

Eigene Untersuchungen

2 Material und Methode

3.1 Ziel der Untersuchung

Ziel der Untersuchungen war es, festzustellen, ob es wenig invasive Methoden gibt, die sich zur Zykluskontrolle und zur Deckterminbestimmung bei der Hündin eignen und ob diese in der Lage sind, invasivere Verfahren zu ersetzen.

3.2 untersuchte Tiere

Es wurden 15 läufige Hündinnen im Alter von 2,5 bis 7 Jahren zur Untersuchung vorgestellt. Es handelte sich einerseits um die Tiere des parasitologischen Instituts des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, welche in Gruppen in Zwingerhaltung leben, und andererseits um Tiere aus Privatbesitz, welche einzeln oder zu zweit in der Wohnung mit täglichem Auslauf gehalten werden. Die Hündinnen wurden im Zeitraum von September 1998 bis Mai 2000 zur Untersuchung vorgestellt.

Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um 5 Tiere der Rasse Beagle, um 4 Tiere der Rasse Deutscher Schäferhund, um 1 Tier der Rasse Liberianer, um 1 Tier der Rasse West Highland White Terrier, um 1 Tier der Rasse Riesenschnauzer um 1 Tier der Rasse Shi-Tzu und um 2 Mischlinge (s. Tabelle 1).

Hündin Nr.	Rasse	Alter in Jahren	Gewicht in kg	Anzahl der bisherigen Läufigkeiten
1	West Highland White Terrier	3,5	6	5
2	Shi-Tzu	6	3,5	10
3	Riesenschnauzer	4	32	7
4	Deutscher Schäferhund	2	33	3
5	Beagle	3	15	4
6	Beagle	3,5	13	5
7	Mischling	9	17	15
8	Liberianer	6	10	10
9	Deutscher Schäferhund	3	31	4
10	Beagle	2	12	2
11	Mischling	1	11	1
12	Deutscher Schäferhund	3,5	32	5
13	Beagle	2,5	12	3
14	Beagle	3	15	4
15	Deutscher Schäferhund	2	33	1

Tabelle 1 untersuchte Hündinnen

3.3 Versuchsdurchführung

Vom Beginn des Proöstrus bis zum Zeitpunkt der vermuteten Ovulation wurden die Hündinnen in zweitägigen Abständen wie unten beschrieben untersucht. Während des Östrus fanden die Untersuchungen im täglichen Abstand statt und während des frühen Metöstrus verlängerten sich die Untersuchungsintervalle auf 2-3 Tage.

3.4 Versuchsaufbau

3.4.1 Allgemeinuntersuchung

Bei der ersten Vorstellung eines jeden Tieres fand eine kurze Allgemeinuntersuchung statt, um die Allgemeingesundheit des Tieres zu prüfen. Sie bestand aus der Auskultation des Herzens und der Lunge, sowie der Adspektion der Augen und deren Schleimhäute.

3.4.2 Kontrolle der rektalen Temperatur

Zu jedem Untersuchungstermin wurde zu Beginn die rektale Temperatur eines jeden Tieres mit einem digitalen Fieberthermometer bestimmt. Das Thermometer wurde ca. 5 cm tief in das Rektum eingeführt und dort so lange belassen, bis ein akustisches Signal das Ende der Messung anzeigte.

3.4.3 Prüfung des Duldungsreflexes

Bei jeder Vorstellung des Tieres wurde der Duldungsreflex der Hündin geprüft und beurteilt.

Die Prüfung erfolgte durch manuelles Auf- und Abstreifen lateral der Vulva und die Palpation im Bereich der distalen Vulvakommissur.

Die Einstufung zur Beurteilung erfolgte in 3 Kategorien:

0 = die Hündin zeigt keine Reaktion

1 = die Hündin nimmt die Rute leicht zur Seite und die Vulva wird sichtbar

2 = die Hündin „steht“

3.4.4 Beurteilung des äußeren Genitale

Bei der Adspektion der Vulva wurde der Ödematisierungsgrad bestimmt. Die Einteilung erfolgte in 5 Grade, wobei Grad 1 einer gefältelten Vulva entspricht und Grad 5 einer prall

ödematisierten Vulva. Außerdem wurde die Scham bei jeder Untersuchung vermessen, wobei die Länge von der Vulvadeckelung bis zur distalen Vulvakommissur bestimmt wurde, und für die Bestimmung der Breite die breiteste Stelle der Vulva herangezogen wurde.

Falls Läufigkeitssekret äußerlich sichtbar war, wurde dessen Farbe, Menge und Konsistenz nach dem Schlüssel beurteilt, der auch bei der vaginoskopischen Untersuchung angewandt wurde (s. Kapitel 3.4.6).

3.4.5 pH-Wert-Bestimmung im Vaginalsekret

Der pH-Wert im Vaginalsekret wurde bei jeder Vorstellung der Hündin mit pH-Indikatorpapier (pH-Fix 4,5-10) der Einteilung 0,5 der Firma Macherey-Nagel (Düren) bestimmt. Zur Bestimmung wurde der Sekretröpfchen bzw. die Feuchtigkeit im Bereich des unteren Schamwinkels genutzt. Das Indikatorpapier wurde mit der vorgefundenen Feuchtigkeit benetzt und nach ca. 1 Minute abgelesen.

3.4.6 Vaginoskopische Befunderhebung

Nach trockener Reinigung der Vulva wurde ein steriles Röhrenspekulum, welches mit einer Kaltlichtquelle versehen war, mit steriler Kochsalzlösung benetzt, und nach Spreizen der Vulva im dorsalen Schamwinkel in einem Winkel von ca. 45° in das Vestibulum der Vagina eingeführt. Nach passieren des Hymenarings verlief das Einführen des Spekulum in paralleler Richtung zur Wirbelsäule.

Die Vaginalschleimhaut wurde nach folgenden Kriterien beurteilt:

Farbe: porzellanfarben
 blaßrosa
 rosa
 rot
 dunkelrot
 lila
 blaß-bläulich

Fältelung: Primärfältelung
Blockmalz
Sekundärfältelung

Feuchtigkeit: 1 = feucht glänzend
2 = matt feucht
3 = trocken

Das vorgefundene Sekret wurde folgendermaßen befundet:

Menge: 0 = kein Sekret vorgefunden
1 = wenig Sekret vorgefunden
2 = mäßig viel Sekret vorgefunden
3 = viel Sekret vorgefunden

Farbe: blutig-deckfarben
fleischwasserfarben
rötlich-gelb
klar

Konsistenz: wässrig
schleimig
pappig

Beimengungen: wenn ja, welcher Art

Nach dieser vaginoskopischen Befundung schloß sich die Tupferentnahme für die vaginalzytologische Untersuchung an.

3.4.7 Vaginalzytologische Befunderhebung

Ein steriler Wattetupfer, mit steriler Kochsalzlösung benetzt, wurde durch das sich in der Vagina befindende Röhrenspekulum über dessen kranialen Rand hinaus eingeführt und am dorsalen Scheidendach entlanggestreift. Dann wurde der Tupfer auf einem Objektträger ausgerollt, dieser fixiert und nach PAPANICOLAOU (1942) gefärbt.

Die Beurteilung des gefärbten Ausstriches erfolgte nach folgendem Schema:

Mit dem Lichtmikroskop bei kleiner Vergrößerung (Objektiv x 16)

Ausstrichhintergrund:	klar Sekretschlieren Keime Zelldetritus
Anordnung der Epithelzellen:	einzeln liegend in Haufen liegend

Mit dem Lichtmikroskop bei stärkerer Vergrößerung (Objektiv x 40)

Differenzierung der Epithelzellen in:	Basalzellen Parabasalzellen Intermediärzellen Superfizialzellen (mit und ohne Kernpyknose) Schollen
Das Vorkommen von:	Erythrozyten Leukozyten

Zusätzlich erlaubte die Färbung nach PAPANICOLAOU (1942) eine Aussage über die Vitalität der Epithelzellen durch Bestimmung des Eosinophilie-Indexes.

3.4.8 Gewinnung von Vaginalsekret

Für die Bestimmung des Progesterongehaltes im Vaginalsekret ist es notwendig, dieses in ausreichender Menge zu gewinnen. Dazu wurden sehr saugfähige sterile Tupfer der Firma Kettenbach aus Eschenburg (Sugi[®] Saugtupfer steril) aus der humanen Augenchirurgie genutzt. Diese Tupfer wurden mit einer sterilen Nadel auf einen ca. 25 cm langen sterilen Soft Catgut[®]-Faden der Stärke 7 metric aufgefädelt. Nach der vaginoskopischen Befunderhebung und der Tupferentnahme für die zytologische Untersuchung wurden 2 aufgefädelte Tupfer über das Spekulum in die Scheide verbracht. Das Spekulum wurde aus der Scheide entfernt und die Tupfer in derselben belassen. Die Tupfer wurden ca. 20 Minuten in der Scheide liegen gelassen und anschließend an den aus der Schamspalte herausragenden Catgut[®]-Fäden herausgezogen. Sie wurden nun in jeweils ein Eppendorfgesäß verbracht, wobei beim Schließen des Eppendorfgesäßes darauf geachtet werden mußte, daß der Catgut[®]-Faden zwischen Deckel und Gefäß eingeklemmt wird und sich somit die Tupfer hängend im Gefäß befanden. Die so mit den Tupfern versehenen Eppendorfgesäße wurden anschließend in einer Eppendorfzentrifuge bei 9.500 x g für ca. 2 Minuten zentrifugiert. Im Anschluß daran wurden die Tupfer aus den Gefäßen entfernt, in welchen sich am Boden das abzentrifugierte Vaginalsekret befand. Das so gewonnene Vaginalsekret wurde zunächst bei -20°C eingefroren.

3.4.9 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte an der V. cephalica einer Vordergliedmaße oder an der V. saphena lateralis einer Hintergliedmaße. Das entnommene Blut wurde zentrifugiert, das gewonnene Serum direkt einem semiquantitativen Testverfahren zur Progesteronbestimmung zugeführt und das überschüssige Serum bei -20°C eingefroren.

3.4.10 Bestimmung der Progesteronkonzentration im Serum des peripheren Blutes

Zur Bestimmung der Progesteronkonzentration im Blutserum der Hündinnen standen zwei semiquantitative Testverfahren nach dem ELISA-Prinzip und ein quantitativer RIA zur Verfügung. Alle drei Testverfahren wurden für jedes Tier angewandt.

3.4.10.1 ELISA (Target[®] canine ovulation timing kit; BioMetallics, U.S.A.)

Bei diesem Tests wird die Progesteronkonzentration in Blutplasma oder Blutserum semiquantitativ ermittelt. Das Verfahren wurde nach Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt.

Dieses Testverfahren kam direkt nach Zentrifugieren des Blutes im Anschluß an die anderen Untersuchungen zur Anwendung und diente zur schnellen Einschätzung des Zyklusstandes der Tiere. Die Meßbereiche des Testes lagen bei < 1 ng/ml Progesteron, was den sehr frühen Proöstrus in einer Läufigkeit anzeigt, 1 – 2,5 ng/ml Progesteron, was für den Proöstrus spricht, 2,5 – 8 ng/ml Progesteron, was den Zeitraum der Ovulationen angibt und > 8 ng/ml Progesteron, was ein Zurückliegen der Ovulationen anzeigt.

3.4.10.2 ELISA (Hormonost[®]; Biolab, München)

Dieses semiquantitative Testverfahren kam nach Auftauen der bei –20°C gelagerten Blutserumproben zur Anwendung. Hier liegen die Meßbereiche laut Angaben des Herstellers für den Proöstrus bei 2 ng/ml Progesteron und für die Ovulation bei 5 ng/ml Progesteron. Da hier jeweils 2 Standardseren mit den genannten Progesteronkonzentrationen jeden Test mit durchlaufen und eine bestimmte Blaufärbung der Testflüssigkeiten nach einer bestimmten Zeit ergeben, lassen sich rein optisch auch Aussagen zu den dazwischen liegenden Farbnuancen (3 und 4 ng/ml Progesteron) machen, bzw. ergibt sich auch die Möglichkeit, einen Bereich < 2 ng/ml Progesteron, bzw. >5 ng/ml Progesteron anzugeben.

3.4.10.3 RIA (ICN; Pharmaceuticals, U.S.A.)

Das Testverfahren ist ein Radioimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Progesteron in Serum oder Plasma. Das Verfahren nutzt als radioaktive Markierung I_{125} . Er wurde bei den zuvor bei -20°C eingefrorenen und wieder aufgetauten Blutserumproben der Hündinnen angewandt.

Dieser Serumprogesterontest dient der direkten quantitativen Bestimmung von Progesteron. Er ist ein ^{125}I -Radioimmunoassay, welcher im Test folgende Kreuzreaktivitäten zeigte: mit Progesteron 100%, mit 20α -Dihydroprogesteron 5,41%, mit Desoxycorticosteron 3,8%, mit Corticosteron 0,7%, mit 17α -Hydroxyprogesteron 0,67%, mit Pregnenolon 0,41%, mit Androstendion 0,23% mit Testosteron 0,16% und mit 11-Desoxycortisol, Pregnenolon-Sulfat, Cholesterol, Dihydroepiandrosteron, Ethiocholanolon, Estron, 17β -Estradiol, 17α -Estradiol, Estriol, Androsteron, Aldosteron, Cortisol und DHEA-S $< 0.01\%$. Die Variationskoeffizienten betragen Intra-Assay 11,9% und Inter-Assay 12%.

3.4.11 Bestimmung der Progesteronkonzentration im Vaginalsekret

In dem wie unter 2.4.8 gewonnenen Vaginalsekret wurde die Progesteronkonzentration quantitativ mit RIA (ICN) bestimmt. Mit dem Sekret wurde im Test so, wie mit Blutserum üblich, verfahren.

3.4.12 Auswertung der Befunde

Die Untersuchungen 3.4.3, 3.4.4, 3.4.6, 3.4.7, 3.4.9 und 3.4.10.1 bzw. deren Befunde dienen der Feststellung des Zyklusstandes der Tiere.

Die Untersuchungen 3.4.2, 3.4.5, 3.4.8, 3.4.10.2, 3.4.10.3 und 3.4.11 bzw. deren Befunde werden mit dem Zyklusstand der Tiere verglichen.

Die graphischen Darstellungen im Ergebnisteil und die beschreibende Statistik wurde mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2000 erstellt.