des *„Schlaunen Vogel“*: Gesa, Katharina, Klaus-Peter, Dina, Mathias und Tina. Danke für die Motivation, die kritischen Worte und die ständige Hilfe in allen Belangen dieser Arbeit. Ohne Euch wäre die Zeit in Gießen nur halb so schön gewesen!

Meinem Freund Guido danke ich für das Ertragen von so manch einem Stimmungstief beim Erstellen dieser Arbeit und die motivierenden Worte *„Du wolltest es ja selber so!“*

Und schliesslich danke ich meiner Familie, meinen Freunden und dem gesamten Team der Praxis Dr. G. Winkler für den oft geleisteten Beistand, der zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISSN: 978-3-8359-5599-8



9 783835 195599 8