

Aus der
Klein- und Heimtierklinik des Tierklinikums
Abteilung Reproduktionsmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Konventionelle und computergestützte Auswertung von
Vaginalabstrichen bei der Hündin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Felix Reckers
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2024
Journal-Nr.: 4455

Aus der
Klein- und Heimtierklinik des Tierklinikums
Abteilung Reproduktionsmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Konventionelle und computergestützte Auswertung von
Vaginalabstrichen bei der Hündin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Felix Reckers
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2024
Journal-Nr.: 4455

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: PD Dr. Sebastian Arlt

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Vitaly Belik

Dritter Gutachter: PD Dr. Beate Walter

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Bitches, diagnostic techniques, animal reproduction, analytical methods, Microscopy,
vaginal smears, cytology

Tag der Promotion: 19.08.2024

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-259-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2024

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Geschichte der exfoliativen Vaginalzytologie.....	2
2.2 Die Anatomie des weiblichen Geschlechtsapparats der Hündin	2
2.2.1 Keimbereitende Organe.....	3
2.2.2 Keimleitende Organe	3
2.2.3 Keimbewahrende Organe.....	4
2.2.4 Die Begattungsorgane	5
2.3 Die hormonelle Steuerung des weiblichen Sexualzyklus.....	5
2.4 Der Sexualzyklus der Hündin.....	9
2.4.1 Der Proöstrus.....	9
2.4.2 Der Östrus	10
2.4.3 Die Lutealphase.....	11
2.4.4 Der Anöstrus.....	12
2.5 Die Bestimmung des Zyklusstands der Hündin	12
2.5.1 Vaginoskopie	13
2.5.2 Die Vaginalzytologie	14
2.5.3 Progesteronbestimmung.....	20
2.5.4 Weitere Möglichkeiten der Zyklusdiagnostik.....	21
3 Eigene Untersuchungen	24
3.1 Scientific Paper	26
3.2 Additional Data.....	47
4 Diskussion	67
4.1 Bisheriger Wissensstand	67
4.2 Vaginalzytologie bei anderen Säugetierarten	68
4.3 Standardisierung von Untersuchungen in der Veterinärmedizin.....	70
4.4 Die computergestützte Auswertung von Befunden in der Veterinärmedizin.....	73
4.5 Ausblick.....	79
4.6 Fazit	79
5 Zusammenfassung	81
6 Summary	82
7 Literaturverzeichnis	83

Inhaltsverzeichnis

8	Publikationsverzeichnis	95
9	Danksagung.....	96
10	Finanzierungsquelle	97
11	Interessenskonflikte	98
12	Selbstständigkeitserklärung	99

Abkürzungsverzeichnis

AI:	Artificial Intelligence
AUC:	Area under the Curve
CLIA:	Chemilumineszenz Immunoassay
cm:	Zentimeter
CTSA:	Cell type specific Algorithm
ECAR:	European College for Animal Reproduction
ELFA:	Enzyme linked fluorescent assay
e.g.:	for example
FCI:	Fédération Cynologique Internationale
FSH:	Follikel Stimulierendes Hormon
GnRH:	Gonadotropin Releasing Hormone
HD:	Hüftdysplasie
HE:	Hematoxylin Eosin
K:	Kappa
kg:	Kilogramm
LH:	Luteinisierendes Hormon
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$:	Mikrometer/ Quadratmikrometer
N:	Anzahl
ng:	Nanogramm
NIC:	Not identified Cells
PCR:	Polymerase Chain Reaction
POC:	Point of Care- Diagnostik
P4:	Progesteron
RIA:	Radioimmunoassay
SOP:	Standard Operating Procedure
USoC:	Unknown Structures of Cells
VHS:	Vertebral Heart Score

1 Einleitung

Im Rahmen der gynäkologischen Diagnostik bei der Hündin ist die exfoliative Vaginalzytologie eine wichtige und routinemäßig durchgeführte Untersuchung (Moxon et al., 2012). Sie ermöglicht wichtige Befunde, welche unter anderem für die Beurteilung der Scheidengesundheit, zur Bestimmung des Zyklusstandes, und das Deckmanagement genutzt werden können (Arlt, 2018). Ein optimales Deck- und Besamungsmanagement können den Ablauf eines natürlichen Deckaktes verbessern und die Fruchtbarkeit der Hündin erhöhen (Arlt, 2018; Romagnoli, 2017). Auch spezifische pathologische Veränderungen der Vaginalschleimhaut wie Entzündungen und neoplastisches Zellwachstum lassen sich durch die exfoliative Vaginalzytologie diagnostizieren (Pérez et al., 2005).

Die Gewinnung von Zellen der Vaginalschleimhaut für die mikroskopische Untersuchung ist nicht invasiv, kostengünstig und schnell durchzuführen (Bouchard et al., 1991; Davidson, 2015). Unter der exfoliativen (wörtlich übersetzt „abschuppend“) Zytologie versteht man die Entnahme und mikroskopische Untersuchung von oberflächlichen Mukosazellen, die sich mittels rollender Bewegung eines Tupfers oder Bürstchens von der Schleimhaut entnehmen lassen (Sivapathasundharam & Kalasagar, 2004).

Die Vaginalzytologie gehört zum Standardrepertoire einer reproduktionsmedizinischen Untersuchung von Hündinnen. Die Auswertung der exfoliativen Vaginalzytologie scheint jedoch einige Untersucher*innen vor Probleme zu stellen. Unterschiedliche Definitionen von Vaginalzellen, unterschiedliche Mengenangaben für Zellarten in den jeweiligen Zyklusstadien, sowie individuelle Eigenarten der Hündin können die Interpretation eines Abstriches erschweren (Arlt, 2018; Moxon et al., 2010).

Hinzu könnten mögliche subjektive Wahrnehmung der Untersucher*in kommen. Subjektive Schätzung der jeweiligen Zelltypen können jedoch zu ungenauen, nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen (Reckers et al., 2022).

Um Vaginalzellen einheitlicher evaluieren zu können, war es Ziel dieser Arbeit für jeden Vaginalzellentyp (Parabasalzelle, Intermediärzelle, Superficialzelle, Scholle) eine eindeutige Definition zu entwickeln, da eine intensive Literaturrecherche das Vorhandensein unterschiedlicher Definitionen offenlegte.

Eine weitere zentrale Fragestellung dieser Arbeit war es, ob eine objektive Evaluierung eines Vaginalabstriches durch ein computergestütztes System möglich ist. In weiteren Projekten könnte untersucht werden, ob eine objektive Evaluierung der Vaginalzytologie zur Bestimmung des Ovulationszeitpunktes nutzbar ist.

2 Literatur

2.1 Geschichte der exfoliativen Vaginalzytologie

Einer der ersten Mediziner, der die Zytologie als Diagnostikinstrument nutzte, war der Berliner Pathologe Johannes Müller, welcher Tumorzellen mikroskopisch darstellte (Hajdu & Ehya, 2008). Der Franzose Félix Archimède Pouchet beschrieb 1847 als Erster die Veränderungen der vaginalen Schleimhaut von Säugetieren während des Sexualzyklus (Diamantis & Androutsos, 2008). Dieses Themengebiet nahm der Grieche George N. Papanicolaou auf und intensivierte es: Er erforschte konsequent die hormonellen Veränderungen der Vaginalschleimhaut während des Sexualzyklus am Tier und am Menschen (Diamantis & Magiorkinis, 2014). Im Jahr 1917 veröffentlichte er mit Charles R. Stockard den Artikel "The existence of a typical estrous cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes", in dem das erste Mal die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Vagina während des Sexualzyklus beschrieben wurden (Cora et al., 2015). Außerdem wurden diese Veränderungen in Korrelation mit den Veränderungen in anderen Fortpflanzungsorganen gesetzt (Cora et al., 2015). Somit konnte anhand der Vaginalzytologie bestimmt werden, in welcher Phase des Sexualzyklus sich das Tier befand (Tan & Tatsumura, 2015). Zeitgleich zu Papanicolaou forschte auch Aurel Babes an der Veränderung der Vaginalschleimhaut während des Zyklus und veröffentlichte seine Arbeit zur Erkennung von Cervikaltumoren bei der Frau durch die Vaginalzytologie (Hajdu & Ehya, 2008). Für die genaue Evaluation und verlängerte Haltbarkeit von Vaginalzell-Abstrichen entwickelte Papanicolaou 1942 die nach ihm benannte Färbung (Pérez et al., 2005). Außerdem entwickelte er den Pap-Test, der bis heute zur Früherkennung von Cervical- Karzinomen bei der Frau angewendet wird (Tan & Tatsumura, 2015).

2.2 Die Anatomie des weiblichen Geschlechtsapparats der Hündin

Der weibliche Geschlechtsapparat der Hündin wird unterteilt in keimbereitende (Ovarien), keimleitende (Tuba uterina) und keimbewahrende (Uterus) Geschlechtsorgane (Leiser, 2004). Die Vagina stellt das Begattungsorgan dar (König & Liebich, 2015). Die Hündin hat einen diöstrischen Sexualzyklus, was bedeutet, dass sie in der Regel zweimal im Jahr läufig wird (Aydin et al., 2011). Der Sexualzyklus wird durch das hormonelle Zusammenspiel von Hypothalamus, Hypophyse und den Ovarien gesteuert, der sogenannten Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse (Beijerink et al., 2007). Der Zyklus besteht aus den 4 Stadien: Proöstrus, Östrus, Lutealphase und Anöstrus (Aydin et al., 2011; Concannon, 2011). Eine Begattung oder Besamung sollte während des Östrus nach erfolgten Ovulationen

stattfinden (Goodman, 2001). Der Östrus ist definiert als Phase der Duldung einer Begattung durch ein männliches Tier und umfasst, je nach Individuum, eine Dauer von drei bis 21 (im Mittel 9) Tagen (de Gier et al., 2006).

2.2.1 Keimbereitende Organe

2.2.1.1 Die Ovarien

Die Ovarien der Hündin sind paarig angelegt und entstehen embryologisch beidseitig medial der Urniere (Mesonephros) aus der Urogenitalleiste (Crista Urogenitalis) (König & Liebich, 2015). Sie sind länglich abgeplattet, je nach Rasse ca. 20mm lang, 15mm dick und auf Höhe des 3. bis 4 Lendenwirbel kaudal der Niere am Mesovarium im Abdomen fixiert (Leiser, 2004). Das Ovarium besitzt eine innere Markzone (Medulla ovarii) und eine äußere Rindenzone (Cortex ovarii) (Hamouzova et al., 2020). Der Cortex ovarii ist der Entwicklungsort für Follikel und Gelbkörper (Corpus luteum) (Eker & Salmanoğlu, 2006). Die Blutversorgung wird von der Ateria ovarica gewährleistet, welche aus der Aorta entspringt und der Vena ovarica, welche in die Vena cava caudalis und Vena renalis mündet (Leiser, 2004).

2.2.2 Keimleitende Organe

2.2.2.1 Die Tuba uterina oder Salpinx

Die Tubae uterinae entwickeln sich aus den Müller-Gängen (Ductus paramesonephricus) (Varga et al., 2019). Sie sind paarig angelegt, 60 bis 100mm lang und verlaufen im Mesosalpinx (Leiser, 2004). Sie besitzen eine ovarseitige Öffnung (Infundibulum tubae uterinae), welche die Oozyten (Eizelle) nach den Ovulation aufnehmen (König & Liebich, 2015). Die Oozyten wandern von dort in einen leicht erweiterten Abschnitt der Tuba uterina (Ampulla tubae uterinae), in der im Falle einer Begattung die Befruchtung stattfindet (König & Liebich, 2015). Weiter caudal folgt ein engerer, gerade noch für die Oozyte passierbarer, gewundener Abschnitt (Isthmus tubae uterinae), welcher in Form einer kleinen Papille in der jeweiligen Uterushornspitze mündet (Ostium uterinum tubae) (König & Liebich, 2015; Leiser, 2004).

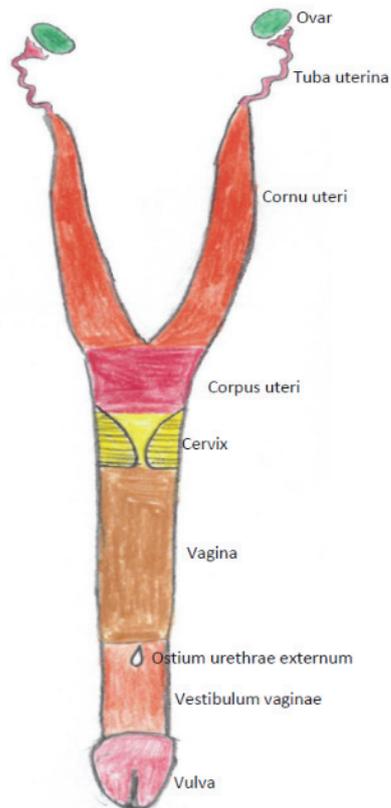


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Reproduktionstrakts der Hündin.
Modifiziert nach (König et al., 2015)

2.2.3 Keimbewahrende Organe

2.2.3.1 Uterus oder Hystera

Der Uterus nimmt den Conceptus auf, geht mit ihm eine Verbindung ein, ernährt ihn und treibt ihn während des Geburtsvorgangs aus (Leiser, 2004; Sağsöz et al., 2013). Der Uterus bildet sich embryonal aus den Müllerschen-Gängen besteht aus verschiedenen Abschnitten (Arlt et al., 2012). Dazu zählen zwei Coruna uteri (Uterushörnern), das Corpus uteri (Uteruskörper) und die Cervix uteri (König & Liebich, 2015). Die Coruna uteri der Hündin sind vergleichsweise lang, schlauchförmig und ungefähr bleistiftstark (Leiser, 2004). Sie verlaufen in flachem, ventral konvexem Bogen, konvergierend Beckenwärts und vereinen sich zum unpaaren Corpus uteri (Leiser, 2004). Dieses ist bei der Hündin rasseunterschiedlich circa 20 bis 30 mm lang (Leiser, 2004). Der Uterus wird nach kaudal mithilfe von Längsfalten (Plicae longitudinales) und einem Schleimpropfen durch die Cervix uteri, circa 10 mm lang, verschlossen (König & Liebich, 2015; Leiser, 2004). Der Uterus wird durch das breite Gebärmutterband (Mesovarium) an der Lendengegend befestigt (Leiser, 2004). Innerhalb des Mesovariums verlaufen zahlreiche glatte Muskelfasern, welche den Halteapparat des Uterus je nach Trächtigkeitsstand stabilisieren können (Leiser, 2004). Die Uteruswand besteht aus

drei Schichten: dem Endometrium, dem Myometrium und dem Perimetrium (Bayram et al., 2018). Der Uterus wird durch den Ramus uterinus aus der Ateria ovarica, sowie den Ramus uterinus aus der Ateria vaginalis vaskularisiert (König & Liebich, 2015). Die Venen verlaufen mit den Arterien (König & Liebich, 2015).

2.2.4 Die Begattungsorgane

2.2.4.1 Vagina

In die Vagina wird der Penis während des Begattungsaktes aufgenommen (Leiser, 2004). Die Vagina propria reicht von der Cervix uteri bis zur Harnröhrenmündung (Ostium urethrae externum) (König & Liebich, 2015). Die Vagina geht embryologisch aus der Vereinigung der beiden Müllerschen Gänge hervor (Arlt et al., 2012; Leiser, 2004; Marinho et al., 2017). Die Vagina ist je nach Rasse zwischen 10 und 30 cm lang (Romagnoli & Lopate, 2014). Die Cervix liegt bei den meisten Rassen auf Höhe des dritten Lumbalwirbel (Lévy, 2016). Eine tierartliche Besonderheit der Hündin ist die Pseudocervix, welche durch eine Schleimhautfalte (Dorsomedianfalte) entsteht. Diese engt das Vaginallumen von dorsal ein, verdeckt die Cervix und erschwert Untersuchungen und Eingriffe, wie die Samenübertragung (Lévy, 2016; Romagnoli & Lopate, 2014). Die Vagina ragt in die Beckenhöhle und liegt dort ventral des Rectums und dorsal der Vesica urinaria und der Ureteren (Leiser, 2004). Die Vagina mündet in das Vestibulum vaginae, welches fast senkrecht nach ventral zieht und in die Vulva mündet (Lévy, 2016). Das Vestibulum vaginae ist je nach Rasse 2 bis 5 cm lang (Lévy, 2016). Die Vulva und das Vestibulum bilden die äußeren Geschlechtsorgane der Hündin (Fung et al., 2019). Die Vulva besteht aus 2 Labiae, welche eine runde dorsale und eine gewinkelte ventrale Commissur bilden (Lévy, 2016). In der ventralen Commissur liegt die Clitoris, welche sich aus zwei Crura, dem Corpus und der Glans clitoridis zusammensetzt (Fung et al., 2019; König et al., 2015). Die Clitoris stellt das weibliche Pendant zum Penis dar (Fung et al., 2019). Auch die Wand des Vaginalkanals besitzt drei Schichten: Eine drüsenlose, kutane Schleimhaut, deren Dicke im Wesentlichen von der Östrogeneinwirkung abhängig ist, eine Muskelschicht aus glatter Muskulatur und eine bindegewebige Serosa (Leiser, 2004).

2.3 Die hormonelle Steuerung des weiblichen Sexualzyklus

Für eine erfolgreiche Trächtigkeit muss der weibliche Körper Oozyten bilden, die durch Spermien des männlichen Tieres befruchtet werden. Die Oozyten reifen in den Follikeln des Ovars heran, ovulieren nach ihrer Maturation und wandern in die Tuba uterina, wo sie bei der Hündin eine weitere Reifungsphase (Beendigung der Meiose) für ca. 48 Stunden durchlaufen und die Befruchtung (Fertilisation) stattfindet (England & Concannon, 2002). Die Zygote

(befruchtete Oozyte) bzw. der Embryo wandert weiter in eines der beiden Cornua uteri. Im Endometrium des Cornu uteri findet ca. 18 bis 20 Tage nach der Ovulation die Nidation (Plazentabildung) statt. Durch die dabei entstehende Plazenta endotheliochorialis wird der Embryo und später der Fetus im weiteren Verlauf der Trächtigkeit ernährt (Schäfer-Somi et al., 2008).

Die Fruchtbarkeit der Hündin ist unter anderem abhängig von der Reifung der Follikel, welche durch eine Hormonkaskade mit Rückkopplungsmechanismen beeinflusst wird (Concannon, 2009; Kanda, 2019; Kowalewski, 2018). Die bedeutsamsten für die Reproduktion verantwortlichen Hormone werden zumeist als Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse dargestellt (Lents et al., 2008). Die sezernierten Hormone können eine hemmende oder auch stimulierende Wirkung auf die einzelnen Organe der Kaskade haben (Kim, 2019). Im Hypothalamus wird das Gonadotropin- Releasing Hormone (GnRH) gebildet und pulstatil freigesetzt (Okkens & Kooistra, 2006). Die Freisetzung von GnRH wird von dem im Hypothalamus gebildeten Neuropeptid Kisspeptin gesteuert, welches sich an die GnRH bildende Neuronen bindet und diese stimuliert (Dedes, 2012; Lents et al., 2008). Kisspeptin spielt somit, wie bei den meisten Säugetieren, eine signifikante Rolle für den Eintritt in die Geschlechtsreife und die Funktion der Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse bei der Hündin (Albers-Wolthers et al., 2014). GnRH löst in der Adenohypophyse die Bildung und Sekretion des Follikelstimulierenden Hormons (FSH) und Luteinisierenden Hormons LH aus (Beijerink et al., 2004). Diese beiden Hormone haben Auswirkungen auf die Reifung und Entwicklung der Follikel sowie die Ovulation. Die Ovarien bilden das Sexualsteroid Östrogen (17beta Estradiol, E2), welches wiederum einen Einfluss auf die Sekretion von GnRH, FSH und LH hat: Während der Ovarruhe (Anöstrus) wird Östrogen nur in basalen Konzentrationen sezerniert, welche ein negatives Feedback auf Hypothalamus und Hypophyse haben. Im Laufe des Sexualzyklus steigen die Östrogene allerdings an und sensibilisieren die Hypophyse im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus kurz vor Eintritt in den Proöstrus für das GnRH, wodurch schließlich mehr LH und FSH synthetisiert werden (Beijerink et al., 2007; Concannon, 2009). FSH bewirkt eine Proliferation und Wachstum der Follikel. Man unterscheidet Primordialfollikel, Primärfollikel, Sekundärfollikel, Tertiärfollikel und Graaf Follikel (Zoppei et al., 2021). Die Anzahl der sich bei der Hündin in einem Proöstrus zu Östrus entwickelnden Follikel ist von mehreren Faktoren, wie Rasse, Umwelt, Alter, Genetik und anderen abhängig (Samik & Safitri, 2017). Das in den ovarialen Granulosazellen gebildete Hormon Inhibin hemmt die Freisetzung von FSH (Findlay, 1986). Neue Untersuchungen an anderen Spezies konnten zeigen, dass auch das in den Follikeln gebildete Anti-Müller-Hormon an einer Inhibierung bzw. Steuerung des Follikelwachstums beteiligt ist (Carlsson et al., 2006; Yang et al., 2017). Diese hormonellen Mechanismen dienen vermutlich dazu, die Anzahl der sich anbildenden Follikel auf ein biologisch sinnvolles Maß zu begrenzen.

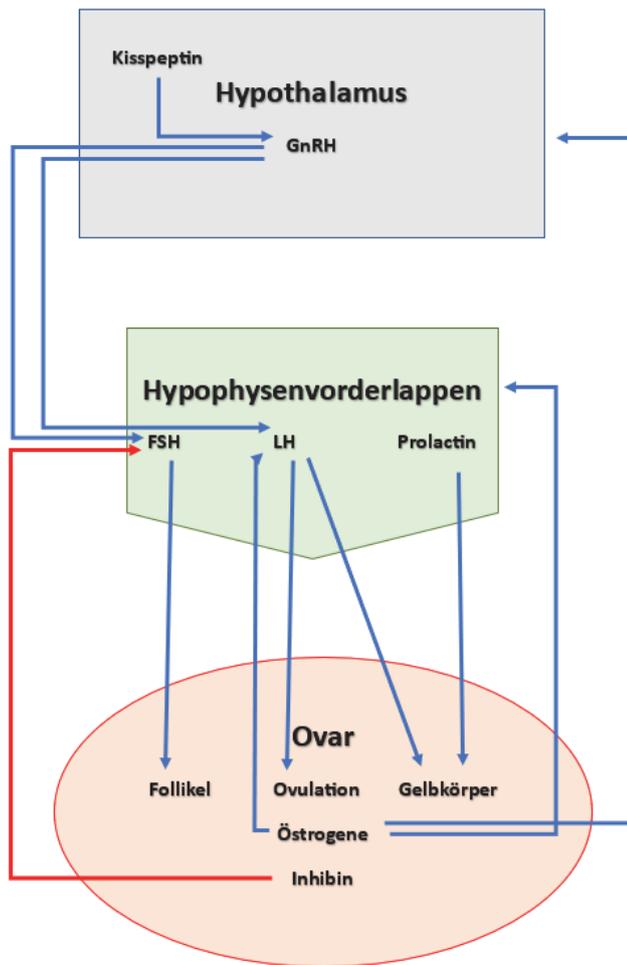


Abbildung 2: Die Hypothalamus- Hypophysen- Ovarien- Achse in Proöstrus und Östrus der Hündin.

Modifiziert nach (Günzel Apel, 2016)

Blaue Pfeile = stimulierende Wirkung

Rote Pfeile = inhibierende Wirkung

Je reifer die Follikel werden, desto mehr Östrogen produzieren sie, was zunächst noch einen hemmenden Effekt auf die FSH- Sekretion hat. Ab einem spezifischen Schwellenwert hat das Östrogen einen stimulierenden Effekt auf die LH- Sekretion (Beijerink et al., 2007; Wildt et al., 1979). Dadurch steigt die LH- Konzentration im Blut stark an (LH- Peak). Der Umbau der Follikelwand durch enzymatische Prozesse führt zur Bildung des Stigmas, welche durch LH weiter aufgelöst wird, bis das Stigma reißt und es zur Ovulation kommt (Duffy et al., 2019). Der nach der Ovulation der Oozyte übrig gebliebene Follikel auf dem Ovar wandelt sich durch den LH-Einfluss in einen Gelbkörper (Corpus luteum) um (Kowalewski, 2014). Dieser bildet das Hormon Progesteron, welches für den Trächtigkeitserhalt eine Rolle spielt und auch als Messparameter für die Bestimmung der Ovulation herangezogen werden kann (Moxon et al., 2012; Nöthling et al., 2022; Zuercher et al., 2021a, 2021b). Letzteres ist möglich, weil bei der Hündin als tierartliche Besonderheit die Granulosazellen und Theca interna Zellen des Follikels bereits vor der Ovulation beginnen, Progesteron zu synthetisieren. Man spricht auch

von der Progesteronsynthese präovulatorischer Follikel. Die genauen Mechanismen und biologischen Bedeutungen, warum bei der Hündin bereits vor der Ovulation die Progesteronkonzentration steigt, sind noch nicht geklärt (de Gier et al., 2006).

Im weiteren Zyklusverlauf wird durch das luteotrope Hormon Prolactin der Abbau der Corpora lutea zunächst verhindert (Kowalewski et al., 2011). Dieses Polypeptid wird in der Hypophyse gebildet und erfüllt, neben dem Erhalt der Corpora lutea und damit der eventuellen Trächtigkeit, unter anderem Aufgaben im Bereich der Mammo- und Lactogenese und des peripartalen Brutpflegeverhaltens (Freeman et al., 2000). Die Gelbkörper bleiben für die Dauer der Trächtigkeit (circa 63 Tage) in manchen Fällen aber auch länger bestehen (Papa & Kowalewski, 2020).

Findet keine Befruchtung der Oozyte statt, wird in einem ähnlichen Zeitverlauf erst nach mehreren Wochen die Luteolyse eingeleitet. Dies ist ebenfalls eine tierartliche Besonderheit des Hundes, da es bei den anderen Haustierarten im Falle einer ausbleibenden Trächtigkeit meist innerhalb von zwei bis drei Wochen durch Prostaglandin F_{2α} zur Luteolyse kommt, damit eine neue Brunst einsetzen kann. Der genaue Mechanismus dieses Phänomens bei der Hündin ist noch nicht vollständig erforscht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass 35 Tage nach der Ovulation in den steroidproduzierenden Zellen des Gelbkörpers Degenerationsprozesse beginnen, die anhand von Fettvakuolen im Cytoplasma dargestellt werden können (Kowalewski, 2018). Im Gegensatz zu anderen Haussäugetieren spielt im Endometrium des Uterus gebildetes Prostaglandin bei der Hündin bei der Luteolyse keine Rolle (Hoffmann et al., 1992; Kowalewski, 2018). Vielmehr ist beim Gelbkörper der Hündin die Versorgung mit gonadotropen Hormonen für den Erhalt entscheidend, sowie andere regulierende Faktoren, wie der Glucose- und Insulinhaushalt (Kowalewski, 2014). Eine weitere Besonderheit ist, dass der Gelbkörper während der gesamten Dauer der Trächtigkeit die Progesteronbildung übernimmt und nicht, wie bei anderen Tierarten üblich, dies im Verlauf der Trächtigkeit vom Uterus bzw. von der Plazenta übernommen wird (Kowalewski, 2018; Papa & Kowalewski, 2020).

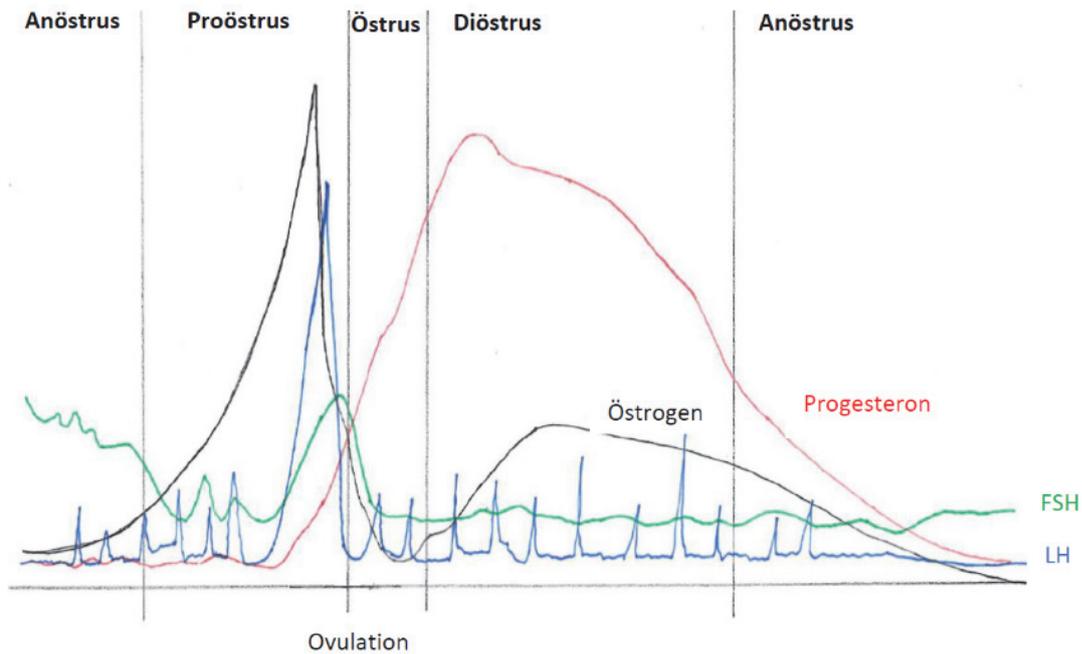


Abbildung 3: Schematische Darstellung der hormonellen Veränderungen während des Sexualzyklus. Modifiziert nach (Kowalewski, 2018)

2.4 Der Sexualzyklus der Hündin

Der Eintritt in die Geschlechtsreife ist durch den Beginn des ersten Sexualzyklus gekennzeichnet (Root Kustritz, 2012a; Schäfer-Somi et al., 2022). Hierbei weist die Hündin jedoch erhebliche rassebedingte und individuelle Schwankungen auf. Die erste Läufigkeit kann mit 6 bis 14, in manchen Fällen sogar erst mit 18 Monaten eintreten (Concannon, 2011). Größere Rassen werden häufig später geschlechtsreif als kleinere Rassen (Root Kustritz, 2012a).

Hündinnen durchlaufen in der Regel ein oder zwei Sexualzyklen pro Jahr, wobei der Östrus asaisonal, das heißt nicht an eine Jahreszeit gekoppelt ist, aber meist im Frühjahr oder Herbst auftritt (Aydin et al., 2011; Concannon, 2011). Der Sexualzyklus wird in 4 Stadien unterteilt: den Proöstrus, den Östrus, die Lutealphase und den Anöstrus (Aydin et al., 2011; Goodman, 2001). Jedes Stadium zeichnet sich durch eine charakteristische Veränderung körperlicher aber auch endokrinologischer Merkmale aus (Reckers et al., 2022).

2.4.1 Der Proöstrus

Der Proöstrus stellt den Beginn der Läufigkeit dar. Für den Tierbesitzer lässt sich der Beginn dieses Stadiums an dem blutigen Ausfluss sowie einer Ödematisierung der Vulva erkennen (de Gier et al., 2006; Goodman, 2001). Der Ausfluss erhält seine charakteristische Farbe durch die Diapedese von Erythrozyten durch die Uterusschleimhaut, ausgelöst durch eine steigende

Östrogenkonzentration im Blut (Sharma & Sharma, 2016). Die steigende Östrogenkonzentration hat außerdem zur Folge, dass das Epithel der Vaginalschleimhaut sich verdickt und ödematisiert (Aydin et al., 2011). Von ursprünglich zwei bis vier Zellschichten im frühen Anöstrus wächst das Epithel auf ein Vielfaches an (Linde & Karlsson, 1984), mutmaßlich um die Vagina beim Eindringen des männlichen Penis zu schützen (Davidson, 2015). Zellen der höhergelegene Schichten des Epithels werden nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt- Die Nuclei werden pyknotisch, die Zellen keratinisieren und gehen schlussendlich zugrunde (Apoptose) (Aydin et al., 2011). In der Vaginalzytologie lassen sich mit steigender Dicke des Epithels daher vermehrt Intermediärzellen und erste Superfizialzellen und kernlose Superfizialzellen (so genannte Schollen) nachweisen (Pérez et al., 2005). Ein hoher Anteil von Erythrozyten im Abstrich ist charakteristisch für den Proöstrus (Antonov, 2016). Die ansteigende Östrogenkonzentration unterstützt zudem die Follikulogenese. Die Progesteronkonzentration ist zu Beginn des Proöstrus relativ niedrig und beginnt mit Übergang in den Östrus zu steigen (Nett et al., 1975). Am Ende des Proöstrus beginnen die FSH Konzentrationen aus oben genannten Gründen zu fallen.

Die Hündin wird interessanter für Rüden, lässt einen Deckakt jedoch noch nicht zu (Moxon et al., 2012). Ausgelöst wird das Interesse durch Sexualpheromone, welche überwiegend mit dem Vaginalsekret ausgeschieden werden (Dzięcioł et al., 2017). Der Einsatz von künstlichen Pheromonen ist beschrieben, der die Samengewinnung bei jungen und nervösen Rüden vereinfachen soll (Kutzler, 2005).

Die Dauer des Proöstrus ist erheblich vom Individuum abhängig und schwankt zwischen fünf Tagen bis drei Wochen, im Durchschnitt beträgt die Dauer neun Tage (Concannon, 2011; Kowalewski, 2018).

2.4.2 Der Östrus

In diesem Stadium duldet die Hündin die Begattung durch den Rüden (das Aufreiten und Intromission des Penis) (Root Kustritz, 2012b). Im Rahmen einer adspektorischen Untersuchung lässt sich der Östrus am strohfarbenen Vaginalausfluss erkennen und an dem Rückgang der Ödematisierung der Vulva, ausgelöst durch den abfallenden Östrogenspiegel (Root Kustritz, 2012a). In der Vaginalzytologie lassen sich fast ausnahmslos Superfizialzellen und Schollen darstellen (Post, 1985). Bei der Befundung während einer vaginoskopischen Inspektion erscheint die Vaginalschleimhaut gefältelt, was auch als Krenulation der Schleimhaut bezeichnet wird (Bergeron et al., 2014; Moxon et al., 2012). Ausgelöst wird dies durch die nachlassende ödematöse Schwellung der Mucosa, da die Östrogenkonzentrationen im Blutserum sinken und die Progesteronkonzentrationen steigen (Goodman, 2001; Pérez et al., 2005). Es kommt daraufhin, wie oben beschrieben, zum LH Peak. Zwischen LH Peak und

den Ovulationen vergehen in der Regel etwa 48 Stunden (Bouchard et al., 1991). Analog dazu wurde postuliert, dass die Ovulationen meist drei Tage nach Beginn des Östrus stattfinden (de Gier et al., 2006). Über einen Zeitraum von 2 bis 3 Tagen ovulieren nun mehrere Follikel (Linde & Karlsson, 1984). Das Östrusstadium dauert in etwa 5 bis 15 Tage, jedoch gibt es auch hier erhebliche individuelle Unterschiede (Concannon, 2011).

Während des Östrus sollte die Begattung bzw. Besamung stattfinden (Antonov, 2016). Die Spermien sind sehr anfällig für oxidativen Stress (Hesser et al., 2017). Frisch ejakulierte Spermatozoen können im weiblichen Genitaltrakt bis zu 11 Tage überleben (Doak et al., 1967; England et al., 2021). Die Überlebenszeit von gekühlten oder Tiefkühlsperma kann deutlich geringer sein (48 Stunden +/- 12 Stunden) (Goodman, 2001; Schutte, 1967). Die Oozyten der Hündin reifen in der Tuba uterina noch 2 bis 5 Tage, bevor sie befruchtet werden können (Hase et al., 2000; Linde & Karlsson, 1984). Sie ovulieren als primäre Oozyten und durchlaufen in einem ca. 48 bis 60 stündigen Vorgang die erste meiotische Teilung, bevor sie sekundäre, befruchtbare, Oozyten sind (Cardilli et al., 2021; Tsutsui, 1989; Tsutsui & Ejima, 1988). Diese überleben ca. 108 Stunden nach der Ovulation, weshalb den Spermatozoen circa 48 Stunden Zeit für die Befruchtung bleiben (Tsutsui, 1989).

2.4.3 Die Lutealphase

Der Beginn der Lutealphase (von einigen Autoren auch als Diöstrus oder Metöstrus bezeichnet) ist dadurch charakterisiert, dass die Hündin die Begattung des Rüden nicht mehr duldet (Root Kustritz, 2012b). Auch der Rüde verliert das Interesse an der Hündin (Moxon et al., 2012). Die Vulvaschwellung nimmt weiter ab und es kann im Anfangsstadium zu mukösem, weiß- käsigem Ausfluss aus der Vagina kommen (Ajala et al., 2012; Root Kustritz, 2012a). Die Anzahl der Zellschichten des Vaginalepithels nimmt rasch ab (Moxon et al., 2012). Der Beginn der Lutealphase lässt sich in der Regel gut per Vaginalzytologie diagnostizieren: Der Vaginalabstrich ist charakterisiert durch eine Abnahme des Anteils der Superfizialzellen und Schollen um mindestens 20%, sowie das Auftreten von Intermediärzellen und neutrophilen Granulozyten (Antonov, 2016). Es wird angenommen, dass die abgestorbenen Epithelzellen den Influx der neutrophilen Granulozyten induzieren.

Die Progesteronkonzentration steigt in der ersten Hälfte der Lutealphase auf 15 bis 80 ng/ml an, um danach wieder allmählich zu fallen (Zuercher et al., 2021b). Progesteron hat vielfältige Wirkungen, welche den Verschluss der Cervix uteri, Sekretionen des Endometriums zur Ernährung der Embryonen, eine Modulation der Immunantwort im Uterus sowie die Ermöglichung der Einnistung der Blastozysten in das Endometrium des Uterus (Plazentabildung) einschließen (Taraborrelli, 2015). Gegen Ende der Lutealphase, welche

60 bis 100 Tage andauern kann, können Veränderungen auftreten, die bei Hündinnen rund um den Geburtszeitraum zu erwarten sind. So kann es auch bei nicht-tragenden Hündinnen zu Symptomen wie die Vergrößerung der Gesäugeleiten, Nestbauverhalten und Abdomenschwellung kommen, welche im Volksmund oft als „Scheinträchtigkeit“ bezeichnet werden. Als Grund für diese Veränderungen werden die bei Hunden lang anhaltende Progesteronphase und die Abnahme der Konzentrationen angenommen (Root Kustritz, 2012a). Mit sinkenden Progesteronkonzentrationen im Blutserum steigt zudem die Prolactinkonzentration am Ende der Lutealphase (Freeman et al., 2000).

2.4.4 Der Anöstrus

Der Anöstrus dauert bis zu 240 Tage (Concannon, 2011). Andere Autoren sprechen von bis zu 10 Monaten (de Gier et al., 2006), wobei es individuelle und rassebedingte Unterschiede gibt. Während des Anöstrus ist die Hündin nicht an Rüden interessiert und die Vulva erscheint klein und unauffällig (Root Kustritz, 2012a). Die Vaginalschleimhaut wirkt blass bis rosarot und ist durch eine geringe Anzahl von Zellschichten des Epithels gekennzeichnet (Reddy et al., 2011). In der Vaginalzytologie lassen sich wenig Zellen nachweisen (Aydin et al., 2011). Es sind meist nur einzelne Parabasalzellen und kleine Intermedärzellen darstellbar (Post, 1985). Die Progesteronkonzentration im Blutserum liegt zumeist unter 1 ng/ml (Olson et al., 1982). Die Produktion der Sexualhormone in Hypophyse und Ovarien findet kaum über Basalniveau statt, sodass sich nur geringgradige Konzentrationen von FSH und auch von Östrogen nachweisen lassen (Goodman, 2001). FSH kann allerdings kurzzeitig auch Werte zwischen 50 und 100% der Konzentration im Proöstrus annehmen, wobei die Reifung von Follikeln im Anöstrus aber größtenteils unterdrückt wird (Root Kustritz, 2012b).

Am Ende des Anöstrus beginnt der Hypothalamus wieder vermehrt GnRH zu sezernieren, was den nächsten Proöstrus einleitet (Root Kustritz, 2012a).

2.5 Die Bestimmung des Zyklusstands der Hündin

Um eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Befruchtung zu erreichen, ist es wichtig, den Zeitpunkt der Ovulation möglichst genau zu bestimmen (Arlt, 2018). Begattungen oder Besamungen zum falschen Zeitpunkt in der Läufigkeit gelten als die häufigste Ursache für eine ausbleibende Trächtigkeit oder geringe Welpenzahlen (Goodman, 2001; Hewitt & England, 2000; Moxon et al., 2012).

Die oben beschriebenen physiologischen Besonderheiten der klinischen Symptome der Läufigkeit, die erforderliche Zeit für die Reifung der Oozyten, die begrenzte Überlebensdauer von Spermien und auch individuelle Besonderheiten der Hündinnen erschweren es für

Hundebesitzer*Innen, den optimalen Besamungszeitpunkt zu bestimmen (Root Kustritz, 2012b).

Hinzu kommt, dass die oben beschriebenen Variationen im Ablauf des Sexualzyklus ein hinreichendes Deckmanagement erschweren, wenn nicht eingehende Untersuchungen erfolgen. Verfrühte oder verspätete Ovulationen, fehlender Eintritt in die Läufigkeit, „stille“ oder „weiße“ Läufigkeiten, ohne jegliche äußerliche Anzeichen, unterbrochene und ovulationsfreie Läufigkeiten und Dauerläufigkeit sind ebenfalls beschrieben (Goodman, 2001; Okkens, 1994). Läufigkeitssymptome des Proöstrus und Östrus, wie vaginaler Ausfluss, Ödematisierung der Vulva und Vaginalmucosa sowie das Verhalten der Hündin, geben nur vage Hinweise auf die tatsächlichen ovariellen Prozesse und sind daher zu ungenau, um den Zeitpunkt der Ovulationen exakt zu bestimmen (Lévy & Fontbonne, 2007; Moxon et al., 2012). Die Dauer der Phasen des Sexualzyklus kann sowohl interindividuell als auch intraindividuell sehr unterschiedlich ausfallen (England & Concannon, 2002; Gurler et al., 2018).

Unterschiedliche Möglichkeiten zur Bestimmung des Zyklusstands und des Besamungszeitpunktes sind beschrieben. Es wird empfohlen, sich nicht auf eine einzelne Untersuchung zu verlassen, sondern ein Gesamtbild aus unterschiedlichen Untersuchungsbefunden zu erarbeiten, um den Ovulationstermin nicht zu verpassen (Fáy et al., 2003; Gurler et al., 2018). Somit kann die Läufigkeit der Hündin am besten erkannt und überwacht werden und auch auf eventuelle Unregelmäßigkeiten im Sexualzyklus angemessen reagiert werden.

2.5.1 Vaginoskopie

Der Anstieg und Abfall der ovariellen Hormone während des Sexualzyklus haben Einfluss auf die Morphologie der Vaginalschleimhaut (Bergeron et al., 2014). Per Vaginoskopie mittels Spekulum oder Endoskop lassen sich die Veränderung während der Läufigkeit gut befunden (Meghasree et al., 2019). Ähnlich wie bei der Vaginalzytologie sollte die Beurteilung der Schleimhaut in der Vagina propria erfolgen (Goodman, 2001). Insgesamt ist das Lumen von Vulva, Vestibulum und Vagina der Hündin mit bis zu 35 cm (Lévy, 2016) im Vergleich zu anderen Haustieren relativ lang (Romagnoli & Lopate, 2014). Aufgrund der Länge und des Vorhandenseins der dorsalen, medialen Falte, bedarf die Untersuchung der Cervix einiger Erfahrung (Romagnoli & Lopate, 2014). Die Vaginoskopie wird in den meisten Fällen am stehenden, unseidierten Tier durchgeführt und von der Hündin meist gut toleriert (England & Concannon, 2002).

Der steigende Östrogenspiegel im Blut führt neben der Proliferation der vaginalen Mukosazellen zu einer Ödematisierung der Vaginalschleimhaut (England & Concannon, 2002; Moxon et al., 2012). Während des Proöstrus beginnt sie anzuschwellen und erreicht an dessen

Ende ein Maximum an Ödematisierung (Bergeron et al., 2014). Sie weist nun eine glatte und pralle Oberfläche auf (Skliarov et al., 2022). Durch die Ödematisierung und Verdickung des Epithels werden darunterliegende Blutgefäße schlechter erkennbar, wodurch die Schleimhaut blass rosa bis creme weiß erscheint (England & Concannon, 2002). Zudem ist die Schleimhaut sehr feucht und teils mit blutigem Sekret bedeckt.

Sobald die Östrogenkonzentration im Östrus abfällt, verliert die Mukosa an Spannung und beginnt abzuschwellen. Die zelluläre Rückbildung ist jedoch nicht so schnell wie die Abnahme der Ödematisierung, weshalb die Mukosa kollabiert. Eine Fältelung (Krenulation) entsteht, die typisch für den Östrus ist und die indirekt für eine ungenaue Ermittlung des Zeitpunkts der Ovulationen genutzt werden kann (England & Concannon, 2002; Goodman, 2001). Die Krenulation erreicht bei vielen Hündinnen um den Zeitraum der Oozytenreifung ihr Maximum (Bergeron et al., 2014; Moxon et al., 2012). In der Lutealphase schwillt die Mukosa weiter ab, wirkt zunehmend blass und flach. Da das Epithel zunehmend dünn wird, erscheint die Oberfläche rosarot und kommt es durch vaginale Untersuchungen schneller zu Reizungen und Verletzungen (England & Concannon, 2002; Skliarov et al., 2022).

2.5.2 Die Vaginalzytologie

Die steigenden Östrogenkonzentrationen vor und während des Proöstrus der Hündin haben einen großen Einfluss auf die Proliferation des Vaginalepithels (Aydin et al., 2011). Somit lässt sich anhand der Veränderung der Schleimhaut und der Proliferation der Vaginalzellen indirekt auch das Zyklusstadium ablesen (Bergeron et al., 2014; Meghasree et al., 2019). Je intensiver und länger Östrogen auf das Vaginalepithel einwirkt, umso ausgeprägter wird dessen Proliferation und Verdickung (Lévy, 2016; Sharma & Sharma, 2016). Zellen der oberliegenden Schichten werden schlechter mit Blut und Nährstoffen versorgt. Sie keratinisieren und werden pyknotisch (Aydin et al., 2011; Pérez et al., 2005). Im Rahmen einer vaginalen Untersuchung können Vaginalzellen mittels Tupfer exfoliativ aus der Vagina entnommen, auf einen Objektträger aufgetragen, und nach einem Anfärbeverfahren mikroskopisch evaluiert werden (Antonov, 2016; Arlt, 2018). In der Praxis werden für die Färbung meist Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) verwendet (Arlt 2018).

Neben Vaginalzellen lassen sich auch andere Zellen, die in physiologischen und/oder pathologischen Situationen vorkommen, nachweisen (Antonov, 2016). Erwähnenswert bei dieser Technik ist, dass sichtbare Veränderungen der Vaginalzellen mit einer Verspätung von bis zu sechs Tagen auf die steigenden oder fallenden Östrogenkonzentrationen im Blut auftreten und somit das Zellbild des Abstrichs immer nur einen retrospektiven Blick auf das Hormongeschehen erlaubt (Lindh et al., 2022). Die hormonelle Zellwandproliferation findet auch im Vestibulum statt. Jedoch ist die Reaktion der Vestibulummukosa auf die

schwankenden Hormonkonzentrationen verzögert, weshalb sich diese Zellen nicht zur Bestimmung des Zyklus eignen. Durch die Nutzung eines Spekulum sollte eine Entnahme dieser Zellen daher vermieden werden (Antonov, 2016; Davidson, 2015).

2.5.2.1 Die Entnahme

Für die Entnahme einer Probe für eine vaginalzytologische Untersuchung kann ein befeuchteter Baumwolltupfer verwendet werden (Root Kustritz, 2012a). In der Praxis haben sich kommerziell erhältliche Modelle bewährt, welche an einem Holz- oder Plastikstab befestigt sind.



Abbildung 4: Ausrollen des Tupfers auf einem Objektträger

Einige Autoren beschreiben die Entnahmetechnik folgendermaßen: Mit einer Hand werden die Labien der Vulva vorsichtig gespreizt und mit der anderen Hand wird vorsichtig der Tupfer im annähernd 90° Winkel zum Behandlungstisch in die dorsale Kommissur der Vulva eingeführt (Aydin et al., 2011). Der Tupfer wird entlang des Scheidendachs nach craniodorsal geschoben und dort rotiert, um die Vaginalzellen aufzunehmen (Pérez et al., 2005).

Inwiefern ein Spekulum die Entnahme vereinfacht bzw. das Ergebnis verbessert, ist bisher nicht wissenschaftlich untersucht (Arlt, 2018). Es erscheint allerdings plausibel, dass Zellen der Vulva und des Vestibulums möglichst nicht am Tupfer haften bleiben sollten. Diese sollen wie beschrieben langsamer auf veränderte Östrogenkonzentrationen reagieren, sodass sie das Ergebnis verfälschen können (Antonov, 2016; Davidson, 2015). Weiterhin könnte eine

Kontamination durch verhornte Zellen der äußeren Haut der Vulva dazu führen, dass fälschlicherweise ein Östrogeneinfluss angenommen wird. Die Entnahme von Vaginalzellen durch Aspirations- und Spültechniken ist ebenfalls beschrieben, in der Praxis aber wenig üblich (Sharma & Sharma, 2016).

Nach der Entnahme wird der Tupfer umgehend mit nur geringem Druck auf einem sauberen Objektträger ausgerollt. Dieser wird nach Lufttrocknung mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (zum Beispiel Diff Quick®, modifizierte Wright Giemsa) angefärbt (Davidson, 2015). Färbungen nach Papanicolaou oder Kubicek sind ebenfalls beschrieben. Diese haben den Vorteil, dass sich gesunde, basophile Zellen blau und keratinisierte, acidophile Zellen orange färben (Pérez et al., 2005). Der Zeit- und Kostenaufwand ist jedoch erheblich höher (Pérez et al., 2005).

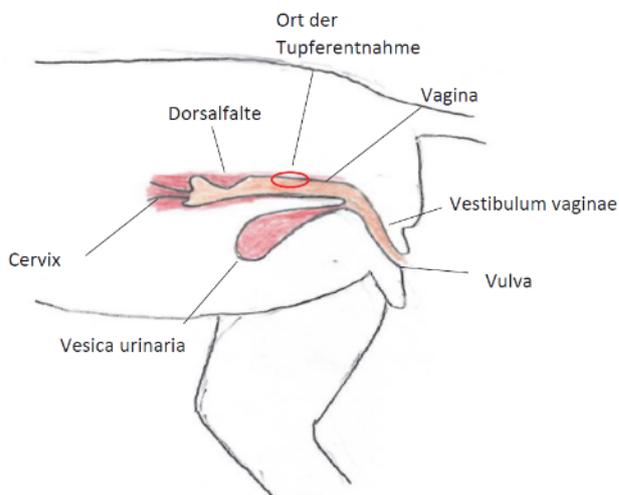


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Begattungsorgane und Blase. Modifiziert nach (Davidson, 2015)



Abbildung 6: Vaginalabstrich bei einer Hündin mit Tupfer und Spekulum

2.5.2.2 Die Evaluierung der Zellen

Um den Vaginalabstrich interpretieren zu können, müssen die exfolierten Zellen evaluiert werden. Dies kann sich als kompliziert herausstellen und vor allem für ungeübte Personen eine große Herausforderung darstellen (Moxon et al., 2010; Reckers et al., 2022). Subjektive Einschätzungen der Abstriche können zu heterogenen Evaluierungen und damit sehr unterschiedlichen Einordnungen des jeweiligen Abstrichs in den Sexualzyklus führen (Art, 2018). Hinzu kommt das Problem, dass die Definitionen der Zellen in der Fachliteratur teilweise weit auseinander liegen und sich teils sogar widersprechen (Reckers et al., 2022). Charakteristika der Vaginalzellen, die für die Einordnung herangezogen werden können, sind die Zellgröße und -form, das Zytoplasma-Kern-Verhältnis, der Degenerationszustand des Zellkerns, und Verhornungsgrad (Pérez et al., 2005).

Es werden Basalzellen, Parabasalzellen, Intermediärzellen, Superfizialzellen und Schollen (auch als kernlose Superfizialzellen bezeichnet) unterschieden (Antonov, 2016). Da die Basalzellen die unterste Schichte des Vaginalepithels bilden und diese nach einigen Autoren nicht ohne dessen Beschädigung entnommen werden können, wird dieser Zelltyp im Rahmen der exfoliativen Vaginalzytologie im Folgenden nicht berücksichtigt (Olson et al., 1984; Reckers et al., 2022).

Definition der einzelnen vaginalen Zellen nach (Reckers et al., 2022):

Die kleinsten vaginalen Zellen, die in der exfoliativen vaginalen Zytologie zu finden sind, sind Parabasalzellen. Sie haben einen Durchmesser von weniger als 20 μm (Abbildung 7).



Abbildung 7: Parabasalzelle

Bei vaginalen Zellen, die einen Durchmesser von $\geq 20 \mu\text{m}$ aufweisen, muss unterschieden werden, ob bereits Keratinisierungslinien (Abbildung 8) auf der Zelle zu erkennen sind oder nicht.

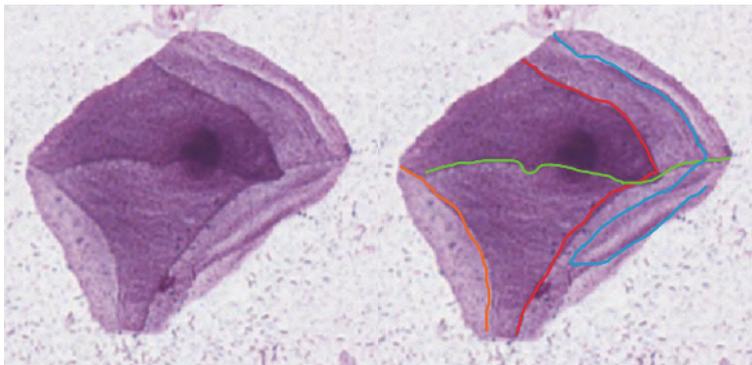


Abbildung 8: vaginalen Zelle mit Keratinisierungslinien (im rechten Bild sind die Keratinisierungslinien nachgezeichnet)

Wenn die Zelle maximal eine Keratinisierungslinie besitzt, wird der Flächeninhalt des Nucleus gemessen. vaginalen Zellen mit einem Nucleusflächeninhalt von $\geq 79.5 \mu\text{m}^2$ werden als Intermediärzelle bezeichnet (Abbildung 9).



Abbildung 9: Intermediärzelle

Vaginalzellen mit einem Nucleusflächeninhalt von $\leq 79.5 \mu\text{m}^2$ und Vaginalzellen mit mehr als einer Keratinisierungslinie werden nach der Sichtbarkeit ihres Nucleus beurteilt. Wenn der Nucleus zu erkennen ist, wird die Degeneration des Nucleus untersucht. Zellen, deren Nucleus abgrenzbar vom Cytoplasma ist und ein Farbunterschied zwischen Nucleus und Cytoplasma besteht, werden als Superficialzelle bezeichnet (Abbildung 10).



Abbildung 10: Superficialzelle

Zellen, deren Nucleus nicht sichtbar ist, oder der Nucleus degeneriert und nicht mehr abgrenzbar vom Cytoplasma ist, werden als Schollen oder kernlose Superficialzellen bezeichnet (Abbildung 11).

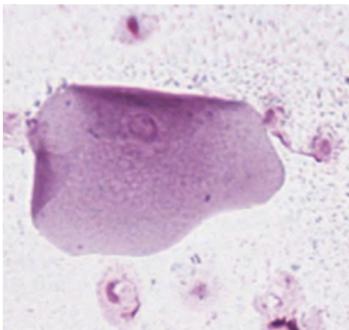


Abbildung 11: Scholle/ kernlose Superficialzelle

Anhand des prozentualen Vorkommens des jeweiligen Zelltyps lassen sich die Stadien des Sexualzyklus erkennen. Auch hier gibt es jedoch unterschiedliche Herangehensweisen: Manche Autoren definieren den Zeitpunkt des Östrus so, dass der Vaginalabstrich 100% Superficialzellen beinhaltet, wovon mindestens 80% einen pyknotischen oder degenerierten Zellkern aufweisen (Antonov, 2016; Bergeron et al., 2014). Für andere Autoren repräsentiert die Präsenz von mindestens 90% keratinisierte Superficialzellen den Zeitpunkt des Östrus (Bouchard et al., 1991). Eine weitere Definition für den Eintritt in den Östrus lautet, dass 100% Zellen keratinisiert sind und sich davon 50% kernlos darstellen (Kustritz, 2006). Für die Bestimmung des Beginns der Lutealphase herrscht zwischen den Autoren eine größere Übereinstimmung. Der Eintritt in dieses Stadium ist gekennzeichnet durch einen Abfall

des Anteils an Superficialzellen und Schollen um mindestens 20% (Antonov, 2016; Bouchard et al., 1991; Olson et al., 1984). Auch ein vermehrtes Auftreten von neutrophilen Granulozyten ist charakteristisch für den Beginn der Lutealphase (Aydin et al., 2011; Post, 1985). Neben den Vaginalzellen können auch andere Zellen auf dem Abstrich nachgewiesen werden. Während des Proöstrus kommen vermehrt Erythrozyten vor, die im Laufe des Östrus deutlich weniger werden (Root Kustritz, 2012a; Sharma & Sharma, 2016). Das Auftreten von Erythrozyten geht auf die Östrogeneinwirkung auf das Vaginalepithel zurück, die die Diapedese von Erythrozyten durch die Schleimhaut begünstigt, wodurch der charakteristische blutige Ausfluss zustande kommt, (Basu et al.; Davidson, 2006; Sharma & Sharma, 2016) Vor allem in der frühen Lutealphase ist die Vaginalzytologie durch ein großes Vorkommen an neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet, welches durch die erforderliche Beseitigung einer übermäßigen bakteriellen Besiedlung und der abgestorbenen Epithelzellen erklärt wird (Antonov, 2016; Gupta et al., 2012).

Das Auftreten von neutrophilen Granulozyten in moderaten Mengen auf einem Vaginalabstrich ist außerhalb des Östrus physiologisch und muss nicht mit einer Vaginitis einhergehen (Haji et al., 2018). Zudem gilt, dass Bakterien auch in Vaginalabstrichen gesunder Hündinnen vorkommen, da die Vagina durch eine physiologische Bakterienflora besiedelt ist (Groppetti et al., 2012). Weitere mögliche Befunde im Vaginalabstrich können Spermien und neoplastische Zellen sein (Antonov, 2016).

2.5.3 Progesteronbestimmung

Der optimale Zeitraum für die Befruchtung ist im Durchschnitt vier bis 7 Tage nach dem LH Peak (Rijsselaere et al., 2004). Die beginnende Luteinisierung und die damit einhergehende Steigerung der Progesteronsekretion wird oft als Grundlage zur Bestimmung des Sexualzyklus, bzw. der Ovulation genommen (Bergeron et al., 2014). Eine Besonderheit der Hündin, im Vergleich zu anderen Haustierarten, ist, dass die Progesteronkonzentration bereits zwei bis drei Tage vor der Ovulation messbar ansteigt (Rijsselaere et al., 2004; Root Kustritz, 2012a). Ursache hierfür ist eine frühzeitige Luteinisierung der Zellen der Granulosazellschicht und der Theka interna durch das Luteinisierende Hormon. Zum Zeitpunkt der Ovulation ist die Progesteronkonzentration auf circa 5 bis 8 ng/ml gestiegen. Diese Konzentrationen zeigen im klinischen Kontext die Ovulationen an. Die nachfolgenden, höheren Konzentrationen zeigen das Vorhandensein aktiver Corpora lutea an (Zuercher et al., 2021a). Im Laufe des späten Östrus und der frühen Lutealphase erhöhen die Corpora lutea die Progesteronproduktion und die Konzentrationen steigen in der Regel auf über 20 ng/ml an (Nett et al., 1975; Olson et al., 1982). Die Messung erfolgt im Blutserum oder Blutplasma (Bergeron et al., 2014).

2.5.4 Weitere Möglichkeiten der Zyklusdiagnostik

Neben den drei gängigsten Methoden, der Vaginoskopie, der Vaginalzytologie und der Progesteronbestimmung, gibt es weitere Möglichkeiten, den Zyklusstand der Hündin zu diagnostizieren (Bouchard et al., 1991; Goodman, 2001). Auch bei diesen Methoden muss berücksichtigt werden, dass zwischen den Individuen erhebliche, physiologische Unterschiede auftreten können.

2.5.4.1 LH Bestimmung

Durch den oben genannten Feedbackmechanismus steigen Frequenz und Amplitude des LH in der Läufigkeit an, bis es im späten Proöstrus zum LH Peak kommt. Dabei können Konzentrationen von bis zu 742 ng/ml erreicht werden (Olson et al., 1982). Auf den LH Peak folgen im Abstand von 24 bis 72 Stunden die Ovulationen (Phemister et al., 1973; Wildt et al., 1978). In der Theorie ist die Bestimmung der LH Konzentration im Blut somit die sicherste Möglichkeit, den Zeitpunkt der Ovulationen zu ermitteln und damit den Begattungs- oder Besamungszeitraum zu planen. Allerdings muss beachtet werden, dass es sich hierbei um einen pulsatile Geschehen handelt. In der Praxis stellt sich die LH Bestimmung daher schwierig dar, da die Konzentration von LH im Blut sehr rasch ansteigt und schnell wieder abfällt, weshalb mindestens eine – nach einigen Autoren besser zwei - Blutabnahmen pro Tag nötig ist, um den LH Peak mit einer angemessenen Sicherheit zu erfassen (Romagnoli, 2014; Root Kustritz, 2012a).

2.5.4.2 Äußere Veränderungen und Verhalten

Während der Läufigkeit verändert die Hündin ihr Verhalten gegenüber männlichen Artgenossen. Das Interesse an Rüden steigt zwischen Proöstrus und Östrus (Moxon et al., 2012). Die Hündin sucht vermehrt die Aufmerksamkeit und präsentiert ihre Anogenitalregion (Moxon et al., 2012). Vor allem Urin und Vaginalflüssigkeit erwecken starkes Interesse der Rüden (Root Kustritz, 2012a). Im Proöstrus wird die Hündin interessanter für den Rüden, lässt Begattungsversuche jedoch noch nicht zu (Butinar et al., 2004; Goodman, 2001). Die Dauer des Östrus variiert stark und kann zwischen drei und 21 Tage anhalten (Concannon, 2011). In diesem Stadium haben Rüden maximales Interesse an der Hündin. Dies zeigt sich durch vermehrtes Beschnüffeln und Belecken der Anogenitalregion der Hündin, sowie Aufsprungsversuche. Die Hündin bewegt die Rute aktiv zur Seite, um die Vulva zu präsentieren (Moxon et al., 2012; Root Kustritz, 2012a). Während der Begattung bleibt die Hündin stehen und duldet die Intromission (Moxon et al., 2012). In Züchterkreisen wird dieses Verhalten auch als „Standhitze“ bezeichnet.

Ab Beginn der Lutealphase ändert sich das Verhalten wieder rapide, die Hündin verliert das Interesse am Rüden und duldet keine Begattungsversuche mehr (Butinar et al., 2004). Des Weiteren kann eine östrogeninduzierte Ödematisierung der Vulva während des Proöstrus festgestellt werden, die im späten Proöstrus ihr Maximum erreicht (Root Kustritz, 2012a). Mit sich verringernder Östrogensekretion ab der Ovulation wird auch die Vulva wieder weicher und kleiner (Butinar et al., 2004; Goodman, 2001).

Auch das Auftreten und die Farbe des Vaginalsekrets während der Läufigkeit kann Aufschluss über das Zyklusstadium geben. Aufgrund der durch die hohen Östrogenkonzentrationen ausgelöste Diapedese erscheint der Vaginalausfluss während des Proöstrus blutig (Davidson, 2006; Root Kustritz, 2012a). Im Östrus verringert sich die Menge des Sekrets und Farbe wird weniger intensiv (Butinar et al., 2004; Root Kustritz, 2012a). In der frühen Lutealphase kann wie bereits beschrieben muköses Vaginalsekret austreten (Root Kustritz, 2012a).

2.5.4.3 Ultraschall der Ovarien

Anhand der ultrasonographischen Darstellung von Follikeln, der Abnahme der Anzahl der Follikel und der Bildung von Gelbkörpern kann der Ovulationszeitpunkt bei der Hündin bestimmt werden. Follikuläre Flüssigkeit lässt sich zudem infolge der Ovulation in der Bursa ovarica als hypoechogener Bereich im Ultraschall darstellen (Romagnoli, 2014). Auch die Darstellung des ovariellen Blutflusses per Color Dopplersonografie ermöglicht es, den LH-Peak zeitlich einzuordnen (Bergeron et al., 2013). Auch wenn in einigen Praxen und Kliniken die Ultraschalluntersuchung im Rahmen der Deckzeitpunktbestimmung routinemäßig erfolgt (Arlt, 2018), geben einige Autor*innen zu bedenken, dass das Auffinden der Ovarien mittels Ultraschall schwierig sein kann, ein sehr gutes Ultraschallgerät erfordert und teils auch nur bei kooperativen und ruhigen Hündinnen gelingt (Bergeron et al., 2013). Neben der Läufigkeitsbestimmung kann der Ultraschall auch zur Identifikation von Zysten, Tumoren und anderen Pathologien im Genitaltrakt genutzt werden (Barstow et al., 2018).

2.5.4.4 Glucosemessung im vaginalen Sekret

Diese Technik basiert auf Änderungen in der Zusammensetzung des Vaginalsekrets, an welcher möglicherweise auch die Antagonisierung von Insulin während des Progesteronanstiegs beteiligt ist (Goodman, 2001). Da die Messergebnisse vielen weiteren Einflussfaktoren unterliegen und als ungenau eingeschätzt werden, ist dieses Verfahren nicht zur Bestimmung des Ovulationstermins zu empfehlen (England & Concannon, 2002; Goodman, 2001).

2.5.4.5 *Elektrische Leitfähigkeit des Vaginalsechleims*

Die Technik basiert darauf, dass der elektrische Widerstand des Vaginalsekrets mit dem Anstieg der Östrogenkonzentration im Blut korreliert (Goodman, 2001). Kommerziell erhältliche, frei verkäufliche Geräte sind verfügbar und werden von einigen Züchter*innen genutzt (beispielsweise Draminski Ovulations Detector, Szabruk, Polen). Zwischen Proöstrus und Östrus ließen sich in einer prospektiven Studie allerdings keine signifikanten Unterschiede der Leitfähigkeit darstellen (Gurler et al., 2018). Dennoch besteht die Hoffnung, dass mittels der Leitfähigkeitsmessung eine Methode zur Verfügung stehen würde, die umgehend Ergebnisse liefert. Im Rahmen einer Studie wurde diese Methode für die Bestimmung der fertilen Phase bei Füchsen angewendet, wobei die Ergebnisse jedoch nicht mit Ergebnissen anderer Untersuchungsverfahren verglichen wurden (Yatu et al., 2018). Da es sich bei dem maximalen Widerstand eher um ein Plateau als um einen Spitzenwert handelt, ist eine genaue Bestimmung des Ovulationszeitpunktes mit dieser Technik nach einigen Autoren kaum möglich (Goodman, 2001) bzw. zu wenig wissenschaftlich untersucht (England & Concannon, 2002).

3 Eigene Untersuchungen

In folgendem Projektansatz sollte untersucht werden, ob eine IT gestützte automatisierte Erkennung der unterschiedlichen Vaginalzellen möglich ist und inwieweit diese mit Untersuchungsergebnissen der herkömmlichen Auswertung mittels Mikroskops vergleichbar ist. Für die Entwicklung des Algorithmus sollten gemäß gängiger Praxis für derartige Projekte mindestens 2500 Zellen je Zelltyp annotiert werden. Ähnliche Anzahlen an Daten wurden in vergleichbaren Projekten genutzt (Burti et al., 2020). Die Vaginalzellen wurden basierend auf den selbst etablierten Definitionen von (Reckers et al., 2022) annotiert. Insgesamt wurden durch den Autor 10.061 Vaginalzellen (2507 Parabasalzellen, 2509 Intermediärzellen, 2521 Superfizialzellen und 2524 kernlose Superfizialzellen/ Schollen), 2521 Erythrozyten und 2520 neutrophile Granulozyten von 54 Abstrichen evaluiert und annotiert (Abbildung 12). Die Abstriche wurden Hündinnen entnommen, die an der FU Berlin zur gynäkologischen Routineuntersuchung vorstellig wurden. Rasse- und Altersangaben der Hündinnen können dem Paper (Reckers et al., 2022) entnommen werden. Es wurden nur Zellen aufgenommen, die eine klare Struktur und keine Beschädigungen aufwiesen.

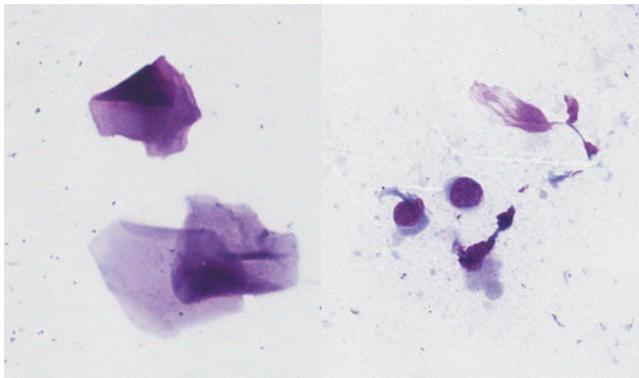


Abbildung 12: Zellen, die aufgrund von Falten oder Beschädigungen nicht genutzt wurden

Da, vor allem in den zellreichen Stadien (später Proöstrus, Östrus), Vaginalzellen oft in „Zellhaufen“ aufzufinden sind, wurden auch sich überlagernde Zellen mit in die Annotation aufgenommen.

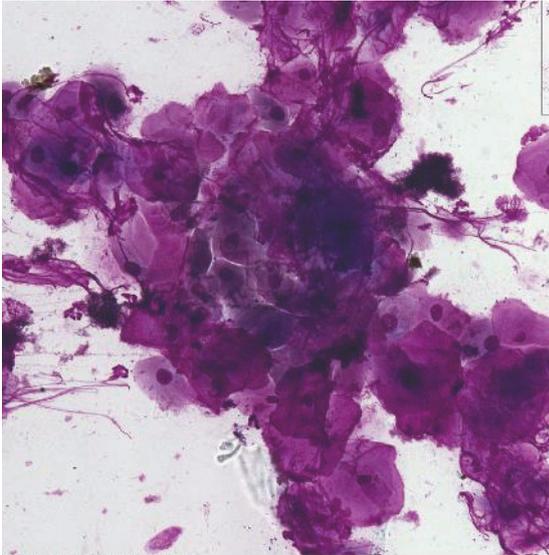


Abbildung 13: ein typischer Zellhaufen mit nicht abgrenzbaren Zellen

Es kann angenommen werden, dass sich auf jedem Ausstrich für vaginalzytologische Untersuchungen eine hohe Zahl an für die Zyklusbestimmung irrelevanten Strukturen befinden. Dazu gehören potenziell Färberückstände, Detritus, Pflanzenpollen, Staubpartikel, Luftblasen, Bakterien, Zellverklumpungen, Sekretrückstände und andere. Aufgrund der großen Vielfalt in der Form, Farbe und Erscheinung mussten diese Strukturen auch annotiert werden, um den CTSA eine möglichst präzise Zuordnung zu ermöglichen. Insgesamt wurde eine Fläche von circa 15,27 Millionen μm^2 an irrelevanten Strukturen annotiert. Da die Strukturen sich erheblich in ihrer Größe unterscheiden, wurde sich nicht an der Anzahl der annotierten Zellen, sondern an der Fläche orientiert. Somit stehen den CTSA in etwa dieselbe markierte Fläche an irrelevanten Strukturen und annotierten Zellen zur Verfügung. Alle Strukturen wurden mithilfe des Programms QuPath® (Queen's University Belfast, Belfast, Nordirland/UK) annotiert. Dafür wurden die Annotationswerkzeuge „Wand Tool“ und „Brush Tool“ genutzt. Diese erlauben eine schnelle und exakte Abgrenzung. Der zu bestimmende Bildausschnitt wurde auf das 100 bis 200-fache vergrößert. Mithilfe des Maus Cursors und der oben genannten Annotationswerkzeuge konnten Zellgrenzen genau markiert werden. Fehlerhafte Markierungen konnten mit dem „Brush Tool“ korrigiert werden. Die so markierten Strukturen wurden anschließend einer jeweiligen Kategorie zugeordnet: Parabasal cell, Intermediate cell, Superficial cell, Squamous cell, Neutrophils, Erythrocytes und irrelevant structures.

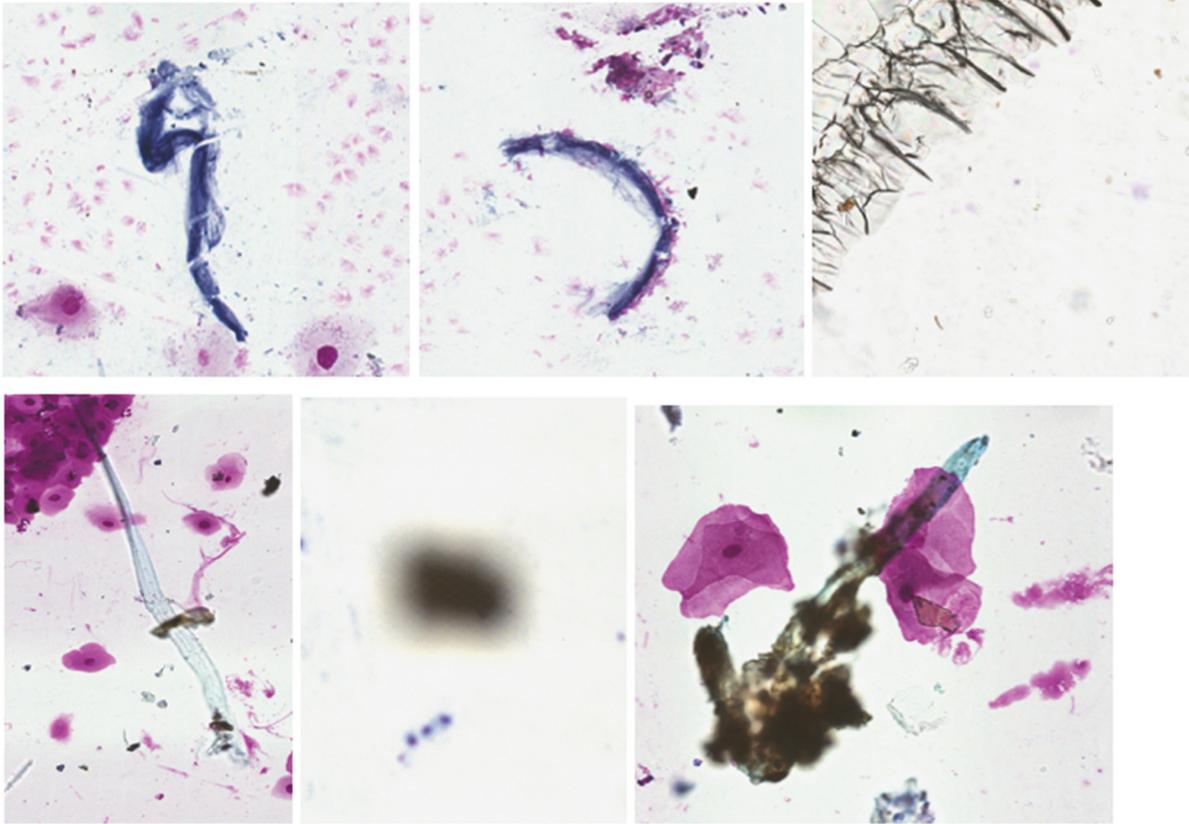


Abbildung 14: Beispiele für irrelevanten Strukturen auf dem Objektträger

3.1 Scientific Paper

Veröffentlicht am 24.03.2022 bei Frontiers Veterinary Science

Reckers F, Klopffleisch R, Belik V and Arlt S (2022) Canine Vaginal Cytology: *A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells*. Front. Vet. Sci. 9:834031.

DOI: [10.3389/fvets.2022.834031](https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834031)

Copyright © 2022 Reckers, Klopffleisch, Belik and Arlt. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Canine Vaginal Cytology: a revised definition of exfoliated vaginal cells

Felix Reckers¹, Robert Klopffleisch², Vitaly Belik³, Sebastian Arlt⁴

¹ Clinic for Animal Reproduction, Freie Universität Berlin;
Germany, felix.reckers@fu-berlin.de

² Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin;
Germany, Robert.klopffleisch@fu-berlin.de

³ Veterinary Epidemiology and Biometry, Freie Universität Berlin;
Germany, vitaly.belik@fu-berlin.de

⁴ Clinic for Animal Reproduction, Freie Universität Berlin;
Germany, sebastian.arlt@fu-berlin.de

*** Correspondence:**

Corresponding Author: Sebastian Arlt
sebastian.arlt@fu-berlin.de

Keywords: exfoliative vaginal cytology, vaginal smear, estrous cycle, vaginal cell tutorial, digital microscopy, bitch

Abstract

Vaginal cytology is an important examination method in the context of gynaecological disorders and cycle staging in the bitch. While collection and preparation of samples are easy, the evaluation appears to be challenging. Inconsistent definitions of cell attributes such as size, cornification and the appearance of the nucleus have been published.

The aim of the project was to develop a tutorial for vaginal cell determination. To get a deeper insight into the use of cytology in practice, an online survey was distributed to veterinarians interested in small animal reproduction. Participants were asked to define eight cells and answer questions. The agreement of the sixteen participants, working in eight different countries, determining the cells was poor ($\kappa = 0.412$). Eleven respondents stated that vaginal cytology has a low reliability. Nevertheless, thirteen participants use this tool regularly.

The tutorial was developed as a flowchart based on the survey results, scientific literature and own measurements. It guides the user systematically through the evaluation of specific cell characteristics. An evaluation of the results of five raters with difference experience levels led to a high agreement ($\kappa = 0.858$).

Vaginal cytology is a useful diagnostic tool, but it seems helpful to standardize the determination of cell types.

1. Introduction

Gynaecological examinations belong to the standard procedures in veterinary medicine. The findings are important in the context of breeding management (Moxon et al., 2010). Finding the day of ovulation during estrus is essential for an appropriate timing of mating or insemination and, thus, a high fertility (Romagnoli, 2017).

Symptoms such as acceptance of a male for mating (Johnston et al., 2001a), the sanguineous vulvar discharge (Johnston et al., 2001a), and the edema of the vulva (Bunck & Günzel- Apel, 2016) are signs of proestrus and estrus. The symptoms which can be observed via vaginoscopy are color, the intensity of edema and moisture of the vaginal mucous membrane (Bunck & Günzel- Apel, 2016; Wehrend, 2010).

Since some bitches do not show overt behavioral signs (Linde & Karlsson, 1984) it can be helpful to determine other stages of the estrous cycle, i. e. proestrus or diestrus. Also abnormal estrous cycle patterns, such as early or late ovulation, silent heats or split heats (Goodman, 2001) can be diagnosed.

External symptoms of proestrus are turgid vulvar swelling and sanguineous vulvar discharge (Root Kustritz, 2012a). The discharge contains a large number of erythrocytes due to diapedesis through the uterine capillaries due to estrogen effect (Sharma & Sharma, 2016). The erythrocytes can also be found in the vaginal smear (Olson et al., 1984). The diestrus is characterized by slight mucoid discharge which often contains a large number of neutrophils in early stage. The bitch will not allow mounting or breeding of male dogs anymore (Root Kustritz, 2012a).

Furthermore, vaginal cytology belongs to the standard gynecological examinations because it enables insights into potential estrogen influences and the health status of the vagina (Antonov, 2016). Sampling of cells, preparing and staining of a smear for vaginal cytology requires only few skills (Pérez et al., 2005) and can be performed rapidly and inexpensively in daily practice (Bouchard et al., 1991; Davidson, 2015).

However, the analysis and interpretation of the smears may be affected by several factors. Different sampling and staining procedures may bias evaluation results (Art, 2018). In addition, the skills of the observer, transition between the different cell stages as well as individual characteristics of the bitch, such as a massive occurrence of erythrocytes, may impede the evaluation of vaginal smears (Wehrend, 2010).

To the best of our knowledge, no uniform standardized definition of canine vaginal cell types has been published, yet. A closer look into the literature reveals that authors suggest different parameters and definitions of the type of cells, for example regarding the diameter of the different cell types (Table 1).

Author	Type of cell				
	Basal cell	Parabasal cell	Intermediate cell	Superficial cell	Squamous cell
(Johnston et al., 2001b)	Usually not exfoliated	10-20 μm	20-30 μm	30-75 μm	-
(Dreier, 2010)	10-20 μm	15- 25 μm	20-30 μm	35- 60 μm	Same size as superficial cells
(Wehrend, 2010)	10-20 μm , usually not exfoliated	10-20 μm	20-50 μm	No diameter measurable because of folds	-
(Bostedt, 2016)	10-15 μm	15-30 μm	25-30 μm	40-60 μm	Same size as superficial cells
(Antonov, 2016)	10-20 μm , usually not exfoliated	15-25 μm	20-30 μm	30-75 μm	-

Table 1: The table shows the diameter of the different cell types according to several authors

Besides the diameter, the presence and extent of cornification are important aspects for the determination of vaginal cells. The cornification refers to the degenerative process of cells in higher layers in stratified squamous epithelia (Johnston et al., 2001b). Different authors give different definitions of cell types based on the extent of cornification (Table 2). A majority of the authors agree that basal, parabasal and intermediate cells are not cornified at all (Johnston et al., 2001b; Kustritz, 2006).

Definition of the presence and extent of cornification					
Author	Basal cell	Parabasal cell	Intermediate cell	Superficial cell	Squamous cell
(Schutte, 1967)	-	not cornified	small intermediate cells: none large intermediate cells: not necessarily found	“not necessarily found”	“with a few exceptions always keratinized”
(Johnston et al., 2001b)	not cornified	not cornified	not cornified	cornified	cornified
(Pérez et al., 2005)	-	not cornified	not cornified	“partially cornified”	“fully cornified”
(Kustritz, 2006)	-	not cornified	not cornified	cornified	cornified
(Wehrend, 2010)	not cornified	not cornified	not cornified	“increasing cornification”	not specified
(Bostedt, 2016)	not cornified	not cornified	not cornified	“are subject to cornification”	“final stage of cornification”
(Antonov, 2016)	-	-	-	-	cornified

Table 2: Presence and extent of cornification of different types of vaginal cells according to different authors. “not cornified” means that this cell type does not show signs of cornification. “-” means that the author did not specify the appearance of cornification of this cell type. Descriptions in hyphens are quotes from the respective author.

Basal, parabasal and intermediate cells have a round unaltered nucleus (Antonov, 2016; Olson et al., 1982; Schutte, 1967). According to Johnston et al. (2001) the area of the nucleus of an intermediate cell is $> 90 \mu\text{m}^2$ (Johnston et al., 2001b). Other authors specify the diameter for the nucleus of an intermediate cell to be 7-11 μm (Christie et al., 1972), what corresponds to an area between approximately 38.5 μm^2 and 95.0 μm^2 . Most authors agree that the nucleus is large and clearly discernible (Schutte, 1967), prominent and appears normal (Johnston et al., 2001b). Superficial cells are described unanimously as cells having a pyknotic nucleus (Aydin et al., 2011; Christie et al., 1972; Pérez et al., 2005), which becomes eventually karyorrhectic (Bostedt, 2016) or karyolytic (Dreier, 2010).

For most authors, the shape of the vaginal cells is an important aspect (Christie et al., 1972; Dore, 1978; Post, 1985). However, other authors state that intermediate and superficial cells can be confused if they are defined by their shape, only (Johnston et al., 2001b; Wehrend, 2010).

The definition of squamous cells is also not explicitly clear. While some authors state that the nucleus is not visible (Dore, 1978; Kustritz, 2006; Schutte, 1967), others observed that these cells are anucleated but often remainings of the disintegrated nucleus are still visible (Bostedt, 2016). Based on these heterogeneous definitions, it is likely that different evaluators come to

different conclusions when interpreting vaginal smears (Moxon et al., 2010). This has also been shown by Artl et al. (2018).

An often-used method for the determination of the cycle stage is the determination of specific percentages of cell types. Some authors claim that a typical vaginal smear in estrus has 100% superficial cells and > 80% cells with pyknotic or absent nuclei (Antonov, 2016; Bergeron et al., 2014). Another definition of estrus is the presence of more than 90% superficial keratinized epithelial cells (Bouchard et al., 1991). Others define the cytological estrus by 100% cornification with more than 50% anuclear squames (Kustritz, 2006).

For the determination of diestrus based on specific percentages of exfoliated vaginal cells, the definitions by different authors show a high agreement. The onset of diestrus occurs when the number of superficial and squamous cells has decreased by at least 20% (Antonov, 2016; Bouchard et al., 1991; Olson et al., 1984) and when a higher number of neutrophil granulocytes are present (Aydin et al., 2011; Post, 1985).

The heterogenous definitions of cell types and percentages of cells characteristic for specific cycle stages by different authors may impair cycle stage diagnoses and lead to a suboptimal agreement between different evaluators.

Aim of this study was to learn more about how small animal reproduction experts define vaginal cells. In a second step, we wanted to develop more robust definitions of vaginal cells and evaluate a cell determination tutorial.

2. Material and methods

2.1 Preparation and digitalization of vaginal cell slides

In total, 52 vaginal smears were taken from 39 bitches for which health of the genital tract was confirmed. All bitches were presented for gynaecological examination in the context of ovulation timing or routine gynaecological health check. Bitches were aged between 1 and 14 years (median 5 years, interquartile range 3 and 6 years) and belonged to the breeds Siberian Husky, Continental Bulldog, Great Dane, Rottweiler, Golden Retriever, Afghan Hound, Dobermann (n=2), Miniature Schnauzer (n=3), Pomskey, Manchester Terrier (=2), French Bulldog (n=2), Dachshund, Smooth Collie, Cross Breed (=5), Swiss Cattle Dog, Miniature Bullterrier, Pug (n=2), Labrador (n=3), Cairn Terrier, Kangal Shepherd Dog, Bernese Mountain Dog, Border Collie, Shiba Inu, German Shepherd, Leonberger, Monkey Terrier, and Berger Picard. The weight of the dogs ranged between 5 to 56 kg (median 20 kg, interquartile range 10 and 30.25 kg). All smears used for this project were leftovers from clinical examinations.

All specimens were taken via an inserted sterile speculum (Proctovision, Karl Storz SE & CO. KG, Tuttlingen, Germany) as described by (Antonov, 2016). The samples were collected by using a saline moistened, sterile cotton swab (Pérez et al., 2005). The cotton swab (Medical applicator, Heinz Herenz Medizinbedarf GmbH, Hamburg, Germany) was introduced through

the speculum (Wehrend, 2010) to collect cells from the caudodorsal surface of the vagina (Aydin et al., 2011).

After swabbing by gently rolling the dorsal vaginal wall, the swab was removed and rolled onto a glass slide (Objektträger ELKA, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Germany) (Davidson, 2015). Routine Diff-Quick staining (Haema-Schnellfärbung, LT- Sys Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Germany) was performed after air drying (Davidson, 2015). A coverslip (Deckgläser 32*22mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Germany) was permanently fixed (Roti Histokitt II, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) to the specimen (Johnston et al., 2001b). Bitches in different stages of the estrous cycle were chosen, so that all types of vaginal cells were represented.

For digitization the stained slides were scanned with Aperio CS2 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Germany). The data were converted into Aperio Scan Scope Virtual Slide (svs) files and analysed using the software program QuPath®. QuPath® is an open-source software platform for whole slide image analysis (Bankhead et al., 2017).

The program is able to show the slides in more than 400x magnification and allows measurements of the area and diameter of nuclei or whole cells. It can also be used to label specific cells.

2.2 Structure of the survey

To reach veterinarians who are specialized in small animal reproduction the international Email list "Café Reprod" with around 150 members (personal information from the list administrator, spring 2021) worldwide was used for the distribution of the survey. No reminder was sent. The survey was open for three weeks.

The survey consisted of three parts: In the first part, eight pictures of different vaginal cells were illustrated. Participants were asked to define cells as basal cell, parabasal cell, intermediate cell, superficial cell and squamous cell by ticking a box (see Figure 1).

In the second part, the participants were asked to answer the following questions by typing a short free text: How do you differentiate a parabasal cell from an intermediate cell? How do you differentiate an intermediate cell from a superficial cell? How do you differentiate a superficial cell from a squame?

Finally, questions about the practical work with vaginal cytology and about some personal information were asked.

2.3 Development and validation of a tutorial for vaginal cell determination

The information from the survey results and from scientific literature were analyzed. Based on this information and the digitized smears, definitions including specific parameters such as cell size and shape as well as nucleus size and shape were revised and evaluated for all vaginal epithelial cell types.

The tutorial was designed as a flowchart which aims to support determination of canine vaginal cells. For a first validation, five vaginal smears were used. The slides were chosen by the authors in order to ensure that all epithelial cell types were present.

On each slide, the first author assigned the numbers one to 100 to 100 cells by using QuPath®. Inclusion criteria for the selection of the cells were a clear and well visible structure of the cell. Cells which overlapped with other cells or structures were excluded. With the help of a random number generator (<https://www.zufallsgenerator.net>) 20 cells per slide were selected for the validation. This resulted in 100 cells in total.

All 100 cells were evaluated independently by five persons using the same computer and the same supporting material. No further information e.g. about the dog or stage of sexual cycle were given. The respondents were selected in order to represent raters with different levels of experience. Therefore, the raters were two students of veterinary medicine in their 5th year, two veterinarians working in the field of small animal reproduction for 12 and 24 months, respectively, and one diplomate (ECAR) for small animal reproduction.

The first author supervised the process, did not take part in the evaluation and did not influence the evaluation. All evaluators received a list with the numbers of the cells to determine, a colored Din A4 version of the tutorial (Figure 1) and a form with a table in which they were asked to document the cell type according to the slide number and cell number.

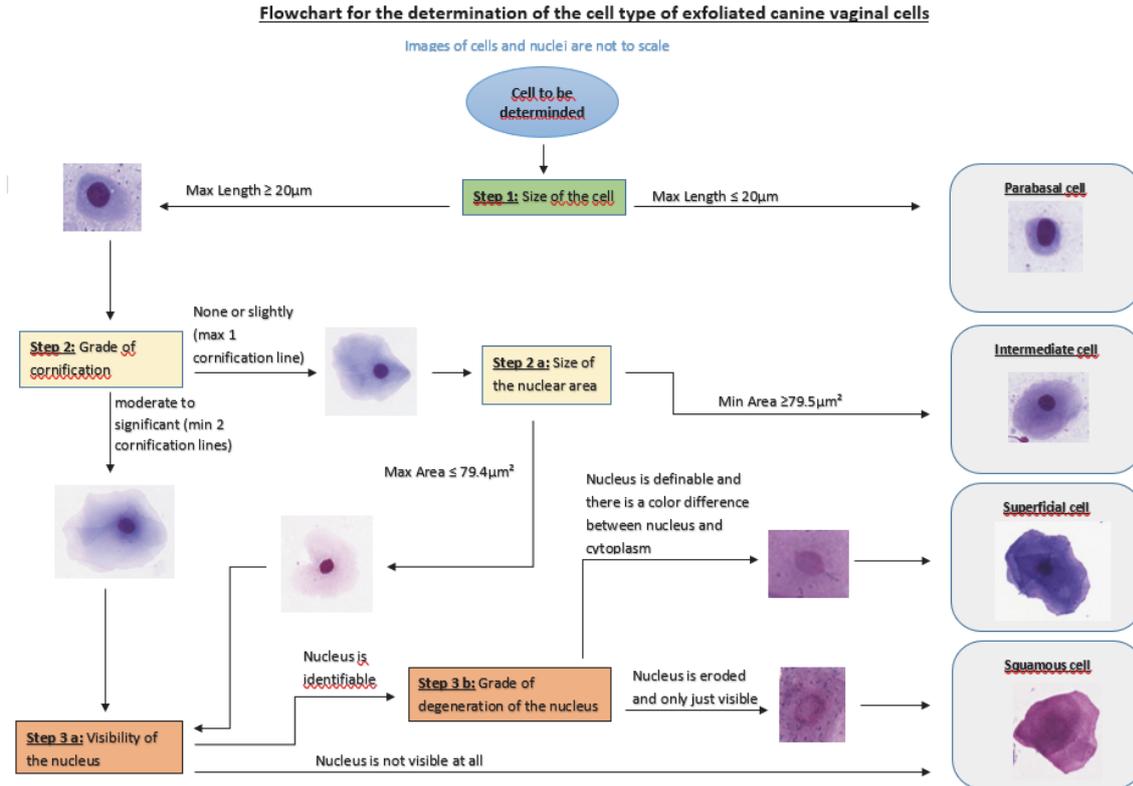


Figure 1: The tutorial for the determination of canine vaginal cells

2.4 Statistical analysis

Fleiss' Kappa was used, which measures the inter-rater reliability between more than two raters. For the calculation of Fleiss' Kappa in this project, R programming language was used. (<https://www.r-project.org/>).

If n_{ij} is the number of raters who assigned the i -th subject ($i = 1, \dots, N$) to the j -th category ($j = 1, \dots, k$), then Fleiss' kappa is defined as

$$\kappa = \frac{\bar{P} - \bar{P}_e}{1 - \bar{P}_e}$$

Where $\bar{P} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N P_i$, $P_i = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{j=1}^k n_{ij}(n_{ij} - 1)$, $\bar{P}_e = \sum_{j=1}^k p_j^2$, $p_j = \frac{1}{Nn} \sum_{i=1}^N n_{ij}$.

3. Results

3.1 The results of the survey

In total, 16 respondents completed and returned the survey. The definition of the eight presented cells by the respondents are presented in Figure 2.

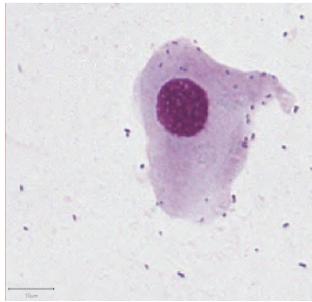
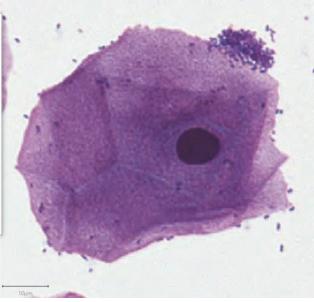
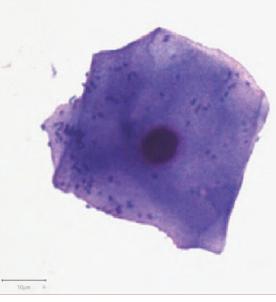
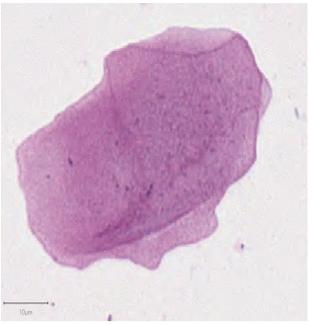
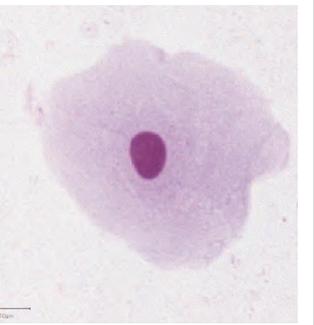
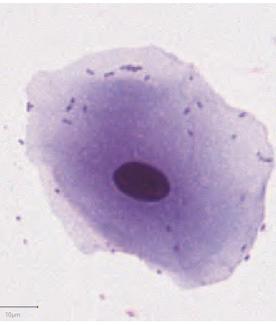
Image	 <p>1</p>	 <p>2</p>	 <p>3</p>	 <p>4</p>
Definition	Basal cell: 1 Parabasal cell: 6 Intermediate cell: 9 Superficial cell: 0 Squamous cell: 0	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 1 Superficial cell: 11 Squamous cell: 3 No information: 1	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 0 Superficial cell: 14 Squamous cell: 2	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 0 Superficial cell: 13 Squamous cell: 3
Image	 <p>5</p>	 <p>6</p>	 <p>7</p>	 <p>8</p>
Definition	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 0 Superficial cell: 1 Squamous cell: 15	Basal cell: 3 Parabasal cell: 4 Intermediate cell: 9 Superficial cell: 0 Squamous cell: 0	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 8 Superficial cell: 8 Squamous cell: 0	Basal cell: 0 Parabasal cell: 0 Intermediate cell: 7 Superficial cell: 9 Squamous cell: 0

Figure 2: Results of the determination of eight canine vaginal cells by 16 veterinarians.

Cell number one was defined as intermediate cell by nine respondents or as parabasal (n=6) or basal cell (n=1). Cells number two, three and four were identified by the most respondents as superficial cells. Cell number five had the highest accordance: all but one respondent defined it as a squamous cell. The definition of cell number six gave a more ambiguous result: nine respondents defined it as intermediate cell but seven were of the opinion that it is a parabasal or basal cell. Both, cells number seven and eight, were defined as intermediate cell

by around half of the participants and as superficial cell by the other half. The calculated Fleiss' Kappa for the accordance of all 16 raters was $\kappa = 0.412$.

In the second part, the respondents were asked how they discriminate between cell types. For each of the three scenarios the participants named at least two parameters.

The first question was how they differentiate a parabasal cell from an intermediate cell. The most named parameters were size (n=10) and shape (n=10) of the cells. Nine respondents mentioned the ratio between the nucleus and the cytoplasm. The appearance of the nucleus (size and shape) was named by seven and cornification by one respondent.

The second question was how to differentiate an intermediate cell from a superficial cell. Shape (n=11) and appearance of the nucleus (n=11) were the main parameters for differentiation of the cells, followed by the size of the cell (n=7). Parameters of minor importance seem to be the cytoplasm: nucleus ratio (n=5), the cornification (n=3) and the color of the cell (n=2).

Finally, the participants were asked how they differentiate a superficial cell from a squamous cell. Mostly named parameters were the presence and appearance of the nucleus (n=11). The shape (n=3), the grade of cornification (n=2) and the size (n=1) had only a minor influence for the differentiation of superficial and squamous cells.

Some of the participants stated there was no difference between the two cell types (n=3).

The third part of the survey referred to the practical work and experience of the participants. The number of bitches the participants stated to see in the context of ovulation timing per year is median 125 (interquartile range 50 – 300).

The majority of the respondents indicated that they perform vaginal cytology in the context of ovulation timing (n=13). Several respondents stated, however, that vaginal cytology is "Not reliable at all" (n=5) or "Not reliable" (n=6) in the context of ovulation timing. The minority chose the answer "Moderate" (n=3) or the answer "Reliable" (n=2).

All participants agreed that progesterone measurement for ovulation timing is "Very reliable" (n=8) or "Reliable" (n=8). The respondents use immuno assays for progesterone measurement: Immulite® (n=8), Minividas® (n=3), TOSOH® (n=1), Hormonost® ELISA kit (n=3). In one case no answer was given.

Finally, the respondents were asked about their experience and person. The participants have worked as veterinarian for 24.1 (\pm 10.2) years in mean. One respondent did not specify the years in practice but wrote that she or he has practiced "too long".

Asked for the highest degree they have achieved, the participants chose "Veterinarian" (n=7), "Diplomate" (n=6), "PhD" (n=2) or "Specialist of reproduction" (n=1). They work in the USA (n=7), Sweden (n=2), Germany (n=1), Hungary (n=1), Thailand (n=1), Belgium (n=1), Portugal (n=1) and Australia (n=1). One participant stated to work "worldwide".

3.2. The structure of the tutorial

The tutorial (Figure 1) was developed as a flowchart which enables following flowlines and assessing cell aspects step by step. The aim was to guide the user through the evaluation of relevant cell parameters. To support the decision process, sample images were included. These images were derived from the digitalized slides.

The tutorial for the evaluation of a vaginal cell starts with the determination of the cell diameter. According to several authors, the maximum diameter of a parabasal cell is 20 μm . To validate this definition, vaginal smears from 10 bitches in anestrus or early proestrus were used. On each specimen 20 cells with a diameter smaller than 20 μm were measured and analyzed with QuPath®. This resulted in 200 cells in total. Not one cell showed cornification or changes in the appearance of the nucleus. Hence, the given definition is suitable and was, therefore, included into the tutorial.

If the cell diameter exceeds 20.0 μm the user follows the flowline to the decision box “Step 2: Grade of cornification”.

At step 2, the user can decide between the flowlines “none or slightly” and “moderate to significant”. These flowlines lead to decision box “Step 2.a.: Size of the nuclear area” or decision box “Step 3.a.: Visibility of the nucleus”, respectively. To standardize this decision about the grade of cornification, all cells with no or only one cornification line should be determined as cells with no or slight cornification (Figure 3).

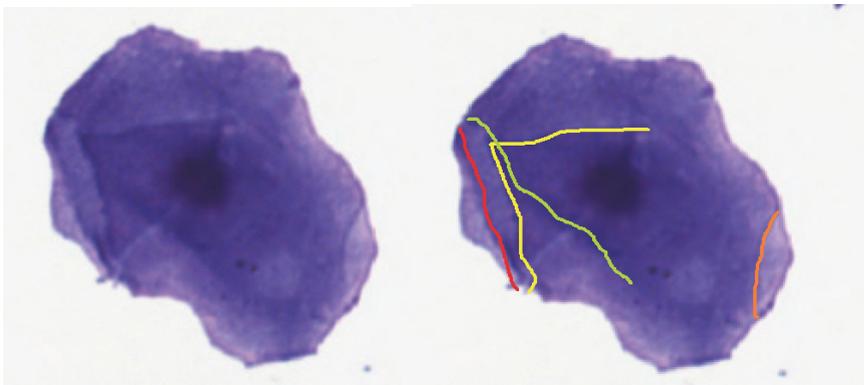


Figure 3: Cornification lines of a vaginal epithelial cell

The decision box 2.a. refers to the size of the nucleus. According to the above-named authors the area of the nucleus of an intermediate cell is large, round and unaltered. The nucleus of superficial cells becomes **smaller**. Our aim was to define an area which allows a suitable differentiation of intermediate from superficial cells in at least 95% of cases. To define a precise threshold, vaginal smears from ten bitches in late proestrus or estrus were selected. On each specimen, the nuclei of 20 cells with at least two cornification lines and a definable and demarcated nucleus = defined as superficial cells (see Figure 2) were measured and analyzed. This resulted in 200 nuclei in total. The measurements revealed a mean value of 57.7 μm^2 ($\pm 13.8 \mu\text{m}^2$) for the area of the measured nuclei. The results of the nucleus area measurements are shown in Figure 4. The majority (95%) of nuclei of cornified vaginal cells is smaller than

79.5 μm^2 . Therefore, the value of 79.4 μm^2 was selected as threshold for the maximum area of the nucleus of a superficial cell. Thus, if the area of the nucleus is 79.5 μm^2 or larger the cell is classified as intermediate cell. If the nucleus has an area of 79.4 μm^2 or smaller the user should follow the flowline to decision box 3.a. and the cell is excluded from being an intermediate cell.

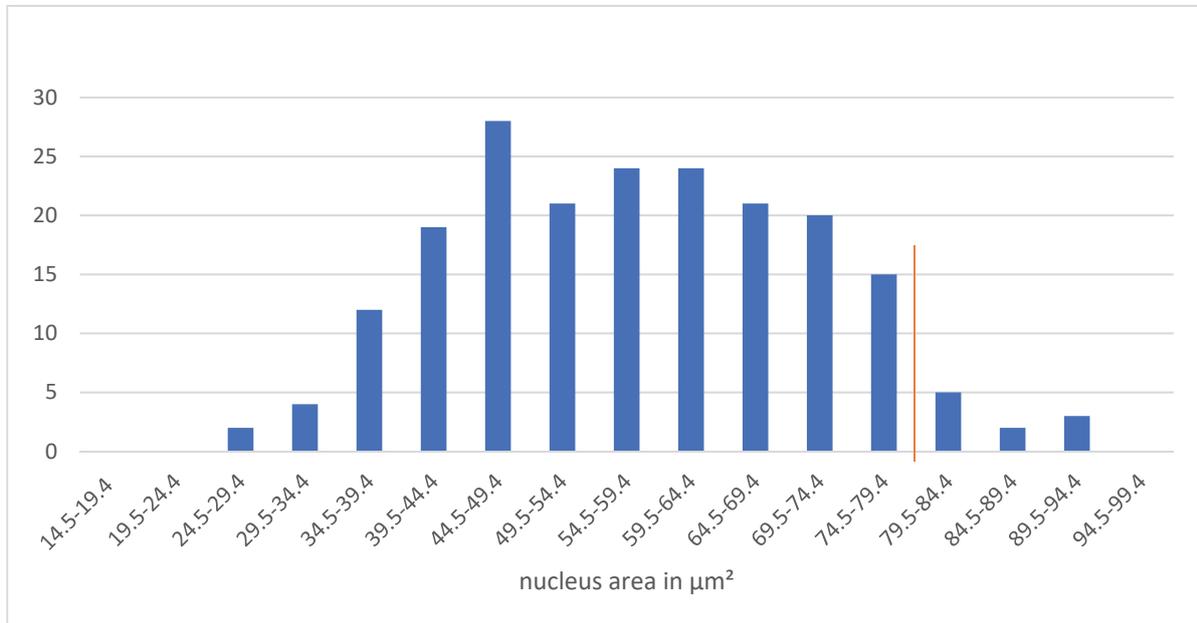


Figure 4: The diagram shows the area of the measured nuclei of cornified vaginal cells in μm^2 and the frequency of measurements. The red line marks the 95 percentile

Decision box 3.a. refers to the visibility of the nucleus. If the cell has no visible nucleus, the cell is classified as a squamous cell. If the nucleus is still identifiable, the flowline leads to decision box 3.b. In this case, the grade of degeneration of the nucleus has to be determined. If “the nucleus is definable, demarcated and there is a color difference between nucleus and cytoplasm” the cell it is classified as a superficial cell.

Otherwise, if “nucleus is eroded and only just visible” the cell is classified as a squamous cell.

The independent evaluation of 100 randomly selected vaginal cells by five persons using the tutorial led to a Fleiss’ Kappa of $\kappa = 0.858$.

4. Discussion

Vaginal cytology in dogs and its usefulness and limitations have been controversially discussed recently (Arlt, 2018). On the one hand, this diagnostic method has been described as a valuable clinical tool in the context of gynaecological examinations (Pérez et al., 2005) but on the other hand, usability of this method may be low for detection of the ideal time for mating or insemination(Johnston et al., 2001b; Wehrend, 2010). Other authors state the

vaginal cytology allows ovulation timing only retrospectively (Bergeron et al., 2014; Bouchard et al., 1991). In regard to these different opinions, it seems worthwhile to critically assess this alleged proved and tested method as suggested for many well-proven procedures by Fontbonne (Fontbonne, 2020).

Several factors may impede the reliability of vaginal cytology, which include individual cellular characteristics of the bitch such as a variable percentage of anuclear cells at the time of ovulation (Moxon et al., 2012) or an influx of other cells like neutrophils (Moxon et al., 2010) or erythrocytes (Wehrend, 2010).

In addition, different methods of taking and staining the smears, as well as no standardized evaluation methods may lead to variability in the interpretation (Arlt, 2018; Bergeron et al., 2014). Some authors recommend sampling from the vaginal vestibulum. Advantages of this procedure may include the reduced risk of contamination of the vagina or trauma as well as less defense reactions of sensible bitches if the swabs are not inserted into the more cranial parts of the vagina (Schutte, 1967). Other authors do not recommend taking the specimen from the vaginal vestibulum because its cells do not react as quickly to an increase in the blood estrogen concentration as the vaginal mucous membrane (Antonov, 2016) and are, therefore, not as indicative of the stage of the estrous cycle (Goodman, 2001). Whether the use of a speculum improves the reliability of vaginal cytology and which staining method leads to the most robust evaluation results, has yet to be clarified (Arlt, 2018). Also, the staining of the cells with different stains need to be discussed. Diff Quick is a rapid, modified Wright- Giemsa stain that is easy to use in a clinical setting (Johnston et al., 2001b) and widely used for vaginal smears(Arlt, 2018). Therefore, this stain was used for this project. Other stains such as Papanicolaou or Shorr (modified Papanicolaou) are able to detect eosinophilic cells by staining them orange- red(Bunck & Günzel- Apel, 2016). This simplifies the identification of superficial cells(Bunck & Günzel- Apel, 2016). These stains, however, are not widely used in practice because of the high costs and time requirements (Arlt, 2018). If the results of our project would have been different with other staining remains open.

Furthermore, it seems that an important reason for the low reliability is the above-named ambiguity of definitions of different authors for vaginal cells. Arlt (2018) has showed highly variable results of vaginal smear assessment probably caused by subjective evaluation.

For preparation of new cell definitions, scientific literature and experts' opinions were analyzed which revealed interesting insights into the perils and pitfalls of vaginal cytology. The Café Reprod E-mail list was chosen for the distribution of the survey to reach participants with a high level of experience in small animal reproduction. Indeed, 16 respondents cannot be regarded as representative. Nevertheless, according to their statements, most were quite experienced veterinarians in the field of small animal reproduction. It can be assumed that a selection bias needs to be considered, namely that people more interested in vaginal cytology were probably more likely to participate in the survey. In that regard, the results of the survey are even more surprising. The agreement of the raters regarding the definition of the vaginal cells was around $\kappa = 0.4$. This means poor agreement. A value of 0.0 indicates an agreement

not better than chance, values lower than 0.40 indicate poor agreement, higher than 0.75 good agreement and 1.0 perfect agreement (Automotive Industry Action Group (AIAG), 2010).

The participants stated that cell determination has a low and progesterone measurement has a high reliability in the context of ovulation timing. Nevertheless, still 13 out of 16 routinely perform vaginal cytology. Arlt (2018) found similar results in a similar survey. When using both methods, veterinarians may rely more on the progesterone measurement than on vaginal cytology because it is easier and quicker to interpret. The effort on evaluating and interpreting vaginal smears and, therefore, the experience and routine to do so may have decreased among practitioners. This, in turn, may be a reason why the determination of exfoliated vaginal cells is considered to be unreliable.

The question arose if more experienced raters may have a lower variation. Therefore, only raters who stated to examine more than 100 bitches per year were included in a subgroup evaluation. This led to a Fleiss' Kappa of $\kappa = 0.533$, meaning moderate agreement. This analysis suggests that variations between the raters may decline with growing experience.

Nevertheless, it is to mention that the raters did not evaluate the stage of estrous cycle based on a whole smear in this project. They were asked to name single vaginal cells.

It seems that some types of cells are easier to determine than other cells. Angular, cornified cells with a definable nucleus or no visible nucleus are better assignable for the raters, almost regardless of the level of experience. However, cells with an oval to polygonal shape, a vesicular and big nucleus and without or little cornification seem to be difficult to define, even for experts.

A possible explanation for this result could be that the evaluation based on cornification and a disappearing or pyknotic nucleus is easier to recognize than the evaluation based on the size of a cell and nucleus since there is a scale necessary. In addition, the determination of cells as basal cell by various respondents, independent of their level of experience, seem noteworthy because of their questionable occurrence in a vaginal smear. The characterization of basal cells seems obsolete according to several authors since these cells build the lowest layer of the mucosal membrane (Johnston et al., 2001b; Olson et al., 1984; Wehrend, 2010) and usually cannot be collected with a swab without harming the vaginal epithelium. Therefore, this type of cell is not included in this project.

To improve the reliability of vaginal cytology, standard operating procedures for the interpretation of vaginal smears may be helpful (Arlt, 2018). In 1967, Schutte published a classification of vaginal cells. He assigned the cells to groups A to D (Schutte, 1967). Limitation of this classification include the widespread thresholds for the nuclear diameter. For example, Schutte stated that the diameter of a large intermediate cell ranges from 7 to 11 μm and that the diameter of a superficial cell is smaller than 6 μm . A definition of cells with a nuclear diameter between 6.0 μm and 6.9 μm was not given. In addition, some definitions such as "small intermediate cell have a relatively large nucleus" were not precise. Noteworthy is, however, that the classification of Schutte has been published 55 years ago and he had not the same technical possibilities for scanning and measuring vaginal cells as we have today. In

this project, opinions and experiences of different authors and experts as well as measurements made with the program QuPath® were combined. The tutorial aims to support evaluators analyzing and defining vaginal cells. The evaluation of the tutorial with experienced and unexperienced raters led to a high inter observer agreement. The Fleiss-Kappa $\kappa = 0.858$ can be interpreted as good agreement. A limitation of this project is that only five raters tested the tutorial so far. Since two students used the tutorial with good results, it can be postulated that the tutorial is user-friendly and supports determination of the cells also for non-experts.

A debatable point is that the cells in the evaluation were not determined by raters beforehand without the tutorial. However, one can assume that a certain training effect would have biased a control examination, especially if the tutorial would have been offered before a non-tutorial evaluation.

Another limitation of this project is the applicability and practicality of the tutorial in daily practice which needs to be tested in future studies. The effort of measurements of cells under the microscope has been described as time-consuming and unsuitable (Christie et al., 1972). This also applies for the process of digitalization. The measurement of the size of cells or nuclei can be difficult and time consuming. Nevertheless, the regular use of the tutorial may lead into a certain training effect, which was also observed during the evaluations during this project.

If the tutorial is useful in the context of ovulation timing needs to be further assessed in future studies. In the context of this project, the focus was set on the definition of cells. The cell patterns in relation to ovulation or in the context of specific gynaecological disorders was not assessed. To limit a breed-related bias the authors strived a preferably wide diversity of breeds (n=27).

To date, the scan process of a slide for this project lasted about 20 minutes. The file size of the data of one scanned smear was two to three Gigabytes. The quality of the scan highly depends on the quality of the smear. Especially specimens from bitches in anestrus or early proestrus often include only few, small cells compared with specimens from bitches in estrus and early diestrus. In consequence, the scanner has less areas to focus on and less sharp digital scans can be the result. Other variables, such as inconsistent staining and low color contrast, folded cells, air bubbles and particles may also lead to scans of low quality. While human evaluators can compensate these limitations to a certain extent by “reading through” them (Zuraw et al., 2021), an automated slide evaluation might not lead to appropriate results. Therefore, accurate collection of cells and preparation of slides, including the proper application of cell material, correct fixation of the cover slips, wiping the slides before scanning, are important requirements for a successful scanning process result (Mori, 2017).

Thus, to date the scanning and measurement procedures presented are not usable in daily practice. In practice, scales in the ocular of microscopes may omit the need for digitization of the smears. Parameters from the tutorial can still be used. If a rough assessment of diameters and sizes leads to good agreements needs to be tested in future studies.

Advantages of digital microscopy like remote and off-site access to digitalized slides, easy handling, improved ergonomics, and quantitative measurements are evident (Bertram & Klopfleisch, 2017). New microscopes, which allow easy digitalization and connection to computers or mobile devices, are already available and it can be expected that they will undergo a rapid further development. Therefore, it is likely that new measurement procedures or even automated cell evaluations will be possible in the near future. Partial scanning of smears with a minimum number of cells to decrease the duration of the scan process and the file size could raise the practicality. More standardized determination of vaginal smears and the emerging digitalization technologies may lead to a more reliable use of vaginal cytology. Another scenario could be an automated evaluation of vaginal smears by artificial intelligence (AI). There is a strong public interest and market forces that are driving the rapid development of such diagnostic procedures (Liu et al., 2019). Also in challenging on-site staffing situations, such as the COVID 19 pandemic, digital microscopy may be an important tool to keep histology workflows running smoothly (Bertram et al., 2021).

Some studies have shown that AI is even partially superior to human experts in cytology, namely in determining neoplastic vs normal cells (Haenssle et al., 2018). Based on AI, standardized diagnostic procedures are possible which minimizes bias from the experience of the evaluators, laboratory equipment and other factors. Potential positive consequences may include reduced costs and earlier diagnosis (Mar & Soyer, 2018). In digital pathology it is already stated that computerized analysis of specimen based on AI has the potential to reduce laborious tasks while minimizing interobserver variability and maximizing reproducibility (Bertram et al., 2020). AI nowadays can also be used routinely for fecal screening for parasitic infections. Scanners automatically capture images from specimens and upload them into a cloud where the images are processed and analyzed for intestinal parasite eggs. The whole process is comparable or even quicker than the preparation time for conventional fecal flotation tests and led to agreeable results on comparison between the scanner system and parasitologists' examinations (Nagamori et al., 2020).

Based on these developments, it seems realistic that computer-based analysis of vaginal smears in conjunction with reliable definitions of cell types are possible in the near future. Potentially, the usefulness of vaginal cytology may be improved and should be re-evaluated in the context of detection of gynaecological disorders and ovulation timing. Further research is required to study if AI is helpful for the evaluation of vaginal smears. In addition, it needs to be tested if this will allow a more precise determination of the cycle stage. Whether the exact ovulation is predictable by an objective evaluation based on this tutorial has to be assessed in further studies.

Conclusion

Vaginal cytology is a useful tool for cycle staging and breeding management of female dogs because of its quick results and easy application. Nevertheless, the evaluator needs to follow standardized determination procedures to obtain objective and repeatable results. In that regard revised cell definitions and a tutorial were developed. In future steps we aim to develop methods for computer-based analysis of vaginal smears.

Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding Source

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Acknowledgement

The authors want to thank all participants of the survey and the raters testing the tutorial. In addition, we are very grateful for the help, advices and patience of Lisa Riege and Johanna Leber.

Institutional Review Board Statement

Ethical review and approval were waived for this study, because all vaginal smears were taken during gynaecological examination in the context of ovulation timing or routine gynaecological health check by trained experts.

References

- Antonov, A. (2016). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20, 193-203.
<https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals*, 53 Suppl 3, 53-62.
<https://doi.org/10.1111/rda.13352>
- Automotive Industry Action Group (AIAG). (2010). Measurement Systems Analysis Reference Manual. In Chrysler & G. M. C. Ford Motor Company (Eds.), (Vol. 4th edition).
- Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T., & Dinc, D. (2011). Determination of the Stages of the Sexual Cycle of the Bitch by Direct Examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1962-1967.
<https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1962.1967>
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Bergeron, L., Nykamp, S., Brisson, B., Madan, P., Sears, W., & Gartley, C. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245, 1360-1366. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1360>
- Bertram, C. A., Aubreville, M., Gurtner, C., Bartel, A., Corner, S. M., Dettwiler, M., Kershaw, O., Noland, E. L., Schmidt, A., Sledge, D. G., Smedley, R. C., Thaiwong, T., Kiupel, M., Maier, A., & Klopffleisch, R. (2020). Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count Is Area Dependent. *Veterinary Pathology*, 57(2), 214-226. <https://doi.org/10.1177/0300985819890686>
- Bertram, C. A., & Klopffleisch, R. (2017). The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, 54(5), 756-766.
<https://doi.org/10.1177/0300985817709888>
- Bertram, C. A., Stathonikos, N., Donovan, T. A., Bartel, A., Fuchs-Baumgartinger, A., Lipnik, K., van Diest, P. J., Bonsembiante, F., & Klopffleisch, R. (2021). Validation of digital microscopy: Review of validation methods and sources of bias. *Veterinary Pathology*, 03009858211040476. <https://doi.org/10.1177/03009858211040476>
- Bostedt, H. (2016). Exfoliative Vaginalzytologie und Uteruszytologie. In A. R. Günzel-Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 20-27). Schattauer Verlag. <https://books.google.de/books?id=Kk4EDAAAQBAJ>
- Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., & Bierschwal, C. J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, 35(3), 603-611. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90456-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90456-n)
- Bunck, C., & Günzel-Apel, A.-R. (2016). Zyklusdiagnostik. In A.-R. Günzel-Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 35-48). Schattauer.
- Christie, D. W., Bailey, J. B., & Bell, E. T. (1972). Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *British Veterinary Journal*, 128(6), 301-310.
[https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)36935-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)36935-x)

- Davidson, P. A. (2015). Determining Canine Estrus Stage via Vaginal Cytology. *Clinician's Brief*, 13, 19-21. <https://www.cliniciansbrief.com/article/determining-canine-estrus-stage-vaginal-cytology>
- Dore, M. A. (1978). A Classification of Exfoliative Cell Types in the Vaginal Smear of the Bitch. *Irish Veterinary Journal*, 32(182-185).
- Dreier, H. K. (2010). *Klinik der Reproduktionsmedizin des Hundes*. Schlütersche Verlag. <https://books.google.de/books?id=GZrvwAEACAAJ>
- Fontbonne, A. (2020). Small animal reproduction: Scientific facts versus dogmas or unverified beliefs. *Theriogenology*, 150, 464-470. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.014>
- Goodman, M. (2001). Ovulation Timing: Concepts and Controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(2), 219-235. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50201-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50201-6)
- Haenssle, H. A., Fink, C., Schneiderbauer, R., Toberer, F., Buhl, T., Blum, A., Kalloo, A., Hassen, A. B. H., Thomas, L., Enk, A., & Uhlmann, L. (2018). Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. *Annals of Oncology*, 29(8), 1836-1842. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy166>
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001a). The Canine Estrous Cycle. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 16-31). Saunders.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001b). Vaginal Cytology. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 32-40). Saunders <https://books.google.de/books?id=boRUZ8V-D3YC>
- Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66(3), 567-574. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.003>
- Linde, C., & Karlsson, I. (1984). The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 25(2), 77-82. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1984.tb00449.x>
- Liu, X., Faes, L., Kale, A. U., Wagner, S. K., Fu, D. J., Bruynseels, A., Mahendiran, T., Moraes, G., Shamdas, M., Kern, C., Ledsam, J. R., Schmid, M. K., Balaskas, K., Topol, E. J., Bachmann, L. M., Keane, P. A., & Denniston, A. K. (2019). A comparison of deep learning performance against health-care professionals in detecting diseases from medical imaging: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Digital Health*, 1(6), e271-e297. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(19\)30123-2](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(19)30123-2)
- Mar, V. J., & Soyer, H. P. (2018). Artificial intelligence for melanoma diagnosis: how can we deliver on the promise? *Annals of Oncology*, 29(8), 1625-1628. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy193>
- Mori, I. (2017). Glass slide preparation and digital pathology. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 7(6), 27. <https://doi.org/10.4172/2161-0681-C1-043>
- Moxon, R., Batty, H., Irons, G., & England, G. C. W. (2012). Periovalutary changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology*, 78(9), 1907-1916. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.002>

- Moxon, R., Copley, D., & England, G. C. (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology*, 74(3), 479-485.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.031>
- Nagamori, Y., Hall Sedlak, R., DeRosa, A., Pullins, A., Cree, T., Loenser, M., Larson, B. S., Smith, R. B., & Goldstein, R. (2020). Evaluation of the VETSCAN IMAGYST: an in-clinic canine and feline fecal parasite detection system integrated with a deep learning algorithm. *Parasites & Vectors*, 13(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04215-x>
- Olson, P., Thrall, M., Wykas, P., Nett, T., & Sawyer, H. (1984). Vaginal cytology part I A useful tool for staging canine oestrus cycle. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 6(4), 288-297.
- Olson, P. N., Bowen, R. A., Behrendt, M. D., Olson, J. D., & Nett, T. M. (1982). Concentrations of Reproductive Hormones in Canine Serum Throughout Late Anestrus, Proestrus and Estrus 1. *Biology of Reproduction*, 27(5), 1196-1206. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1196>
- Pérez, C. C., Rodríguez, I., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2005). Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. *Veterinary Record*, 156(20), 648-650.
<https://doi.org/10.1136/vr.156.20.648>
- Post, K. (1985). Canine Vaginal Cytology During the Estrus Cycle. *Canadian Veterinary Journal*, 26, 101-104.
- Romagnoli, S. (2017). Top 5 Reproduction Concerns in Dogs. *Clinician's Brief*, 15(1), 82-88.
<https://www.cliniciansbrief.com/article/top-5-reproduction-concerns-dogs>
- Root Kustritz, M. V. (2012). Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(3), 423-437, v. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>
- Schutte, A. P. (1967). Canine Vaginal Cytology—I Technique and Cytological Morphology*. *Journal of Small Animal Practice*, 8(6), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1967.tb04554.x>
- Sharma, M., & Sharma, N. (2016). Vaginal Cytology: An Historical Perspective on its Diagnostic Use. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 283-288.
<https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.6.283.288>
- Wehrend, A. (2010). *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund: diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Enke Verlag. <https://books.google.de/books?id=UIX6kEMSFKoC>
- Zuraw, A., Staup, M., Klopffleisch, R., Aeffner, F., Brown, D., Westerling-Bui, T., & Rudmann, D. (2021). Developing a Qualification and Verification Strategy for Digital Tissue Image Analysis in Toxicological Pathology. *Toxicol Pathol*, 49(4), 773-783.
<https://doi.org/10.1177/0192623320980310>

3.2 Additional Data

Kooperationsarbeit mit Gaojun Dong, Vitaly Belik und Dimitri Stepanov aus dem Fachbereich Epidemiologie und Biometrie der FU Berlin. Die Autor*innen waren für die Entwicklung und Gestaltung der CTSAs verantwortlich. Der Material und Methoden Abschnitt, der den Aufbau und die Funktion der CTSAs beschreibt, wurde größtenteils von diesen Autor*innen verfasst.

Nicht veröffentlichtes Paper:

Canine Vaginal Cytology: application of artificial intelligence in detection and determination of exfoliative vaginal cells

Felix Reckers¹, Gaojun Dong², Robert Klopfleisch³, Vitaly Belik⁴, Dimitri Stepanov⁵, Sebastian Arlt^{6*}

¹ Clinic for Animal Reproduction, Freie Universität Berlin; Germany, felix.reckers@fu-berlin.de

² Veterinary Epidemiology and Biometry, Freie Universität Berlin; Germany, gaojun.dong@fu-berlin.de

³ Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin; Germany, Robert.klopfleisch@fu-berlin.de

⁴ Veterinary Epidemiology and Biometry, Freie Universität Berlin; Germany, vitaly.belik@fu-berlin.de

⁵ Veterinary Epidemiology and Biometry, Freie Universität Berlin; Germany, dimitristepanov1@gmail.com

⁶ Clinic for Animal Reproduction, Freie Universität Berlin; Germany, sebastian.arlt@uzh.ch

*** Correspondence:**

Corresponding Author: Sebastian Arlt
sebastian.arlt@uzh.ch

Keywords: exfoliative vaginal cytology, vaginal smear, estrous cycle diagnostics, artificial intelligence, computer-based cell detection

Abstract

Vaginal cytology is a technique frequently used for gynaecological diagnoses such as the determination of the stage of estrous cycle, vaginal tumors or vaginitis in female dogs. Nevertheless, it has been shown that the evaluation of vaginal cells and, therefore, the interpretation of findings may lead to disagreement between evaluators, caused by varying definitions and examination methods. Reckers et. al suggested a tutorial for a standardized determination of vaginal cells.

The aim of the project is to identify vaginal cells (parabasal cells, intermediate cells, superficial cells, squames), erythrocytes and neutrophils on a vaginal smear of female dogs with the help of cell type specific algorithms (CTSA) based on this tutorial. For each type of cell a CTSA was developed. To train and validate the CTSA, more than 17.000 cells stained with hematoxylin eosin, from 54 vaginal smears were annotated with the program *QuPath*®.

Each CTSA was trained using a data set containing 2100 records, whereas each data point is an example of a cell from the corresponding vaginal cell class. 400 further data points per class were used as a validation set while assessing the performance of the trained (non-final) models. The accuracy of each CTSA in the validation set varied between 96% and 99% accuracy. Lastly, we employed additional 400 cells per class as a test set to evaluate the accuracy of the final models.

In this second approach, the accuracy was between 82.75% and 95.25%. The mean value of “validation set” and “test set” was between 89.82% and 97.46% accuracy.

To assess reasons why some cells were not identified (not identified cells = NIC) correctly, these NICs were reviewed. Afterwards the NICs were fed into the CTSA of the other types of cells to check whether they are identified by them. The majority of the NICs of their actual type were also not identified by CTSA of other types. The results suggest that a computer-based assessment of canine vaginal smears is possible and may lead to more robust results than assessments under the microscope.

1. Introduction

A gynecological examination of a female dog should include the vaginal cytology (Antonov, 2016). Vaginal cytology is an often used for the determination of the estrus stages in the sexual cycle in female dogs (Kustritz, 2006). The sexual cycle of female dogs is composed of proestrus, estrus, diestrus and anestrus (Aydin et al., 2011). The optimal time for natural breeding or artificial insemination is specific days in the estrus stage (Antonov, 2016). The complex process of maturation of the oocyte compared with the limited viability leads to a short

fertilization period which can be determined for breeding or insemination management (Zuercher et al., 2021b).

There are various possibilities to detect the days suitable for mating: Behavioral change like sexual receptivity of the female dog towards males (Goodman, 2001), vaginal mucosa change to a maximal wrinkling and pale appearance (Bergeron et al., 2014), the sanguineous vulvar discharge (Johnston et al., 2001a) and the edema of the vulva (Bunck & Günzel- Apel, 2016). However, the reliability of these techniques is low caused of the subjectivity of interpretation and the variability among female dogs (Bouchard et al., 1991).

One of the most used techniques for the determination of ovulation is the measurement of progesterone (P4) concentration from blood serum (Bouchard et al., 1991). However, differences between the measurement results depending on the used test have been shown (Jenny Uhlmann et al., 2016). Furthermore, the preanalytical handling of the specimen can affect measured P4 concentrations (Dietrich H. Volkmann, 2006).

The vaginal mucosa is subject to epithelial changes caused by ovarian hormones (Bostedt, 2016). The estrogen surge during proestrus leads to a growth of vaginal cells and a thickening of the vaginal mucosa from a few cell layers in anestrus to 20-30 cell layers at the end of proestrus (Johnston et al., 2001b). Erythrocytes occur physiologically in vaginal cytology in proestrus (Jöchle & Andersen, 1977). The increase of estrogen concentrations lead to diapedesis through the uterine capillaries (Sharma & Sharma, 2016). Therefore, in turn, the evaluation of vaginal cells can be used for the determination of the stage of the estrous cycle (Linde & Karlsson, 1984). Leukocytes found in vaginal smears are mostly neutrophils (Groppetti et al., 2012). Other leukocytes are very rare (Röttger, 2010). Neutrophils are commonly observed in the beginning of diestrus (Post, 1985). Neutrophils in other stages of the estrous cycle, high numbers of them, as well as bacteria inside of neutrophils can be signs of a vaginitis (Röttger, 2010; Wehrend et al., 2013).

Vaginal cells can be collected with a moistened swab from the dorsal vaginal mucosa (Leigh et al., 2013) and scale off from the mucosa (they exfoliate) (Röttger, 2010). In the following, the collected cells are applied onto a glass slide, air dried and stained (Kustritz, 2006). This method is rapid, inexpensive, simple to perform (Davidson, 2015; Leigh et al., 2013; Wehrend et al., 2013) and harmless to the female dog. However, the evaluation of the exfoliated vaginal cells and the interpretation of the respective stage of estrous cycle often lead to disagreements (Arlt, 2018; Reckers et al., 2022) caused by the individual experiences, skills and evaluation criteria of the observer (Moxon et al., 2010; Reckers et al., 2022).

Also for the detection of pathological findings in the genital tract of female dogs the vaginal cytology can be an useful tool. Infertility, increased puppy mortality, pyometra and vaginitis may be associated with abnormal bacterial growth (Bjurström, 1993). With the help of vaginal

cytology bacterial imbalances in the genital tract can be diagnosed, further diagnostics and an appropriate treatment can be initiated (Groppetti et al., 2012). Tumors in the vestibulum and the vagina are relatively common in female dogs (Igna et al., 2016). For example, Sticker sarcomas, also known as canine transmissible venereal tumors, may appear in sexual active female dogs, mostly in stray dogs, and can be diagnosed per cytological examination (BRODZKI et al., 2023).

Aim of this project was to develop cell type specific algorithms (CTSA) based on a recently published tutorial by (Reckers et al., 2022). Next to vaginal cells the CTSA should also identify erythrocytes and neutrophils.

In the light of the fast developing information technology (IT) and the rise in the processing capabilities of the hardware in the last few decades, computer-aided medical image analysis methods improved rapidly. Therefore, it was the aim to develop and assess an algorithm for the determination of cells from vaginal smears.

2. Material and Methods

2.1 Preparation of vaginal cell slides

In total, 54 vaginal smears taken from 41 female dogs for which health of the genital tract was confirmed were used for this project. The smears were leftovers from clinical examinations. The dogs were presented for gynaecological examination in the context of ovulation timing or routine gynaecological health check. Female dogs were aged between 1 and 14 years (median 5.0 years, interquartile ranges 3.0 and 6.0 years) and belonged to the breeds: Siberian Husky, Continental Bulldog, Great Dane, Rottweiler, Australian Shepherd, Jack Russell Terrier, Golden Retriever, Afghan Hound, Dobermann (n=2), Miniature Schnauzer (n=3), Pomsky, Manchester Terrier (=2), French Bulldog (n=2), Dachshund, Smooth Collie, Cross Breed (=5), Swiss Cattle Dog, Miniature Bullterrier, Pug (n=2), Labrador (n=3), Cairn Terrier, Kangal Shepherd Dog, Bernese Mountain Dog, Border Collie, Shiba Inu, German Shepherd, Leonberger, Monkey Terrier, and Berger Picard. The weight of the dogs differed between 5.0 and 56.0 kg (median 20.0 kg, interquartile range 10.0 and 30.3 kg).

The collection, preparation, staining and digitalization of the vaginal smears have been described elsewhere (Reckers et al., 2022). All specimens were collected with a moistened cotton swab via an inserted sterile speculum. Female dogs in different stages of the estrous cycle were chosen, so that all types of vaginal cells were represented.

For digitalization, the stained slides were scanned with Aperio CS2 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar, Germany). The data then was converted into Aperio Scan Scope Virtual Slide (svs) files and analysed using the open- source bioimage analysis software *QuPath*[®] (Queen's University Belfast, Belfast, Northern Ireland/UK).

For the development of the CTSA's a trained examiner (FR) assessed and defined at least 2500 cells of every cell type based on the tutorial published by (Reckers et al., 2022) on the computer screen. Therefore, 10.071 vaginal cells (2507 parabasal cells, 2519 intermediate cells, 2527 superficial cells and 2518 squames), 2512 erythrocytes and 2522 neutrophils were evaluated and determined. Inclusion criteria for the cells was clear structure and no larger damages. Overlapping but identifiable cells were included because during estrus many vaginal cells which tend to be visible in clusters are present. The cells were marked along their cell membrane with the *QuPath*[®] "Wand Tool" and "Brush Tool". These tools allow rapid and exact delineation of structures.

For an annotation, the respective cell was zoomed in to a magnification of 100x to 200x depending on its size. With the mouse cursor and the "Wand Tool" the edge of the cell was traced. Afterwards the annotated cell was determined as parabasal cell, intermediate cells, superficial cell, squamous cell, neutrophil, erythrocyte or irrelevant structure.

To determine the minimal amount/area of irrelevant structures needed for training the CTSA, the area of all annotated cells was summed up using *QuPath*[®] (i.e. 12 million μm^2) and the same area of irrelevant structures was annotated. Irrelevant structures may originate from cell debris, dust, accumulation of nondefinable cells, stain residues, blurred and unfocused structures, bacteria, pollen, air bubbles, mucus, hair, and others. In total, approximately 15.3 million μm^2 of these structures were annotated.

2.2 The CTSA's

Data set preparation

Every slide led to a file size of 2-4 GB and was converted into ".svs" (Scan Scope Virtual Slide) files. All annotations were cut into a square along with their boundary. For each cell type, around 2500 annotated cells were randomly divided into 2100 training datasets and 400 validation datasets for testing the performance of the model. These numbers were chosen, because it is common sense that this number of cells is feasible for projects such as this one. Other relevant projects regarding AI in veterinary medicine used comparable numbers of images (Burti et al., 2020). A total of six cell types were identified including erythrocytes,

neutrophils, superficial, squames, intermediate and parabasal cells. The specific number of cells for training and validation was as follows.

Cell type	Parabasal cell	Intermediate cell	Superficial cell	Squame	Erythrocytes	Neutrophils	Rubbish
Number	2507	2519	2527	2518	2512	2522	2640

Table: The numbers of annotated cells per cell type

Based on these annotated structures the CTSA were developed.

To validate the results of the CTSA, a “test set” of 400 annotated cells for every cell type (except for rubbish) was prepared. The “test set” should include 400 cells which were not used in another set before to guarantee that the CTSA had no contact with these cells. A “test set” for Rubbish is not necessary since the Rubbish does not have any clinical meaning and was annotated to simplify the determination of cells for the CTSA. Not identified cells (NIC) were fed afterwards into the CTSA of the other cell types to see whether they can identify these cells.

Model

We first cut the annotated cells from the original image and allocated each cell type into the respective training dataset and validation dataset. In a next step, the cells were fed into a binary network to determine if it belongs to the respective cell type or not.

We used the ResNet50 model to implement the classification. ResNet stands for Residual Network and is a specific type of convolutional neural network(CNN) introduced in 2015 by He Kaiming, commonly used in classification tasks in various computer vision contexts. Given that ResNet performed better than traditional deep neural network in various benchmark datasets, allowed for easier training and faster convergence due to the presence of jump connections. The model also have been shown to generalize better than the traditional networks. Those advantages allow us can effectively use it for transfer learning by performing fine-tuning on vaginal cytology dataset, make it useful for gynaecological diagnoses where the availability of labeled data is limited. The 50-layer ResNet uses a bottleneck design for the building block. Images first passed a basic block (Figure 1 (a)) for extracting the basic image feature. Then the extracted feature was fed into a series of bottleneck blocks (Figure 1 (b)), the block number is 3,4,6,3 respectively.

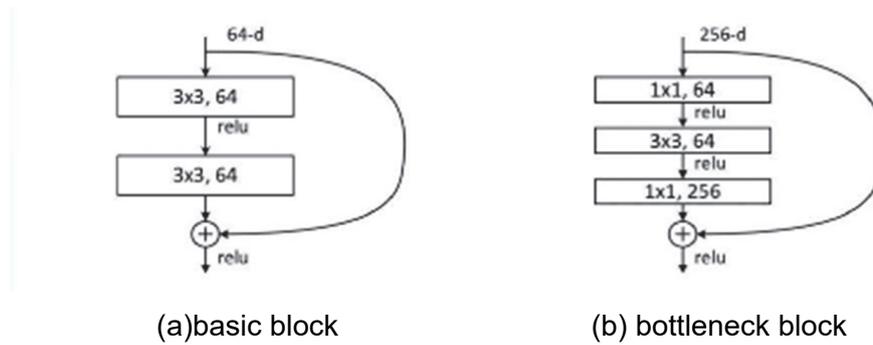


Figure 1: ResNet50

The experimental environment was as follows: The operating system was based on a High-Performance Computing system provided by the Free University Berlin, which included 8 GPU nodes with 24 NVIDIA GTX1080Ti totally, GPU acceleration library was CUDA 11.6. The deep learning framework used Pytorch 1.13.1.

In the training process, the pretrained weights on the ImageNet dataset were loaded first. Then the training stages were performed on the cell dataset using stochastic gradient descent with momentum of 0.9 and weight decay of 0.0001. We fine-tuned all layers of the network, the learning rate of 0.1 was adopted and 15 epochs were iterated for training. Furthermore, due to the limited memory of the GPU, gradient updates were computed using the batch size of 12.

Evaluation

The performance of this model was evaluated by accuracy below.

$$\text{acc} = \frac{\text{TP}}{\text{all number}}$$

Which represented the true positive value (TP) in all numbers for each category. Specifically, confusion matrix (Table 1) and Precision were used for calculating above metrics.

Groundtruth Prediction	1	0
1	True Positive (TP)	False Positive (FP)
0	False Negative (FN)	True Negative (TN)

Table 1: Confusion matrix

3. Results

Cell type	Parabasal cell	Intermediate cell	Superficial cell	Squames	Erythrocytes	Neutrophils
Accuracy	96.9	96.7	96.7	96.9	99.7	99.5

Table 2: the accuracies for the different type of cells in the validation set.

The results of the recheck with the “test set”:

All CTSA for the identification of the vaginal cells reached an accuracy over 96.7% in the “validation set”. The authors wanted to recheck the results by presenting the CTSA cells which were not used in the phases before to exclude possible recognition of already known cells. The percentages of correct identified cells of this “test set” declined between 4.4% and 14.1% to between 82.8% and 95.3%.

Cell type	Parabasal cell	Intermediate cell	Superficial cell	Squames	Erythrocytes	Neutrophil
accuracy	92.3	92.8	89.3	82.8	95.3	91.0
total number	400					
TP	369	371	357	331	381	364

Table 3: the numbers of cells in the respective “test set” with the true positive (TP) identification

To get an overall accuracy out of the results of the “test set” and the “validation set”, the mean value was calculated and led to an accuracy between 89.8% and 97.5%.

Type of cell	Accuracy in the “validation set”	Accuracy in the “test set”	Difference between “validation set” and “test set”	Mean Value of “validation set” and “test set”
Parabasal cell	96.9%	92.3%	4.7%	94.6%
Intermediate cell	96.7%	92.8%	5.7%	94.7%
Superficial cell	96.7%	89.3%	7.5%	93.0%
Squame	96.9%	82.8%	14.1%	89.8%
Erythrocyte	99.7%	95.3%	4.4%	97.5%
Neutrophil	99.5%	91.0%	8.5%	95.3%

Table: The accuracies of the “test set”, the accuracies of the “validation set”, the differences between both data sets and the mean value of both are shown in this table.

The identified cells of the test set were controlled by FR to evaluate whether the right cells were identified by the CTSA. It is to mention that in some cases (Parabasal cell=1, Intermediate cell=4, Superficial cell=10) the CTSA selected only a small section of a cell or structure. Likely, these sections were so small that it was not possible that the cells were defined correctly. They were named USoC (Unknown sections of cells).



Image 1: Example for USoC: The CTSA identified these sections as vaginal cells.

Since the test sets were composed of specific defined cells by FR, the question arose which cells the CTSA did not identify correctly. Therefore, the NICs were reviewed:

Cell type	Number of NICs
Parabasal cells	31
Intermediate cells	29
Superficial cells	43
Squames	69
Erythrocytes	19
Neutrophils	36

Table 4: The number of NICs by an CTSA out of 400 canine vaginal cells of each cell type

The CTSA did not identify between 19 and 69 out of 400 cells of the different cell types. All NICs were reviewed and confirmed to have been determined before correctly. The squames had the highest amount of NICs (n=69). The erythrocytes had the lowest amount of NICs (n=19). All USoCs were identified and assigned to a cell type by the CTSA.

Feeding of NICs into the other CTSA

To re-evaluate the function of the CTSA, the NICs were fed into the CTSA of the other cell types. According to the used approach it was expected that the CTSA would classify the NICs belonging to other cell types as "other".

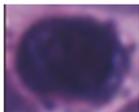
The results are shown in the chart below:

None of the 36 not identified neutrophils were identified by the other CTSA.

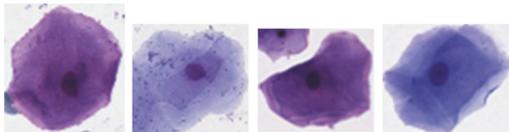
Out of all 19 not identified erythrocytes, this erythrocyte was identified by the squame CTSA:



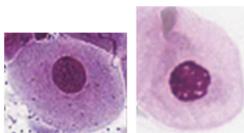
Out of all 31 not identified parabasal cells, this parabasal cell was identified by the intermediate cell CTSA:



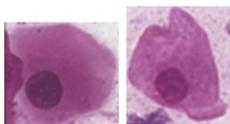
Out of all 43 not identified superficial cells, these four superficial cells were identified by the squames CTSA:



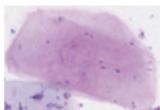
Out of all 29 not identified intermediate cells, these two intermediate cells were identified by the parabasal cells CTSA:



And these two intermediate cells were identified by the superficial cells CTSA:



Out of all 69 not identified squames, this squame was identified by the erythrocytes CTSA:



and these seven squame were identified by the superficial cells CTSA:



4. Discussion

Artificial intelligence (AI) has been evolving rapidly in the last years. In the medical sector AI has made great contributions to early disease detection, evaluation and treatment response assessments (Lei et al., 2021). Research projects and scientific publications about the use of AI in the medical sector are constantly increasing (Tran et al., 2019)

The use of AI in veterinary medicine

The use of AI may be useful in almost all fields of veterinary medicine. Especially in the field of medical imaging AI offers a lot of possibilities which help to increase diagnostics and animal health and welfare (Appleby & Basran, 2022):

For example, an often stated issue of cancer diagnostics is a high inter- and intra- rater discordance in mitotic count (unit for the grading of tumors) caused by disagreements between experts and examinations of different regions of tumors (Aubreville, Bertram, Donovan, et al., 2020). Therefore, the number of human and veterinarian pathology laboratories that have implemented digital pathology technology is increasing (Bertram et al., 2021). Medical image analysis by AI is nowadays a useful tool for cancer detection and treatment, such as skin cancer (Esteva et al., 2017), liver cancer (Zhou et al., 2019), breast cancer (Lei et al., 2021). Also in veterinarian radiology AI can detect heart diseases in dogs with an accuracy and sensitivity similar to veterinary radiologists (Li et al., 2020).

AI is already being used in routine procedures in other veterinarian fields: veterinarians and AI achieved almost identical results in assessing lung lesions of slaughtered pigs (Bonicelli et al., 2021).

For veterinary parasitology diagnostics, scanners which recognize and identify fecal parasite eggs closely to the performance of parasitologists are used by commercial laboratories (Nagamori et al., 2020).

Since the evaluation of canine vaginal smears may lead to heterogeneous results and is mostly dependent from the experience and the subjective evaluation of the evaluators (Arlt, 2018; Reckers et al., 2022) AI may be a more objective tool for the evaluation of vaginal cells.

The development of the project

Based on a recently developed tutorial (Reckers et al., 2022) the annotations for the database of this project were made. It is to mention that only one author selected the cells which were to be included. To a certain extent the decision between sufficient visibility vs. exclusion because of damages may have been subjective, even if the person was well trained beforehand, and, therefore, may have biased the project results.

With the help of this database the CTSA were trained to identify the respective structures. For every cell type (parabasal cell, intermediate cell, superficial cell, squame, erythrocytes, neutrophils) a distinct was created. Basal cells were not included into the project.

According to several authors these cells build the lowest layer of the mucosal membrane (Johnston et al., 2001b; Olson et al., 1984; Wehrend, 2010) and cannot be collected in relevant numbers with the swab without harming the vaginal epithelium (Reckers et al., 2022). Hence, a discrimination of basal and parabasal cells seems not necessary from the clinical point of view. Thus, cells that may have looked like basal cells were defined as parabasal cells.

Interpretation of results

In general, the percentage of correctly identified cells was good and may be useful in veterinary diagnostics.

The accuracy of detecting the squames differed by around 14% in the two validation approaches. A reason for this may be the high diversity of the appearance of the nucleus and the cytoplasm of squames.

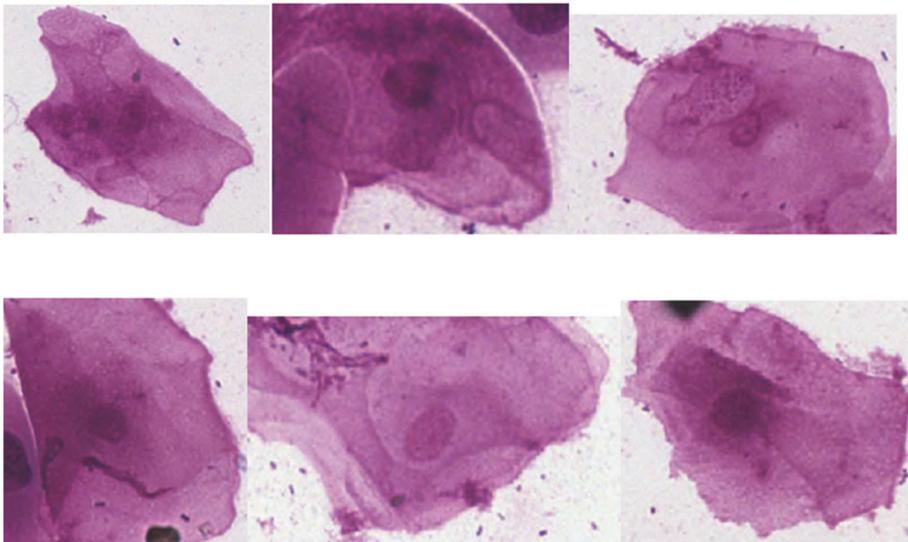
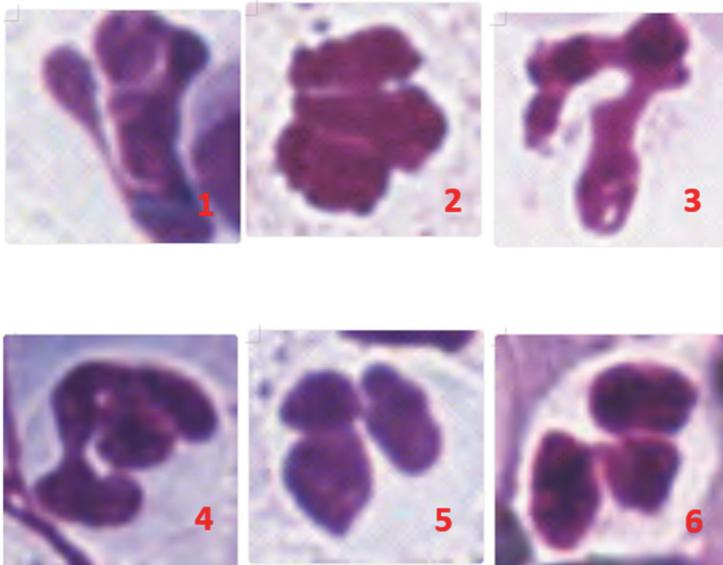


Image: The image shows examples of different grades of degeneration of the nucleus. Such differences may lead to difficulties or subjective determination by humans or AI.

The differences of the accuracy of neutrophils between the "test set" and the "validation set" was higher than the other type of cells (8.54%). A possible reason for this may also be a higher variability of the appearance of neutrophils. The variability includes the unsegmented and segmented status of the nucleus und eventually also a degeneration of the cells.



This image shows neutrophils with disintegrated membranes (1 – 3) and intact neutrophils (4 – 6)

The accuracy for the erythrocytes was the highest in the "test set" and the "validation set". Reason for this may be the simple structure of this cell type. It is to mention that the appearance of erythrocytes can be variable on different slides. However, likely the different appearances were included during the annotation to a sufficient extent.

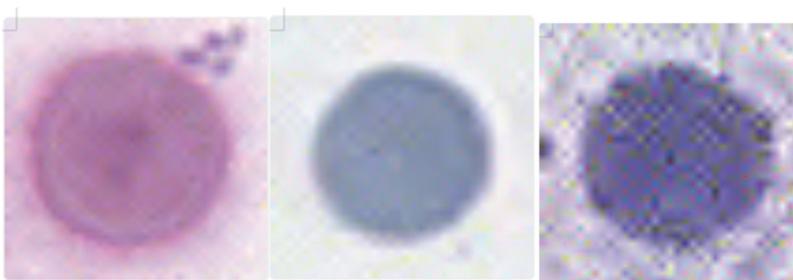


Image: The appearance of erythrocytes can be different.

Limitations and solution approaches

Smears from female dogs in anestrus contain only little numbers of vaginal cells because of the basal levels of sexual hormones in these stages and the resulting thin mucosa (Pérez et al., 2005). It seems that a low number of structures on a slide causes problems for the scanner to focus on almost empty specimen. Therefore, scans from anestrus are often blurred and

unfocused and only parts of it can be used for annotations. It can be expected that this technical problem will be resolved in the near future as the development of slide scanners is going to develop enormously because of the high demand for digitalization. Eventually, it may be helpful to roll the cotton swab more intensively to get more material onto the slide.

Varieties in the staining of cells may also contribute to heterogeneity in accuracy. According to the authors observation, even on the same slide the intensity of staining may vary significantly, leading to differences in the coloration of structures. This issue was, however, not part of the actual project; an objective assessment of the staining quality of the slides was not included into this study. Nevertheless, it can be hypothesized that more standardized staining procedures may improve the slide quality. However, in daily practice a suboptimal staining may still play a role. In this study, staining with hematoxylin and eosin was used as it is the most widely used technique according to a survey among veterinarians interested in small animal reproduction (Arlt, 2018). It remains open if other staining methods may provide more heterogenous or better results. Further studies and eventually better adaption of the algorithms may help to overcome suboptimal staining.

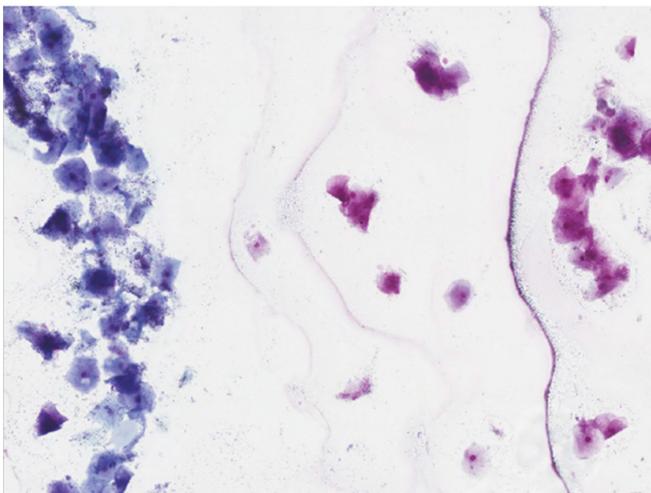


Image: Example of hematoxylin eosin stained canine vaginal cells. Most cells may be identified as superficial cells. However, because of poor staining technique significant variation of staining can be seen on the slide.

Damaged, folded, and overlapping cells are difficult to determine. According to the authors observation, overlapping cells were present on many of the slides as it is typical for specimens taken during proestrus, estrus and early luteal phase. Addressing this phenomenon was also not part of the presented project, an objective determination of the proportion of cells not eligible for annotation was not performed. To improve the quality of slides and reduce overlapping, the number of cells on the cotton swab could be reduced by preparing several glass slides. It can be expected that less and less cells will be present on the slides. In the following, a slide with only little overlapping may be selected for analysis. If this procedure,

however, may affect the proportion of cells detected has not been researched so far. Bacteria and other structures which cover parts of cells may have changed the appearance of cells. Bacteria are normal inhabitants of the lower reproductive tract (Golińska et al., 2021). In 60% of clinical healthy dogs aerobic, anaerobic and opportunistic pathogen bacteria were identified by routine laboratory examination (Groppetti et al., 2012). PCR examinations have shown that many more bacteria species are present in a healthy canine vagina (Lyman et al., 2019). Hence, the detection of presence of bacteria in the vaginal mucosa of female dogs without signs of genital disease is not of clinical relevance (Golińska et al., 2021). Moderate amounts of bacteria colonies reflect a physiological vaginal flora (Wehrend et al., 2013). It may be helpful to develop algorithms in the future that focus on the amount and type of bacteria to support detection of inflammation or other diseases.

In some cell types the CTSA identified structures which were not definable by conventional assessment (USoC). All USoC were identified by the respective CTSA. This is why it is to assume that the USoCs show magnified views of vaginal cells. Why these cells are magnified cannot be clarified, since all cells in this project were annotated in the same above-described way. In further projects a minimum amount of pixels per annotation could be preset for the identification of cells to avoid small sections of cells.

Cells which were unidentified were fed into the CTSA of the other type of cells to check whether they would identify these cells. The appearance of vaginal cells, even from the same cell type, is very various since the transition from one cell type to another is fluent. This could be the reason why few cells were identified by CTSA of other cell types. Neutrophils and erythrocytes were barely identified by the CTSA of the other cells.

Practical relevance of the project

In the recent project, CTSA's were used. This means that for each cell type a separate algorithm had to be developed which discriminated if a cell of question belonged to this specific cell type or not. In practice this approach is not helpful because it would be necessary that a slide is analyzed by running several separate CTSA's to get a complete overview. In a pilot phase an approach was tested which aimed to analyze all cell types at once. However, this approach led to poor results and was, therefore, not further investigated. The CTSA used in this project are probably not sophisticated enough, yet, to reach practice relevance.

The recent project, however, demonstrates that a cell differentiation is possible. Based on these findings more advanced algorithms may be developed which are able to discriminate the respective cells in a one-step-procedure with an appropriate sensitivity and specificity. The accuracy of determination of cells by AI in this project was still better than the conventional

determination: the authors built CTSA which can detect vaginal cells, neutrophils and erythrocytes to an acceptable degree. In small animal reproduction medicine the evaluation of vaginal cells still is a domain often leading to misinterpretation and wrong diagnostics (Arlt, 2018). Support of the assessment of slides by AI may increase the accuracy of the detection of the stage of estrous cycle. To which extent a detection of the ovulation is possible with the help of AI based evaluation of vaginal smears needs to be researched in further projects.

A possible outlook into the future

Apart from that, the rapid evolving possibilities of AI may allow the development of on-site AI solutions for the assessment of canine vaginal smears. The aim could be to develop small, practice-oriented scanners which are able to scan entire glass slides. The determination and interpretation of the smear could be done by computer software or even smartphone apps. This could also include cytologies of tumor cells or inflammation markers of the vaginal tract. In male dogs cytology from the prepuce can be used for the diagnostics of estrogen producing testicular tumors (Dreimanis et al., 2012). The determination of these cells in the prepuce could be a further target of AI cytology scanners.

The tutorial and this project may contribute to a more standardized and objective evaluation of vaginal smears and vaginal cytology.

Conclusion

Vaginal cytology is an often-used tool for the determination of the estrous cycle in female dogs and other vaginal conditions. Nevertheless, the high inter- and intra- observer variabilities of vaginal cells may often lead to misinterpreted results. Therefore, the aim of the project was to develop cell type specific algorithms (CTSA) which can identify vaginal structures on digitized slides autonomously. The results show a good percentage of correct identification of vaginal cells. However, for each cell, yet, a separate algorithm was developed which limits the practical usability of the presented approach. Furthermore, the heterogeneous appearance of vaginal cells and vaginal smears as well as other factors limit the usability of the CTSA's. However, this project may support the development of an more complex but simple to use system for easy and reliable determination of vaginal cells in small animal veterinary medicine.

Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding Source

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. GD acknowledges the financial support by the Freie Universität Berlin - Chinese Scholarship Council program.

Institutional Review Board Statement

Ethical review and approval were waived for this study because all vaginal smears were leftovers from gynecological examinations in the context of ovulation timing or routine gynecological health check by trained experts.

References

- Antonov, A. (2016). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20, 193-203.
<https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Appleby, R. B., & Basran, P. S. (2022). Artificial intelligence in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 260(8), 819-824.
<https://doi.org/10.2460/javma.22.03.0093>
- Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals*, 53 Suppl 3, 53-62.
<https://doi.org/10.1111/rda.13352>
- Aubreville, M., Bertram, C. A., Donovan, T. A., Marzahl, C., Maier, A., & Klopffleisch, R. (2020). A completely annotated whole slide image dataset of canine breast cancer to aid human breast cancer research. *Scientific Data*, 7(1), 417. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00756-z>
- Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T., & Dinc, D. (2011). Determination of the Stages of the Sexual Cycle of the Bitch by Direct Examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1962-1967.
<https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1962.1967>

- Bergeron, L., Nykamp, S., Brisson, B., Madan, P., Sears, W., & Gartley, C. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245, 1360-1366. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1360>
- Bertram, C. A., Stathonikos, N., Donovan, T. A., Bartel, A., Fuchs-Baumgartinger, A., Lipnik, K., van Diest, P. J., Bonsembiante, F., & Klopffleisch, R. (2021). Validation of digital microscopy: Review of validation methods and sources of bias. *Veterinary Pathology*, 03009858211040476. <https://doi.org/10.1177/03009858211040476>
- Bjurström, L. (1993). Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34, 29-34.
- Bonicelli, L., Trachtman, A. R., Rosamilia, A., Liuzzo, G., Hattab, J., Mira Alcaraz, E., Del Negro, E., Vincenzi, S., Capobianco Dondona, A., Calderara, S., & Marruchella, G. (2021). Training Convolutional Neural Networks to Score Pneumonia in Slaughtered Pigs. *Animals*, 11(11), 3290. <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3290>
- Bostedt, H. (2016). Exfoliative Vaginalzytologie und Uteruszytologie. In A. R. Günzel-Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 20-27). Schattauer Verlag. <https://books.google.de/books?id=Kk4EDAAAQBAJ>
- Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., & Bierschwal, C. J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, 35(3), 603-611. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90456-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90456-n)
- BRODZKI, P., WOLNIACZYK, K., GŁODKOWSKA, K., & BRODZKI, N. (2023). Tumors of the reproductive system of bitches—based on the description of selected own clinical cases and literature data. *Med. Weter*, 79(7), 334-344.
- Bunck, C., & Günzel- Apel, A.-R. (2016). Zyklusdiagnostik. In A.-R. Günzel- Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 35-48). Schattauer.
- Burti, S., Longhin Osti, V., Zotti, A., & Banzato, T. (2020). Use of deep learning to detect cardiomegaly on thoracic radiographs in dogs. *The Veterinary Journal*, 262, 105505. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105505>
- Davidson, P. A. (2015). Determining Canine Estrus Stage via Vaginal Cytology. *Clinician's Brief*, 13, 19-21. <https://www.cliniciansbrief.com/article/determining-canine-estrus-stage-vaginal-cytology>
- Dreimanis, U., Vargmar, K., Falk, T., Cigut, M., & Toresson, L. (2012). Evaluation of preputial cytology in diagnosing oestrogen producing testicular tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 53(9), 536-541. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01261.x>
- Esteva, A., Kuprel, B., Novoa, R. A., Ko, J., Swetter, S. M., Blau, H. M., & Thrun, S. (2017). Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, 542(7639), 115-118. <https://doi.org/10.1038/nature21056>
- Golińska, E., Sowińska, N., Tomusiak-Plebanek, A., Szydło, M., Witka, N., Lenarczyk, J., & Strus, M. (2021). The vaginal microflora changes in various stages of the estrous cycle of healthy female dogs and the ones with genital tract infections. *BMC veterinary research*, 17(1), 8-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02710-y>
- Goodman, M. (2001). Ovulation Timing: Concepts and Controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(2), 219-235. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50201-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50201-6)

- Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549-1556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.022>
- Igna, C., Bumb, D., Proteasa, A., Dascalu, R., Schuszler, L., Igna, V., & Brezovan, D. (2016). Subtotal vaginectomy as a treatment for vaginal tumours in two bitches. *Bull. UASVM Vet. Med*, 73(6).
- Jöchle, W., & Andersen, A. C. (1977). The estrous cycle in the dog: A review. *Theriogenology*, 7(3), 113-140. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(77\)90240-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(77)90240-0)
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001a). The Canine Estrous Cycle. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 16-31). Saunders.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001b). Vaginal Cytology. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 32-40). Saunders <https://books.google.de/books?id=boRUZ8V-D3YC>
- Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66(3), 567-574. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.003>
- Lei, Y.-M., Yin, M., Yu, M.-H., Yu, J., Zeng, S.-E., Lv, W.-Z., Li, J., Ye, H.-R., Cui, X.-W., & Dietrich, C. F. (2021). Artificial Intelligence in Medical Imaging of the Breast [Review]. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.600557>
- Leigh, O., Raji, L., & Diakodue, E. (2013). Detection of Standing Heat In Bitches: Application of Vaginal Cytology. *World Journal of Life Science and Medical Research*, 3, 21.
- Li, S., Wang, Z., Visser, L. C., Wisner, E. R., & Cheng, H. (2020). Pilot study: Application of artificial intelligence for detecting left atrial enlargement on canine thoracic radiographs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 61(6), 611-618. <https://doi.org/10.1111/vru.12901>
- Linde, C., & Karlsson, I. (1984). The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 25(2), 77-82. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1984.tb00449.x>
- Lyman, C. C., Holyoak, G. R., Meinkoth, K., Wieneke, X., Chillemi, K. A., & DeSilva, U. (2019). Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLOS ONE*, 14(1), e0210157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210157>
- Moxon, R., Copley, D., & England, G. C. (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology*, 74(3), 479-485. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.031>
- Nagamori, Y., Hall Sedlak, R., DeRosa, A., Pullins, A., Cree, T., Loenser, M., Larson, B. S., Smith, R. B., & Goldstein, R. (2020). Evaluation of the VETSCAN IMAGYST: an in-clinic canine and feline fecal parasite detection system integrated with a deep learning algorithm. *Parasites & Vectors*, 13(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04215-x>
- Olson, P., Thrall, M., Wykas, P., Nett, T., & Sawyer, H. (1984). Vaginal cytology part I A useful tool for staging canine oestrus cycle. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, 6(4), 288-297.
- Pérez, C. C., Rodríguez, I., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2005). Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. *Veterinary Record*, 156(20), 648-650. <https://doi.org/10.1136/vr.156.20.648>

- Post, K. (1985). Canine Vaginal Cytology During the Estrus Cycle. *Canadian Veterinary Journal*, 26, 101-104.
- Reckers, F., Klopffleisch, R., Belik, V., & Arlt, S. (2022). Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834031>
- Röttger, K. (2010). *Untersuchungen zur Durchführung der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin: ein Beitrag zur Standardisierung dieser diagnostischen Methode* [Universitätsbibliothek]. Gießen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2010/7744>
- Sharma, M., & Sharma, N. (2016). Vaginal Cytology: An Historical Perspective on its Diagnostic Use. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 283-288. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.6.283.288>
- Tran, B., Vu, G., & Ha, G. (2019). Global evolution of research in artificial intelligence in health and medicine: a bibliometric study. *J Clin Med.*, 8(3), 360.
- Uhlmann, J., Weber, C., Kuechenmeister, U., & Muennich, A. (2016, 25.07.2016). What do the values really mean? - A comparison of an enzyme-linked fluorescent assay vs chemiluminescent immunoassay for measuring serum progesterone in bitches. ISCFR & EVSSAR Symposium, France, Paris.
- Volkman, D. H. (2006). The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology*, 66(6), 1583-1586. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.024>
- Wehrend, A. (2010). *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund: diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Enke Verlag. <https://books.google.de/books?id=Uix6kEMSFKoC>
- Wehrend, A., Plato, K., & Goericke-Pesch, S. (2013). Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 41, 267-274. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623715>
- Zhou, L. Q., Wang, J. Y., Yu, S. Y., Wu, G. G., Wei, Q., Deng, Y. B., Wu, X. L., Cui, X. W., & Dietrich, C. F. (2019). Artificial intelligence in medical imaging of the liver. *World J Gastroenterol*, 25(6), 672-682. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i6.672>
- Zuercher, J., Boes, K. M., Balogh, O., Helms, A. B., & Cecere, J. T. (2021). Comparison of a Point-of-Care Analyzer With a Chemiluminescent Immunoassay for Serum Progesterone Measurement in Breeding Management of the Bitch [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.660923>

4 Diskussion

4.1 Bisheriger Wissensstand

Um eine objektive, reproduzierbare Befundung im Rahmen einer vaginalzytologischen Untersuchung zu ermöglichen, mussten zunächst möglichst eindeutige Definitionen der unterschiedlichen Zelltypen entwickelt werden. Die dargestellte Literaturanalyse hat gezeigt, dass unterschiedliche Autoren teils sehr unterschiedliche Definitionen publiziert haben. Wie die Ergebnisse von Zellbefundungen durch Experten in dieser Arbeit und auch in einem Vorgängerprojekt (Arlt 2018) zeigten, münden tatsächliche Evaluationen in sehr heterogene Ergebnisse. Diese Diskrepanzen können je nach klinischem Fall eine hohe klinische Relevanz haben, da Aspekte wie Hormoneinflüsse, Zyklusstand, Ovulationszeitpunkte und ggf. auch Aspekte der Vaginalgesundheit unterschiedlich bewertet werden könnten.

Die selbst entwickelten Definitionen stellen einen Versuch dar, die Befundung von vaginalzytologischen Ausstrichen zu standardisieren. Inwieweit dies für die Zukunft gelingt, muss zu gegebener Zeit erneut untersucht werden. Es kann festgehalten werden, dass der open access Artikel von Reckers et al. (2022), erschienen in der Zeitschrift *Frontiers Veterinary Sciences*, bis zum 17.01.2024 insgesamt 34.568 Lesezugriffe verzeichnet und bereits fünf Mal zitiert wurde (siehe <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35400101>). Auch wenn diese Daten keine Rückschlüsse auf eine tatsächliche Akzeptanz oder Nutzung der beschriebenen Zelldefinitionen zulassen, kann doch von einem gewissen Interesse an dem Thema ausgegangen werden.

Analog zu anderen Digitalisierungsprojekten in Medizin und Veterinärmedizin war ein weiteres Projektziel basierend auf den entwickelten Definitionen und über 15.000 annotierten Vaginalzellen einen Algorithmus zu entwickeln, der Vaginalzellen auf dem Objektträger erkennt und beziffert. Neben den Zellen des Vaginalepithels (Parabasalzellen, Intermediärzellen, Superfizialzellen und Schollen) sollte der Algorithmus auch andere Arten von Zellen (Erythrozyten und neutrophile Granulozyten) erkennen können, die für die Bestimmung des Zyklusstandes und des Gesundheitszustands des weiblichen Genitaltrakts relevant sind. Außerdem mussten Strukturen erkannt werden, die keinerlei Bedeutung für die Zyklusstand-Bestimmung haben, um genaue Endergebnisse zu bekommen.

4.2 Vaginalzytologie bei anderen Säugetierarten

Die Veränderungen des zytologischen Erscheinungsbilds während der Vorbrunst und Brunst lassen sich auch bei anderen Tierarten darstellen: Bei Rindern lässt sich der Östrus bei exfoliativer Probennahme durch einen Anstieg um 50% an verhornten Vaginalzellen feststellen (Sharma & Sharma, 2016). Auch beim Diöstrus lassen sich durch den Anstieg an Parabasalzellen, Intermediärzellen und neutrophilen Granulozyten Parallelen zur Hündin finden (Sharma & Sharma, 2016). Im Vergleich zur Hündin ist die Dauer hoher Östrogenkonzentrationen aber kürzer, weshalb es zu weniger ausgeprägter Keratinisierung der Vaginalzellen kommt (Suebkhampet & Marcou, 2019). Die Vaginalzytologie besitzt daher beim Rind klinisch keine ausgeprägte Bedeutung. Studien zu computergestützten Auswertungen der Vaginalzellen beim Tier wurden, nach bisherigen Erkenntnissen, bisher nicht publiziert.

Bei kleinen Wiederkäuern ist die Vaginalzytologie ebenfalls beschrieben. Für die Zyklusbestimmung der westafrikanischen Zwergziege scheint der Vaginalabstrich jedoch nicht die optimale Methode zu sein: Zwar lässt sich auch dort während des Zyklus ein Anstieg an verhornten Vaginalzellen feststellen, jedoch ließ sich der Östrus anhand des Abstriches nicht bestimmen (Ola et al., 2006). Auch die Unterschiede im Abstrich zwischen Diöstrus und Anöstrus sind zu marginal, um das Ende des einen und den Beginn des nächsten Zyklus bestimmen zu können (Ola et al., 2006). Dies scheint auch für andere Schaf- und Ziegenarten zu gelten (Sharma & Sharma, 2016).

Für die kleine Wiederkäuer scheint die Vaginalzytologie somit nicht oder nur im geringen Rahmen zur Bestimmung des Zyklus geeignet und sollte nach Angaben der Autoren eher für die generelle Funktionskontrolle der Ovarien genutzt werden (Ola et al., 2006).

Um das Stadium des Sexualzyklus der Maus möglichst genau zu bestimmen, ist die Vaginalzytologie laut einiger Autoren Mittel der Wahl (Byers et al., 2012; Cora et al., 2015). Anhand des Zellbilds lassen sich die Stadien gut unterscheiden (Byers et al., 2012). Proöstrus und Östrus lassen sich bei der Maus schon anhand der Ödematisierung und des Öffnungsgrades der Vulva bestimmen (Ekambaram et al., 2017). In Fällen, in denen alle vier Stadien des Sexualzyklus bestimmt werden müssen, eignet sich die Vaginalzytologie gut (Byers et al., 2012; Cora et al., 2015). Jedoch kann die häufige Anwendung von Vaginalabstrichen zu Scheinträchtigkeit und mechanischen Traumata führen (Ekambaram et al., 2017).

In der Reproduktionsmedizin der Katze findet die Vaginalzytologie auch Anwendung. Jedoch muss auf die Besonderheiten der Katze aufmerksam gemacht werden. Im Gegensatz zum Hund hat die Katze nicht immer eine spontane Ovulation (Mills et al., 1979). Diese wird vielfach erst durch Stimulierung, wie den Geschlechtsakt, durch einen neuro-endokrinen Reflex ausgelöst (Kanca et al., 2014), auch wenn ein größerer Anteil der Katzen auch spontan ovulieren kann. Die Katze besitzt einen saisonalen, polyöstrischen Zyklus, was bedeutet, dass sie in einer Saison viele aufeinanderfolgende Zyklen durchläuft (Johnson, 2022). Das hormonelle Geschehen ist vom Sonnenlicht bzw. der dadurch beeinflussten Melatoninkonzentration abhängig und kann sich daher jahreszeitlich bzw. je nach Lichtintensität natürlicher und künstlicher Lichtquellen ändern.

Die exfoliative Vaginalzytologie wird bei der Katze deutlich seltener angewendet als bei der Hündin. Das hat vielfache Gründe: Zum einen kann die Ovulation bereits durch das Einführen eines Tupfers, bzw. die Stimulation der Vagina ausgelöst werden (Mills et al., 1979). Zum anderen ist die zelluläre Veränderung der Vaginalschleimhaut nicht so stark ausgeprägt wie bei der Hündin (Kanca et al., 2014; Pertiwi et al., 2018). Des Weiteren machen der polyöstrische Zyklus und die induzierten Ovulationen der Katze eine exakte Bestimmung des Ovulationszeitpunktes meist obsolet (Kanca et al., 2014). Ansonsten entsprechen die auftretenden Zelltypen im jeweiligen Zyklusstadium dem der Hündin (Mills et al., 1979). Erhöhte Erythrozytenzahlen im Proöstrus, sowie neutrophile Granulozyten im Diöstrus kommen physiologisch nicht im Abstrich vor (Mills et al., 1979; Pertiwi et al., 2018).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass in den Publikationen zur Vaginalzytologie zwar die unterschiedlichen Zelltypen des Vaginalepithels benannt, diese aber kaum genau definiert wurden. Inwieweit für andere Tierarten ein Bedarf an revidierten Zelldefinitionen besteht, wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit nicht untersucht. Bisher sind keine Ansätze bekannt, in welchen Vergleiche zwischen unterschiedlichen Untersuchern angestellt wurden. Ferner haben die Recherchen keine Literaturstellen aufgedeckt, in welchen computergestützte Analysemethoden beim Tier untersucht oder angewendet wurden.

Auch in der Humanmedizin wird die Vaginalzytologie angewendet. Jedoch aus anderen Beweggründen als beim Tier. Anhand von Abstrichen der Vagina konnte festgestellt werden, dass Veränderungen des Mikrobioms zu Frühgeburten führen kann (Stout et al., 2017). Auch zur Feststellung von Infektionen des Geschlechtsapparats, wie Tripper oder Chlamydien, werden beim Menschen Vaginalzytologien bevorzugt angewendet (Chernesky et al., 2005). Durch die Entnahme von Zellen der Cervix- Schleimhaut per Vaginalzytologie können frühzeitig und nicht-invasiv cervicale Karzinome diagnostiziert und eine frühe Therapie eingeleitet werden (Dunn & Sprunt, 1955).

Ob die digitale Bestimmung der Vaginalzellen bei den oben genannten Tierarten eine sinnvolle Ergänzung oder Verbesserung im Rahmen der klinischen Diagnostik ermöglicht, muss in weiterführenden Studien überprüft werden. Bei Rindern kann davon ausgegangen werden, dass die derzeitige Brunsterkennung per Observation von Veränderungen im Verhalten und den externen Geschlechtsteilen oder mittels neuerer technischer Möglichkeiten wie der Aktivitätserkennung und anderer Systeme aus kommerziellen und logistischen Gründen nicht durch die Vaginalzytologie zu ersetzen ist. Jedoch kann die Vaginalzytologie bei Rassen, die zu stillen Brunsten neigen (Büffel, Zebu Rind) ergänzend zur konventionellen Zykluserkennung genutzt werden (Mingoas & Ngayam, 2009; Suebkhampet & Marcou, 2019).

Bei Maus und Katze hat die Zyklusbestimmung einen nicht so hohen Stellenwert wie bei der Hündin. Dadurch wäre eine computergestützte vaginalzytologische Bestimmung des Zyklusstadiums bei diesen Tierarten wahrscheinlich nur von geringem praktischem Nutzen.

Es lässt sich bilanzieren, dass bei allen beschriebenen Tierarten die Vaginalzellen in ihren unterschiedlichen Stadien weniger große Unterschiede aufweisen als die Zellen der Hündin. Generell scheint das Vorkommen der jeweiligen Vaginalzelltypen im jeweiligen Zyklusstadium tierartübergreifend sehr ähnlich zu sein. Ob die von (Reckers et al., 2022) aufgestellten Definitionen auf andere Tierarten vollumfänglich übertragbar sind, und die Bestimmung danach klinisch von Relevanz sind, muss in weiteren Arbeiten überprüft werden.

4.3 Standardisierung von Untersuchungen in der Veterinärmedizin

Für eine objektive Diagnostik in der Veterinärmedizin empfiehlt es sich, Untersuchungen und Befundinterpretationen zu vereinheitlichen. In vielen Bereichen ist dies bereits der Fall:

Einer der veterinärmedizinischen Bereiche mit einer hohen Standardisierung ist die bildgebende Diagnostik

Zur radiologischen Erkennung von Hüftdysplasien (HD) beim Hund werden standardisierte Messmethoden genutzt, um den Schweregrad der HD bestimmen zu können (Klever et al., 2020). Eine Messmethode ist der sogenannte Norbergwinkel, welcher auch durch die Fédération Cynologique Internationale (FCI), ein internationaler Dachverband von nationalen Hundezuchtverbänden der meisten europäischen Länder, Russland, Südamerika und Asien, anerkannt ist (Mark Flückiger, 2007; Wu et al., 2014). Anhand der Messung spezifischer Winkel und eines Schwellenwerts von 105° lässt sich das Hüftgelenk objektiv und reproduzierbar ausmessen, wodurch HD-Diagnosen gestellt werden können (M Flückiger, 2007).

Ein weiteres Beispiel für die standardisierte Diagnostik in der bildgebenden Veterinärmedizin ist die Bestimmung des Vertebral Heart Score (VHS). Anhand dieser Methode kann bei laterolateralen, radiologischen Thoraxaufnahmen die Größe der Herzsilhouette bestimmt werden, welche eine Aussage über cardiovaskuläre Erkrankungen ermöglicht (Guglielmini et al., 2009). Dabei werden die Länge und Breite des Herzens vermessen. Beide Messungen werden an die kraniale Kante des 4. Brustwirbels angelegt und anhand der Länge der Messergebnisse der VHS bestimmt (Buchanan & Bücheler, 1995). Anwendung findet die VHS Messung vor allem beim Hund, wo jedoch auf rassespezifische Unterschiede hinzuweisen ist (Lamb et al., 2001). Ansonsten kann der VHS auch bei Katzen (Litster & Buchanan, 2000) und Frettchen (Stepien et al., 1999) angewendet werden. Auch bei der westafrikanischen Zwergziege wurden bereits standardisierte Untersuchungen zur Bestimmung des VHS beschrieben (Ukaha et al., 2013).

Aber auch internistische Bereiche arbeiten mit vereinheitlichten Diagnostikmöglichkeiten. Normierungen von Blutzuckermessgeräten (Glucometer) durch die American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) sorgen dafür, dass bei der Messung des Glucosespiegels im Blut standardisierte und objektive Werte angegeben werden können, die unabhängig von der Erfahrung der Tester*in zu reproduzierbaren Ergebnissen führt (Gerber & Freeman, 2016).

Aufgrund von plazentaren Gegebenheiten beim Rind, sind Kälber nach der Geburt stark von über das Kolostrum aufgenommene Immunglobuline abhängig, um einen Schutz gegenüber infektiösen Pathogenen zu entwickeln (Weaver et al., 2000). Anhand des Immunglobulingehalts im Serum des Kalbs lässt sich somit die Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten und die Versorgung im neonatalen Alter bestimmen. Da die Proteingröße der Immunglobuline relativ groß ist und Nichtimmunglobulin-Proteine im Serum in weitgehend konstanten Mengen vorkommen, lässt sich der Gehalt der über das Kolostrum aufgenommenen Immunglobuline über ein Refraktometer ermitteln (Calloway et al., 2002). Ein Abgleich mit definierten Sollwerten des Immunglobulingehalts im Serum ermöglichen eine objektive, vereinheitlichte Bestimmung.

Subjektive Wahrnehmungen der Untersucher*in können Befunderhebungen und damit gestellte Diagnosen verfälschen und somit zu falschen, zu frühen, zu späten oder fehlenden Behandlungen führen. Somit können erforderliche Behandlungen nicht oder zu spät erfolgen oder iatrogene Erkrankungen entstehen, welche auf unnötigen Behandlungen beruhen. Es gibt Hinweise, dass Behandlungsfehler sehr schädliche Auswirkungen auf Tiere haben können (Schortz et al., 2022). Andere Studien zeigen, dass bei rund 51% der Schadensersatzforderungen in Veterinärbereich ein vorrausgegangener tierärztlicher Fehler zugrunde lag (Oxtoby et al., 2015).

Um Fehler zu reduzieren, wurden in einigen Bereichen, zum Beispiel bei Point of Care Tests (Flatland et al., 2013) oder in Japan in der Schweinezucht (Ichikawa & Koketsu, 2012), SOPs „standard operating procedures“ eingeführt. In der Kleintier- Reproduktionsmedizin fehlen solche SOPs bis zum jetzigen Zeitpunkt oft. Andererseits gibt es in vielen relevanten Bereichen Leitlinien, welche tierärztliches Handeln standardisieren und vereinheitlichen sollen. Ein gutes Beispiel dafür sind die Antibiotikaleitlinien (Link zur Leitlinie auf der Seite der Bundestierärztekammer), welche regelmäßig durch eine Expertenkommission überarbeitet werden.

Im Bereich der Kleintierreproduktionsmedizin sind zahlreiche Untersuchungen mit unterschiedlichen Herausforderungen behaftet. Beispielsweise liefern LH-Messungen im Labor standardisierte Ergebnisse, sind aber meist semiquantitativ. Vaginoskopie, Ovariensonografie und Vaginalzytologie sind Untersuchungen, die stark von der Erfahrung der Untersucher*in, der technischen Ausstattung und dem Individuum abhängig sind. Oft sind die Untersuchungsergebnisse nicht reproduzierbar, da keinem standardisierten Protokoll gefolgt wird. Hinzu kommt, dass die Evaluation der Ergebnisse von der subjektiven Einschätzung der Untersucher*in beeinflusst wird. Speziell bei der Vaginalzytologie ist fraglich, wie viele Zellen auf dem Objektträger im Rahmen alltäglicher Untersuchungen tatsächlich ausgewertet werden. Möglicherweise wird in einigen Fällen aufgrund begrenzt zur Verfügung stehender Zeit ein nur kleiner Bereich auf dem Objektträger evaluiert und die prozentualen Anteile der vorkommenden Zelltypen grob geschätzt. Genaue Studien, wie groß der durchschnittliche Bereich auf dem Objektträger ist, welcher betrachtet wird, bzw. wie viele Vaginalzellen tatsächlich evaluiert werden, bis eine endgültige Diagnose gestellt wird, gibt es nach eigenen Recherchen nicht. Daher sollten Aussagen, ob und inwieweit die Vaginalzytologie zur Bestimmung der Ovulation in der täglichen Praxis tauglich ist, mit Vorsicht formuliert werden. Auch können Definitionen, ab welchem Prozentsatz eines Zelltyps ein Stadium des Sexualzyklus beginnt bzw. endet, bisher nur auf Schätzungen beruhen.

Die Bestimmung der Progesteronkonzentration wird derzeit als Goldstandard für die Ovulationsbestimmung beschrieben (J. Uhlmann et al., 2016). Jedoch gibt es unterschiedliche Verfahren für die Messung. Als genauestes Verfahren gilt derzeit das Radioimmunoassay (RIA), welches jedoch aufwendig und teuer ist und auch aufgrund des anfallenden radioaktiven Abfalls in der Praxis nicht häufig verwendet wird. Gebräuchlicher ist das Chemilumineszenz Immunoassay (CLIA), welches eine annähernd vergleichbare Genauigkeit bietet (Kutzler et al., 2003; Root Kustritz, 2012a; J. Uhlmann et al., 2016). Beide Verfahren werden meist nur von größeren Laboren angeboten. Versandkosten, Versanddauer oder Kurierkosten können allerdings eine Auswertung der Proben verteuern und die Übermittlung der Ergebnisse verzögern. Um zügig Messergebnisse für die Ovulationszeitpunktbestimmung zur Verfügung

zu haben, wurden Schnelltests für den routinemäßigen Gebrauch in der Praxis oder Klinik entwickelt. Enzyme linked fluorescent assay (ELFA) und Point of Care (POC) Systeme können in der Praxis angewendet werden und liefern die Ergebnisse nach 30 bis 60 Minuten. Jedoch wurde gezeigt, dass der ELFA regelmäßig signifikant höhere Werte als der CLIA ermittelt (J. Uhlmann et al., 2016). Es wurde zudem in einer weiteren Vergleichsstudie untersucht, dass auch der POC ab einem Progesteronwert von $> 2,0\text{ng/ml}$ ungenaue Werte ausgibt (Zuercher et al., 2021b). Es wird daher in der Regel empfohlen, dass für die Interpretation von Progesteronmessergebnissen gerätespezifische Grenzwerte genutzt werden oder Umrechnungsformeln verwendet werden, um die Konzentrationen zu vereinheitlichen. Es ist fraglich, inwieweit diese Verfahren in der Praxis tatsächlich angewendet werden.

Hinsichtlich der Validität der Ergebnisse ist auch zu berücksichtigen, dass die präanalytische Handhabung der Probe nach Probenentnahme Einfluss auf die gemessenen Progesteronkonzentrationen haben kann (D. H. Volkmann, 2006).

Es ist bemerkenswert, dass trotz der inkonsistenten Definitionen in der Fachliteratur die Vaginalzytologie immer noch ein hohes Ansehen in der Kleintierreproduktionsmedizin genießt und zu den wichtigsten Untersuchungen der Zyklusdiagnostik zählt (Arlt 2018). Es ist anzunehmen, dass Ovulationszeitpunkte vielfach falsch diagnostiziert werden, was zu ausbleibenden Trächtigkeiten und damit zur Annahme einer vermeintlichen Unfruchtbarkeit eines Tieres führen kann.

Ziel der Arbeit war es, einen Beitrag dazu zu leisten, das Vorgehen bei den Untersuchungen zu verbessern und eine standardisierte, objektive Evaluation von Vaginalzellen zu gewährleisten und damit einheitlich und sicher Zyklusstadien zu diagnostizieren.

4.4 Die computergestützte Auswertung von Befunden in der Veterinärmedizin

In der Veterinärmedizin ist die computergestützte Auswertung von Befunden in einigen Bereichen mittlerweile praxistauglich: In der Parasitologie werden Algorithmen zur Erkennung und Evaluation von Parasiteneiern in Kotproben bereits kommerziell genutzt. Hier erreicht der Algorithmus Ergebnisse mit einem Pearson Korrelationskoeffizient von 0.83 bis 0.99 und kommt somit an die Leistung der Parasitolog*innen in der Studie heran (Nagamori et al., 2020). Die Sensitivität des Algorithmus liegt laut Studie bei 75,8 bis 100% und die Spezifität bei 93,1 bis 100%, je nach Parasitenart (Nagamori et al., 2021).

Bei der Diagnostik von Kardiomegalie beim Hund musste ein Algorithmus entscheiden, ob das Herz des Patienten einen pathologischen oder physiologischen VHS hat. Dabei erreichte der Algorithmus eine AUC Area under the curve (AUC) von $>0,9$, was für eine hohe Genauigkeit spricht (Burti et al., 2020).

Bei der Klassifizierung von Tuberkulose in Röntgenaufnahmen des Thorax erreichte der angewandte Algorithmus sogar eine AUC von $>0,99$ (Lakhani & Sundaram, 2017).

Die histologische Tumordiagnostik kann von Algorithmen übernommen werden und übertrifft im direkten Vergleich die Patholog*innen im Finden und Auswerten der mitotischen Figuren, die charakteristisch für die Malignität von Tumoren sind. Dabei erreichte der untersuchte Algorithmus bessere Ergebnisse als die Patholog*innen (Korrelationskoeffizient von 0,963 bis 0,979), was laut Autor*innen daran liegt, dass die Patholog*innen oftmals nicht den Bereich der höchsten Dichte an mitotischen Figuren im Tumor erkennen bzw. finden (Aubreville, Bertram, Marzahl, et al., 2020). Besonders hier lassen sich mögliche Parallelen zu den Vorteilen einer computergestützten Auswertung von Vaginalabstrichen ziehen: für den Menschen ist es oft kaum möglich einen ganzen Objektträger objektiv zu evaluieren, sei es aus Zeitdruck oder Konzentrationsverlust. Dies kann ein Algorithmus hingegen gewährleisten und dementsprechend vermutlich ebenso bessere Ergebnisse erzielen. Wie bei allen genannten Beispielen ist das Training des Algorithmus einer der wichtigsten Faktoren für zufriedenstellende Ergebnisse. Hier kann vermutet werden, dass die Varianz in der Darstellung einer Vaginalzelle, sowie ablenkende, irrelevante Strukturen um ein Vielfaches höher ist als die Darstellung einer röntgenologischen Thoraxaufnahme, Parasiteneier oder mitotischen Figuren. Dies könnte die bisher weniger guten Ergebnisse unseres Algorithmus im Vergleich zu den aufgeführten Beispielen erklären.

Einordnung der Ergebnisse dieses Projektes:

Ziel des Projektes war es, eine Möglichkeit zu entwickeln, Vaginalzellen auf dem Objektträger objektiver bestimmen zu lassen (Arlt, 2018; Reckers et al., 2022). Um dies zu ermöglichen, sollte für jeden Zelltyp ein CTSA erschaffen werden, auf Grundlage von gesammelten, annotierten und vermessen Vaginalzellen sowie Erythrozyten, neutrophilen Granulozyten und anderen auf dem Objektträger befindlichen Strukturen. Hierbei wurden für jeden Zelltyp Übereinstimmungen von über 96% erzielt (Siehe Additional Data). Limitierend für die Praxistauglichkeit ist allerdings derzeit, dass der Algorithmus noch nicht einheitlich Objektträger in einem Schritt auswerten kann. Vielmehr bestand der aktuelle Ansatz darin, dass für jeden Zelltyp ein eigener Algorithmus (CTSA) erstellt wurde, welcher unabhängig von weiteren Auswertungen des Objektträgers die präsentierten Zellen in „Richtig“ (der jeweilige

Zelltyp) und „Falsch“ (andere Strukturen) unterteilte. Auch wenn die Ergebnisse bisher als vielversprechend angesehen werden können, ist eine Praxistauglichkeit derzeit nicht gegeben.

Im Vergleich zu anderen Projekten zur computergestützten Auswertung von Zellen sind die Ergebnisse des vorgestellten Projekts noch ausbaufähig. Vor allem die Schollen hatten mit 82,75% eine relativ niedrige Übereinstimmung zwischen computergestützter und menschlicher Auswertung. Ein möglicher Grund dafür ist die schwierige Definition dieser Zellklasse. Während es nach der Definition von (Reckers et al., 2022) für jede Zellklasse klare, numerische Schwellenwerte gibt, ist dies bei den Schollen nicht der Fall. Dort heißt es: wenn die Zelle keinen, oder einen grade noch sichtbaren oder erodierten Nucleus aufweist, wird sie als Scholle definiert. Diese Definition lässt jedoch Platz für die subjektive Meinung der Untersucher*in, was ggf. die menschliche oder ggf. auch die computergestützte Erkennung erschweren könnte.

Dies hat zur Folge, dass manche vermeintliche Schollen den Superficialzellen zugeordnet werden und/ oder andersherum. Dies könnte den leicht erhöhten Wert der Abweichung der Übereinstimmung der Superficialzellen im ersten und zweiten Durchgang von 7,46% erklären. Inwieweit eine veränderte Definition Abhilfe schaffen kann, kann anhand des aktuellen Projektes nicht beantwortet werden. Aufgrund der biologischen Zellcharakteristika erscheint eine Definition, welche eine bessere Abgrenzung der beiden Zelltypen erlaubt, aus Sicht des Autors kaum möglich.

Die Abweichung der Übereinstimmung der Neutrophilen Granulozyten war mit 8,54% ebenfalls vergleichsweise hoch. Eine mögliche Ursache dafür könnte die hohe Tendenz zu Zellmembranschäden dieser Zellen sein. Durch spontane Membranschäden oder solche, die durch die Probennahme oder die weitere Bearbeitung entstehen, lassen sich geschädigte Zellen eventuell nicht mehr so genau darstellen wie unverletzte neutrophile Granulozyten. Trotzdem sollten die geschädigten Zellen mit in die Diagnostik einbezogen werden, da diese recht häufig vorkommen und damit praktische Relevanz haben.

Um die CTSA noch weiter zu überprüfen, wurden die nicht erkannten Zellen (NIC) aus dem „Test Set“ entnommen, und von FR visuell am Computer kontrolliert. Da in die „Test Sets“ nur Zellen aufgenommen wurden, die sich nach Einschätzung von FR eindeutig zuordnen ließen, war es von hohem Interesse zu ermitteln, welche Zellen die CTSA nicht erkannten, um mögliche Schlüsse daraus zu ziehen.

Der Großteil der von den CTSA nicht erkannten Zellen war nach FR eindeutig dem jeweiligen Zelltyp zuordenbar. Warum diese vom CTSA nicht erkannt wurden, kann nur gemutmaßt werden. Auffallend ist, dass bei allen Intermediärzellen andere Strukturen eng um die Zelle herum lagen. Zellgrenzen sind in einigen Fällen nicht deutlich erkennbar (siehe Abbildung).

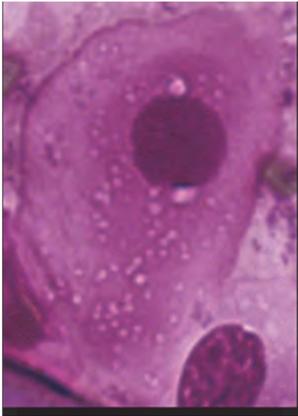


Abbildung 15: Die Grenzen der Intermediärzelle sind schwer zu erfassen.

Dies ist auch besonders bei den Parabasalzellen der Fall (siehe Abbildung). Jedoch muss auch erwähnt werden, dass dies auf einen Großteil der Parabasalzellen zutrifft. Warum nur diese 16 Zellen nicht erkannt wurden, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

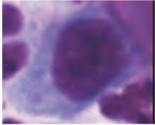


Abbildung 16: Auch die Parabasalzellen sind schwierig von umliegenden Strukturen abzugrenzen.

Aus dem „Test Set“ der Superficialzellen wurden 10 Zellen und 2 undefinierbare Strukturen nicht erkannt. Einige der Zellen weisen großflächigen Bakterienbewuchs auf. Andere überlappen sich ein wenig mit umliegenden Zellen. Diese beiden Fakten könnten eine Erklärung für das Nichterkennen des Algorithmus sein. Jedoch ist auch hier die Frage zu stellen, warum der Algorithmus die anderen Zellen aus dem „Test Set“ dann erkennen konnte. Denn die wenigsten Zellen werden komplett ohne Kontakt zu anderen Strukturen oder Bakterien vorkommen.

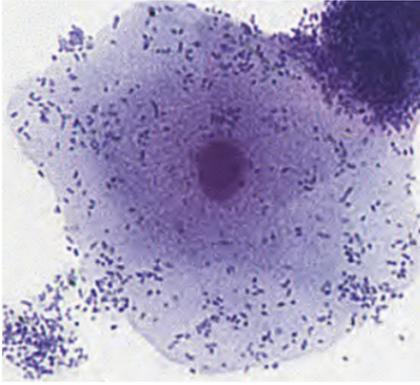


Abbildung 17: Superficialzelle, die vom Algorithmus nicht erkannt wurde. Sie ist mit Bakterien besiedelt und überlappt leicht eine andere Struktur.

Aus dem „Test Set“ der Schollen wurden 7 Zellen nicht erkannt. Auch hier wiesen einzelne Zellen eine Besiedelung durch zahlreiche Bakterien auf. Die meisten Zellen waren nach menschlichem Ermessen dennoch gut von anderen abgrenzbar, ohne Überlappungen.

Warum der CTSA diese Zellen nicht erkannte, kann derzeit nicht sicher beantwortet werden. Bei einigen Schollen war der Nucleus noch rudimentär zu erkennen

Daraus resultierte die Frage, ob die CTSA die nicht erkannten Zellen einer anderen Klasse zuordnen könnte die, im Sinne des CTSA, besser zu der jeweiligen Zelle passt. Um dies zu überprüfen, wurden die jeweiligen NIC in die CTSA der anderen Klassen eingespeist.

Die Ergebnisse sind im Additional Data Teil dieses Projektes beschrieben.

Auch beschädigte Zellen erschwerten die Erkennung durch die CTSA. Fraglich ist, ob diese bereits bei Entnahme beschädigt wurden oder bei Ausrollen auf dem Objektträger. Beim Scanvorgang der Abstriche aus zellarmen Stadien, wie Anöstrus oder früherer Proöstrus war das digitalisierte Bild oft unscharf und nicht auswertbar, da dem Scanner zu wenig Material zum Anfokusieren zur Verfügung stand.

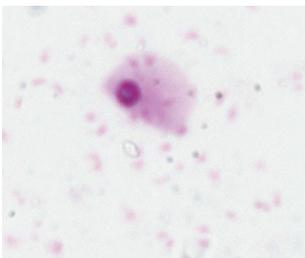


Abbildung 18: Unscharfe Zellen in zellarmen Zyklusstadien erschweren die Evaluation

In zellarmen Stadien könnte darüber nachgedacht werden, den Tupfer in mehreren Bahnen vertikal anstatt, wie üblich, in beispielsweise drei Bahnen horizontal auf dem Objektträger auszurollen, um mehr Zellmaterial aufzutragen und damit mehr Material für die Fokussierung zur Verfügung zu stellen.

Als größeres Problem stellte sich die typische „Zellhaufenbildung“ vor allem in den zellreichen Stadien, wie später Proöstrus und Östrus dar. Zellen konnten oft nicht mehr vollständig abgegrenzt werden. Auch der Algorithmus schien erhebliche Probleme mit überlappenden Zellen zu haben.

Ähnliche Schwierigkeiten bereitete die Tatsache, dass sich Vaginalzellen vermehrt falten oder umklappen, je größer sie werden. Superficialzellen und Schollen stellten sich somit oft nicht in ihrer ganzen Größe dar. Diese Problematiken erschwerten in den zellreichen Stadien erheblich die Evaluierung des Nucleus und der Keratinisierung für die Untersucher*in und die CTSA. Für weitere Projekte sollte somit darauf geachtet werden, dass Vaginalzellen möglichst nicht überlagernd auf den Objektträger aufgetragen werden. Auch könnten große Zellhaufen und starke gefaltete Zellen der Kategorie „Rubbish“ zugeordnet werden, sodass der Algorithmus davon abgehalten wird, diese zu erkennen.

Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass möglichst zeitnah nach der vaginalen Tupferentnahme das Deckgläschen auf den Abstrich aufgebracht wird. Vor allem im Frühjahr setzen sich sonst zu viele Pollen und Staub auf den Abstrich, die zu Artefakten in der Auswertung führen können.

Generell kann gemutmaßt werden, dass einige Zellen nicht erkannt wurden, weil Phänomene vorlagen, welche nicht in ausreichendem Maße bei den annotierten Zellen vorkamen. Daher erscheint es sinnvoll, dass nicht erkannte Zellen, welche sich nach menschlichem Ermessen eindeutig einem Zelltyp zuordnen lassen, ergänzend annotiert werden, um die Erkennungsrate der computergestützten Auswertung zu erhöhen.

Die in dem Projekt genutzten Abstriche waren Teil der routinemäßigen gynäkologischen Untersuchung von Hündinnen an der Freien Universität Berlin. Das bedeutet, es wurde immer ein Spekulum zur Entnahme genutzt. Der Tupfer war bei jeder Entnahme vom gleichen Hersteller und wurde vor der Entnahme befeuchtet. Das Ausrollen des Tupfers wurde nach dem gleichen, oben beschriebenen Schema durchgeführt. Die Färbung wurde nach Herstellervorgaben durchgeführt. Somit wurden die Abstriche bewusst nach den soweit bekannten und bestehenden Prinzipien angefertigt.

Jedoch muss erwähnt werden, dass die Abstriche zu verschiedenen Uhr- und Tageszeiten und von verschiedenen Tierärzt*innen genommen wurden. Das sich daraus intra- und interindividuelle Unterschiede aufgrund von Stress, Ablenkung oder Ähnlichem ergeben, ist

nicht ausgeschlossen. Dauer und Druck des Abstreichens der Vaginalschleimhaut können sich zwischen den Tierärzt*innen unterscheiden.

Auch das händische Färben der Objektträger, sowie das Alter der Farblösung könnte zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Standardisierungen der Färbungen wären daher vermutlich vorteilhaft, beispielsweise durch Objektträger, die den Farbstoff bereits auf der Oberfläche tragen (beispielsweise Testsimplets, Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Germany).

Ob eine standardisierte Entnahme, Färbung, und Eindeckelung der Abstriche exaktere Ergebnisse geliefert hätte, bleibt unklar und sollte in weiteren Studien ermittelt werden.

4.5 Ausblick

Bis auf weiteres werden Vaginalabstriche voraussichtlich weiterhin durch entsprechend ausgebildete Untersuchende ausgewertet und interpretiert. Die Vaginalzelldefinitionen von (Reckers et al., 2022) können dabei ein nützliches Tool sein. Jedoch muss auch hier gesagt werden, dass die Messungen von Zell-, und Nucleusdurchmesser im Mikrometerbereich wahrscheinlich keine Praxisrelevanz aufweisen wird und eher als Anhaltspunkte verstanden werden sollten.

Ob Vaginalzytologien in Zukunft erfolgreich durch künstliche Intelligenz ausgewertet werden können, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen. Jedoch lässt sich durch die derzeitige, rasante Entwicklung von Rechnerleistungen, Software und Hardware vermuten, dass die technischen Möglichkeiten in Zukunft noch besser werden, um oben genannte Problematiken effizienter lösen zu können. Die Kombination eines Mikroskops mit einer ausgereifteren Software auf Basis des Tutorials von (Reckers et al., 2022) könnte eine Möglichkeit sein, die Vaginalzytologie standardisiert und praxistauglich auswerten zu können. Von hohem Interesse wäre nach Evaluation aller Zellen auf dem Objektträger, ob die exfoliative Vaginalzytologie als valides Verfahren zur Bestimmung der Ovulation und des genauen Beginns bzw. Ende des jeweiligen Zyklusstadium nutzbar ist. Die Progesteronkonzentration und das vaginale Zellbild ließen sich objektiv am vermeintlichen Ovulationszeitpunkt vergleichen.

4.6 Fazit

Die vorgelegte Arbeit zeigt auf, dass eine computergestützte Auswertung von Vaginalzellen der Hündin generell möglich ist und zu hohen Übereinstimmungen mit der herkömmlichen Zellanalyse führen kann. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Nutzung von Algorithmen in der Veterinärmedizin die Arbeit für Tierärzt*innen deutlich erleichtern und in manchen Fällen sogar ersetzen kann. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint der von uns gewählte

Ansatz von künstlicher Intelligenz noch nicht ausgereift genug zu sein, um bei der Auswertung von Vaginalabstrichen in naher Zukunft Praxisrelevanz zu erreichen. Das hat unterschiedliche Gründe: Für die Zelldatenbank mussten große Mengen an Vaginalzellen evaluiert, definiert und markiert werden. Die erhebliche Diversität im Erscheinungsbild der Vaginalzellen stellten die Algorithmen vor große Herausforderungen.

5 Zusammenfassung

Die exfoliative Vaginalzytologie ist ein häufig verwendetes Mittel zur Bestimmung des Sexualzyklus bei der Hündin. Jedoch erweist sich die Interpretation der Abstriche oft als schwierig. Ursachen dafür sind die subjektive, ungenaue Evaluation der Zellen durch die Tierärzt*innen, unter anderem verursacht durch nicht eindeutige Definitionen der Fachliteratur. Um jede Zelle eindeutig bestimmen zu können, haben Reckers et.al ein Tutorial für die Evaluation von Vaginalzellen entwickelt. Dieses Tutorial stellt die Basis für die Entwicklung von Zelltyp- spezifischen Algorithmen dar, die Vaginalzellen erkennen und zuordnen sollen. Die Algorithmen konnten einen Großteil der präsentierten Vaginalzellen erkennen. Jedoch konnten sie nur zwischen dem Zelltyp und anderen Strukturen entscheiden. Eine selbstständige Einordnung der Vaginalzellen zu einem Zelltyp durch einen zelltypübergreifenden Algorithmus war nicht möglich.

Das hier beschriebene Projekt wird aller Voraussicht nach keine Praxisrelevanz erreichen, es kann jedoch als erster Schritt für eine autonome Auswertung von Vaginalzytologien durch künstliche Intelligenz gesehen werden.

6 Summary

Conventional and computer-assisted evaluation of vaginal smears in bitches

Exfoliative vaginal cytology is a tool often used for the determination of the sexual cycle in female dogs. However, the interpretation of the smears often proves to be difficult. This is due to the subjective, imprecise evaluation of the cells by the veterinarians, caused among other things by ambiguous definitions in the specialist literature. Reckers et al. developed a tutorial for the evaluation of vaginal cells in order to be able to clearly identify each cell. This tutorial forms the basis for the development of cell type-specific algorithms to recognize and assign vaginal cells. The algorithms were able to recognize the majority of the vaginal cells presented. However, they only were able to decide between cell type and other structures. It has not been possible to independently classify the vaginal cells into a cell type using a cross-cell type algorithm.

The project described here is unlikely to achieve practical relevance, but it can be seen as a first step towards the autonomous evaluation of vaginal cytologies by artificial intelligence.

7 Literaturverzeichnis

- Ajala, O. O., Fayemi, O., & Oyeyemi, M. (2012). The oestrous cycle of the Nigerian local bitch. *Global veterinaria*, 8(6), 574-582.
- Albers-Wolthers, K. H., de Gier, J., Kooistra, H. S., Rutten, V. P., van Kooten, P. J., de Graaf, J. J., Leegwater, P. A., Millar, R. P., & Schaefers-Okkens, A. C. (2014). Identification of a novel kisspeptin with high gonadotrophin stimulatory activity in the dog. *Neuroendocrinology*, 99(3-4), 178-189. <https://doi.org/10.1159/000364877>
- Antonov, A. (2016). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20, 193-203. <https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Appleby, R. B., & Basran, P. S. (2022). Artificial intelligence in veterinary medicine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 260(8), 819-824. <https://doi.org/10.2460/javma.22.03.0093>
- Arlt, S. (2018). Canine ovulation timing: A survey on methodology and an assessment on reliability of vaginal cytology. *Reproduction in Domestic Animals*, 53 Suppl 3, 53-62. <https://doi.org/10.1111/rda.13352>
- Arlt, S., Rohne, J., Ebert, A., & Heuwieser, W. (2012). Endoscopic resection of a vaginal septum in a bitch and observation of septa in two related bitches. *New Zealand Veterinary Journal*, 60(4), 258-260.
- Aubreville, M., Bertram, C. A., Donovan, T. A., Marzahl, C., Maier, A., & Klopfleisch, R. (2020). A completely annotated whole slide image dataset of canine breast cancer to aid human breast cancer research. *Scientific Data*, 7(1), 417. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00756-z>
- Aubreville, M., Bertram, C. A., Marzahl, C., Gurtner, C., Dettwiler, M., Schmidt, A., Bartenschlager, F., Merz, S., Fragoso, M., & Kershaw, O. (2020). Deep learning algorithms out-perform veterinary pathologists in detecting the mitotically most active tumor region. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Automotive Industry Action Group (AIAG). (2010). Measurement Systems Analysis Reference Manual. In Chrysler & G. M. C. Ford Motor Company (Eds.), (Vol. 4th edition).
- Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T., & Dinc, D. (2011). Determination of the Stages of the Sexual Cycle of the Bitch by Direct Examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1962-1967. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1962.1967>
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Barstow, C., Wilborn, R. R., & Johnson, A. K. (2018). Breeding Soundness Examination of the Bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 48(4), 547-566. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.004>
- Basu, S., Mishra, R., Bandyopadhyay, S., & De, D. Vaginal Cytology In Different Phases Of Estrus Cycle In Bitch. *Indian Journal of Canine Practice Volume*, 3(1), 29.
- Bayram, G. K., Liman, N., Beyaz, F., & Emel, A. (2018). The immunohistochemical localization of the fibronectin receptor (Integrin β 1) and laminin in the bitch uterus during the estrous cycle. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(4), 357-364.

- Beijerink, N., Buijtel, J., Okkens, A., Kooistra, H., & Dieleman, S. (2007). Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrous versus ovariectomized bitches. *Theriogenology*, *67*(5), 1039-1045.
- Beijerink, N. J., Kooistra, H. S., Dieleman, S. J., & Okkens, A. C. (2004). Serotonin antagonist-induced lowering of prolactin secretion does not affect the pattern of pulsatile secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in the bitch. *REPRODUCTION*, *128*(2), 181-188. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00117>
- Bergeron, L., Nykamp, S., Brisson, B., Madan, P., Sears, W., & Gartley, C. (2014). Vaginal impedometry for detection of optimal breeding time in bitches. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *245*, 1360-1366. <https://doi.org/10.2460/javma.245.12.1360>
- Bergeron, L. H., Nykamp, S. G., Brisson, B. A., Madan, P., & Gartley, C. J. (2013). An evaluation of B-mode and color Doppler ultrasonography for detecting periovulatory events in the bitch. *Theriogenology*, *79*(2), 274-283.
- Bertram, C. A., Aubreville, M., Gurtner, C., Bartel, A., Corner, S. M., Dettwiler, M., Kershaw, O., Noland, E. L., Schmidt, A., Sledge, D. G., Smedley, R. C., Thaiwong, T., Kiupel, M., Maier, A., & Klopfleisch, R. (2020). Computerized Calculation of Mitotic Count Distribution in Canine Cutaneous Mast Cell Tumor Sections: Mitotic Count Is Area Dependent. *Veterinary Pathology*, *57*(2), 214-226. <https://doi.org/10.1177/0300985819890686>
- Bertram, C. A., & Klopfleisch, R. (2017). The Pathologist 2.0: An Update on Digital Pathology in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, *54*(5), 756-766. <https://doi.org/10.1177/0300985817709888>
- Bertram, C. A., Stathonikos, N., Donovan, T. A., Bartel, A., Fuchs-Baumgartinger, A., Lipnik, K., van Diest, P. J., Bonsembiante, F., & Klopfleisch, R. (2021). Validation of digital microscopy: Review of validation methods and sources of bias. *Veterinary Pathology*, *03009858211040476*. <https://doi.org/10.1177/03009858211040476>
- Bjurström, L. (1993). Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *34*, 29-34.
- Bonicelli, L., Trachtman, A. R., Rosamilia, A., Liuzzo, G., Hattab, J., Mira Alcaraz, E., Del Negro, E., Vincenzi, S., Capobianco Dondona, A., Calderara, S., & Marruchella, G. (2021). Training Convolutional Neural Networks to Score Pneumonia in Slaughtered Pigs. *Animals*, *11*(11), 3290. <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3290>
- Bostedt, H. (2016). Exfoliative Vaginalzytologie und Uteruszytologie. In A. R. Günzel-Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 20-27). Schattauer Verlag. <https://books.google.de/books?id=Kk4EDAAAQBAJ>
- Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., & Bierschwal, C. J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone. *Theriogenology*, *35*(3), 603-611. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90456-n](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90456-n)
- BRODZKI, P., WOLNIACZYK, K., GŁODKOWSKA, K., & BRODZKI, N. (2023). Tumors of the reproductive system of bitches—based on the description of selected own clinical cases and literature data. *Med. Weter*, *79*(7), 334-344.
- Buchanan, J. W., & Bücheler, J. (1995). Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *Journal-American Veterinary Medical Association*, *206*, 194-194.
- Bunck, C., & Günzel- Apel, A.-R. (2016). Zyklusdiagnostik. In A.-R. Günzel- Apel & H. Bostedt (Eds.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 35-48). Schattauer.

- Burti, S., Longhin Osti, V., Zotti, A., & Banzato, T. (2020). Use of deep learning to detect cardiomegaly on thoracic radiographs in dogs. *The Veterinary Journal*, 262, 105505. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105505>
- Butinar, J., Mujagić, E., & Galac, S. (2004). The oestrus cycle in the bitch: a review article. *Slov Vet Res*, 41(1), 5-11.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLOS ONE*, 7(4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Calloway, C. D., Tyler, J. W., Tessman, R. K., Hostetler, D., & Holle, J. (2002). Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(11), 1605-1608.
- Cardilli, D. J., Sousa-Oliveira, K., Franchi-João, C., Azevedo-Voorwald, F., Machado-Silva, M. A., Oliveira, J. A., Sánchez-Calabuig, M. J., Sánchez-Calabuig, M. J., Toniollo, G. H., & Pérez-Gutiérrez, J. F. (2021). "Immunolocalization and effect of low concentrations of Insulin like growth factor-1 (IGF-1) in the canine ovary". *Veterinary medicine and science*, 7(1), 46-56. <https://doi.org/10.1002/vms3.347>
- Carlsson, I. B., Scott, J. E., Visser, J. A., Ritvos, O., Themmen, A. P., & Hovatta, O. (2006). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Hum Reprod*, 21(9), 2223-2227. <https://doi.org/10.1093/humrep/del165>
- Chernesky, M. A., Hook, E. W. I., Martin, D. H., Lane, J., Johnson, R., Jordan, J. A., Fuller, D., Willis, D. E., Fine, P. M., Janda, W. M., & Schachter, J. (2005). Women Find It Easy and Prefer to Collect Their Own Vaginal Swabs to Diagnose Chlamydia trachomatis or Neisseria gonorrhoeae Infections. *Sexually Transmitted Diseases*, 32(12), 729-733. <https://doi.org/10.1097/01.olq.0000190057.61633.8d>
- Christie, D. W., Bailey, J. B., & Bell, E. T. (1972). Classification of cell types in vaginal smears during the canine oestrous cycle. *British Veterinary Journal*, 128(6), 301-310. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)36935-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)36935-x)
- Concannon, P. (2009). Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(s2), 3-15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01414.x>
- Concannon, P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Animal Reproduction Science*, 124(3), 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.028>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Davidson, A. (2006). Current concepts on infertility in the bitch. *Waltham Focus*, 16(2), 13-21.
- Davidson, P. A. (2015). Determining Canine Estrus Stage via Vaginal Cytology. *Clinician's Brief*, 13, 19-21. <https://www.cliniciansbrief.com/article/determining-canine-estrus-stage-vaginal-cytology>
- de Gier, J., Kooistra, H. S., Djajadiningrat-Laanen, S. C., Dieleman, S. J., & Okkens, A. C. (2006). Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, 65(7), 1346-1359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.010>
- Dedes, I. (2012). Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(3), 121-128. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.651555>

- Diamantis, A., & Androutsos, G. (2008). Highlights from the history of hormonal cytology. *Hormones*, 7(2), 184-186.
- Diamantis, A., & Magiorkinis, E. (2014). Pioneers of exfoliative cytology in the 19th century: The predecessors of George Papanicolaou. *Cytopathology*, 25(4), 215-224.
- Doak, R., Hall, A., & Dale, H. (1967). Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *REPRODUCTION*, 13(1), 51-58.
- Dore, M. A. (1978). A Classification of Exfoliative Cell Types in the Vaginal Smear of the Bitch. *Irish Veterinary Journal*, 32(182-185).
- Dreier, H. K. (2010). *Klinik der Reproduktionsmedizin des Hundes*. Schlütersche Verlag. <https://books.google.de/books?id=GZrvwAEACAAJ>
- Dreimanis, U., Vargmar, K., Falk, T., Cigut, M., & Toresson, L. (2012). Evaluation of preputial cytology in diagnosing oestrogen producing testicular tumours in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 53(9), 536-541. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01261.x>
- Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., & Curry, T. E. (2019). Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocr Rev*, 40(2), 369-416. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00075>
- Dunn, J. E., Jr., & Sprunt, D. H. (1955). Uterine cancer case finding by vaginal cytology, Memphis and Shelby County, Tennessee. *Public Health Rep (1896)*, 70(4), 341-346.
- Dzięcioł, M., Nizański, W., Jezierski, T., Szumny, A., Godzińska, E., Ochota, M., Stańczyk, E., Najder-Kozdrowska, L., Woszczyło, M., & Pieczewska, B. (2017). The efficiency of synthetic sex pheromones in sexual arousal stimulation in domestic dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 429-437-429-437.
- Ekambaram, G., Sampath Kumar, S. K., & Joseph, L. D. (2017). Comparative Study on the Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method. *J Clin Diagn Res*, 11(1), Ac05-ac07. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/23977.9148>
- Eker, K., & Salmanoğlu, M. R. (2006). Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and corpora lutea formation in a bitch. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30(6), 589-592.
- England, G., & Concannon, P. W. (2002). Determination of the Optimal Breeding Time in the Bitch: Basic Considerations. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*.
- England, G. C. W., Rijsselaere, T., Campbell, A., Moxon, R., & Freeman, S. L. (2021). Normal and abnormal response to sperm deposition in female dogs: A review and new hypotheses for endometritis. *Theriogenology*, 159, 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.013>
- Esteva, A., Kuprel, B., Novoa, R. A., Ko, J., Swetter, S. M., Blau, H. M., & Thrun, S. (2017). Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, 542(7639), 115-118. <https://doi.org/10.1038/nature21056>
- Fáy, J., Mezö, T., Solti, L., Wölfling, A., & Abonyi-Tóth, Z. (2003). Comparison of different methods used for oestrus examination in the bitch. *Acta veterinaria Hungarica*, 51, 385-394. <https://doi.org/10.1556/AVet.51.2003.3.12>
- Findlay, J. (1986). The nature of inhibin and its use in the regulation of fertility and diagnosis of infertility. *Fertil Steril*, 46(5), 770-783. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)49810-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)49810-9)
- Flatland, B., Freeman, K. P., Vap, L. M., & Harr, K. E. (2013). ASVCP guidelines: quality assurance for point-of-care testing in veterinary medicine. *Veterinary clinical pathology*, 42(4), 405-423.

- Flückiger, M. (2007). How to take and read hip joint radiographs in a structured way. *Eur. J. Comp. Anim. Pract*, 17(2), 133-134.
- Flückiger, M. (2007). Scoring radiographs for canine hip dysplasia-The big three organisations in the world. *European Journal of Companion Animal Practice*, 17(2), 135-140.
- Fontbonne, A. (2020). Small animal reproduction: Scientific facts versus dogmas or unverified beliefs. *Theriogenology*, 150, 464-470. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.014>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Fung, C., Ortolani, J. M., & Greenberg, M. J. (2019). Clitoral cyst in a bitch. *Clinical case reports*, 7(12), 2358-2362. Retrieved 2019/12//, from <http://europepmc.org/abstract/MED/31893058>
<https://doi.org/10.1002/ccr3.2498>
<https://europepmc.org/articles/PMC6935615>
<https://europepmc.org/articles/PMC6935615?pdf=render>
- Gerber, K. L., & Freeman, K. P. (2016). ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Veterinary clinical pathology*, 45(1), 10-27.
- Golińska, E., Sowińska, N., Tomusiak-Plebanek, A., Szydło, M., Witka, N., Lenarczyk, J., & Strus, M. (2021). The vaginal microflora changes in various stages of the estrous cycle of healthy female dogs and the ones with genital tract infections. *BMC veterinary research*, 17(1), 8-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02710-y>
- Goodman, M. (2001). Ovulation Timing: Concepts and Controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31(2), 219-235. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)50201-6](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)50201-6)
- Groppetti, D., Pecile, A., Barbero, C., & Martino, P. A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology*, 77(8), 1549-1556. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.022>
- Guglielmini, C., Diana, A., Pietra, M., Di Tommaso, M., & Cipone, M. (2009). Use of the vertebral heart score in coughing dogs with chronic degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(1), 9-13.
- Günzel Apel, A. R. (2016). Neuroendokrine Steuerung des Zyklus. In A. R. B. Günzel Apel, H. (Ed.), *Reproduktionsmedizin und Neonatologie von Hund und Katze* (pp. 10-12). Schattauer Verlag.
- Gupta, A., Dhami, A., & Ghodasra, D. (2012). Exfoliative vaginal cytology: An effective tool to know the reproductive status of the bitch. *Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*, 8(1), 61-64.
- Gurler, H., Koldas, E., Onyay, F., & Akcay, A. (2018). Efficiency of vaginal electrical impedance to determine the stage of the reproductive cycle in bitches. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA-VETERINARY MEDICINE-SCIENCE AND PRACTICE*, 74(3).
- Haenssle, H. A., Fink, C., Schneiderbauer, R., Toberer, F., Buhl, T., Blum, A., Kalloo, A., Hassen, A. B. H., Thomas, L., Enk, A., & Uhlmann, L. (2018). Man against machine: diagnostic performance of a deep learning convolutional neural network for dermoscopic melanoma recognition in comparison to 58 dermatologists. *Annals of Oncology*, 29(8), 1836-1842. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy166>
- Hajdu, S. I., & Ehya, H. (2008). Foundation of diagnostic cytology. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 38(3), 296-299.

- Haji, M., Ahmed, F., Lalrintluanga, K., Talukdar, D., Doley, P., Behera, S., & Sarma, K. (2018). The role of estrogen and progesterone hormone on vaginal cytology in bitch. *Int J Livest Res*, 8(9), 241-247.
- Hamouzova, P., Cizek, P., Bartoskova, A., & Novotny, R. (2020). Different fixative solutions in the detection of mast cells in the canine and feline reproductive organs. *Folia Morphologica*, 79(2), 265-271.
- Hase, M., Hori, T., Kawakami, E., & Tsutsui, T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J Vet Med Sci*, 62(3), 243-248. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.243>
- Hesser, A., Darr, C., Gonzales, K., Power, H., Scanlan, T., Thompson, J., Love, C., Christensen, B., & Meyers, S. (2017). Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility. *Theriogenology*, 87, 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.012>
- Hewitt, D., & England, G. (2000). Assessment of optimal mating time in the bitch. *In Practice*, 22(1), 24-33. <https://doi.org/10.1136/inpract.22.1.24>
- Hoffmann, B., Höveler, R., Hasan, S. H., & Failing, K. (1992). Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. *J Reprod Fertil*, 96(2), 837-845. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960837>
- Ichikawa, H., & Koketsu, Y. (2012). Standard operating procedures for sows and piglets in farrowing and lactation in Japanese commercial herds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(11), 1423-1428.
- Igna, C., Bumb, D., Proteasa, A., Dascalu, R., Schuszler, L., Igna, V., & Brezovan, D. (2016). Subtotal vaginectomy as a treatment for vaginal tumours in two bitches. *Bull. UASVM Vet. Med*, 73(6).
- Jöchle, W., & Andersen, A. C. (1977). The estrous cycle in the dog: A review. *Theriogenology*, 7(3), 113-140. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(77\)90240-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(77)90240-0)
- Johnson, A. K. (2022). Normal feline reproduction: The queen. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(3), 204-211.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001a). The Canine Estrous Cycle. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 16-31). Saunders.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V. R., & Olson, P. N. S. (2001b). Vaginal Cytology. In S. D. Johnston, M. V. R. Kustritz, & P. N. S. Olson (Eds.), *Canine and Feline Theriogenology* (pp. 32-40). Saunders <https://books.google.de/books?id=boRUZ8V-D3YC>
- Kanca, H., Karakas, K., Dalgic, M., Salar, S., & Izzur, H. (2014). Vaginal cytology after induction of ovulation in the queen: comparison of postoestrus and dioestrus. *Australian veterinary journal*, 92(3), 65-70.
- Kanda, S. (2019). Evolution of the regulatory mechanisms for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in vertebrates—hypothesis from a comparative view. *General and Comparative Endocrinology*, 284, 113075. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.11.014>
- Kim, S.-J. (2019). The Chronic and Unpredictable Stress Suppressed Kisspeptin Expression during Ovarian Cycle in Mice. *J Anim Reprod Biotechnol*, 34(1), 40-49. <https://doi.org/10.12750/JARB.34.1.40>
- Klever, J., Brühshwein, A., Wagner, S., Reese, S., & Meyer-Lindenberg, A. (2020). Comparison of Reliability of Norberg Angle and Distraction Index as Measurements for Hip Laxity in Dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 33(04), 274-278.

- König, H. E., Plendl, J., & Liebich, H.-G. (2015). Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina). In H. E. König & H.-G. Liebich (Eds.), *Anatomie der Haussäugetiere* (pp. 425-446). Schattauer.
- König, H. E. P., J., & Liebich, H.-G. (2015). Weibliche Geschlechtsorgane (Organa genitalia feminina). In H. E. König & H.-G. Liebich (Eds.), *Anatomie der Haussäugetiere* (pp. 425-446). Schattauer.
- Kowalewski, M. P. (2014). Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. *Reprod Biol*, 14(2), 89-102. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.11.004>
- Kowalewski, M. P. (2018). Selected Comparative Aspects of Canine Female Reproductive Physiology. In M. K. Skinner (Ed.), *Encyclopedia of Reproduction* (Vol. 2, pp. 682-691). Elsevier Inc.
- Kowalewski, M. P., Michel, E., Gram, A., Boos, A., Guscetti, F., Hoffmann, B., Aslan, S., & Reichler, I. (2011). Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 109. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-109>
- Kustritz, M. V. R. (2006). Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. *Theriogenology*, 66(3), 567-574. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.003>
- Kutzler, M. A. (2005). Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64(3), 747-754. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.023>
- Kutzler, M. A., Mohammed, H. O., Lamb, S. V., & Meyers-Wallen, V. N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology*, 60(6), 1187-1196. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(03)00109-2)
- Lakhani, P., & Sundaram, B. (2017). Deep Learning at Chest Radiography: Automated Classification of Pulmonary Tuberculosis by Using Convolutional Neural Networks. *Radiology*, 284(2), 574-582. <https://doi.org/10.1148/radiol.2017162326>
- Lamb, C., Wikeley, H., Boswood, A., & Pfeiffer, D. (2001). Use of breed-specific ranges for the vertebral heart scale as an aid to the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *Veterinary Record*, 148(23), 707-711.
- Lei, Y.-M., Yin, M., Yu, M.-H., Yu, J., Zeng, S.-E., Lv, W.-Z., Li, J., Ye, H.-R., Cui, X.-W., & Dietrich, C. F. (2021). Artificial Intelligence in Medical Imaging of the Breast [Review]. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.600557>
- Leigh, O., Raji, L., & Diakodue, E. (2013). Detection of Standing Heat In Bitches: Application of Vaginal Cytology. *World Journal of Life Science and Medical Research*, 3, 21.
- Leiser, R. (2004). Weibliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia feminina. In R. Nickel, A. Schummer, & E. Seiferle (Eds.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* (Vol. 2, pp. 393-439). Parey Verlag.
- Lents, C. A., Heidorn, N. L., Barb, C. R., & Ford, J. J. (2008). Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *REPRODUCTION*, 135(6), 879-887. <https://doi.org/10.1530/rep-07-0502>
- Lévy, X. (2016). Videovaginoscopy of the canine vagina. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(S1), 31-36. <https://doi.org/10.1111/rda.12785>
- Lévy, X., & Fontbonne, A. (2007). Determining the optimal time of mating in bitches: particularities. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(1), 128-134.
- Li, S., Wang, Z., Visser, L. C., Wisner, E. R., & Cheng, H. (2020). Pilot study: Application of artificial intelligence for detecting left atrial enlargement on canine thoracic radiographs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 61(6), 611-618. <https://doi.org/10.1111/vru.12901>

- Linde, C., & Karlsson, I. (1984). The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *Journal of Small Animal Practice*, 25(2), 77-82.
<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1984.tb00449.x>
- Lindh, L., Kowalewski, M. P., Günzel-Apel, A. R., Goericke-Pesch, S., Myllys, V., Schuler, G., Dahlbom, M., Lindeberg, H., & Peltoniemi, O. A. T. (2022). Ovarian and uterine changes during the oestrous cycle in female dogs. *Reprod Fertil Dev*. <https://doi.org/10.1071/rd22177>
- Litster, A. L., & Buchanan, J. W. (2000). Vertebral scale system to measure heart size in radiographs of cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(2), 210-214.
- Liu, X., Faes, L., Kale, A. U., Wagner, S. K., Fu, D. J., Bruynseels, A., Mahendiran, T., Moraes, G., Shamdas, M., Kern, C., Ledsam, J. R., Schmid, M. K., Balaskas, K., Topol, E. J., Bachmann, L. M., Keane, P. A., & Denniston, A. K. (2019). A comparison of deep learning performance against health-care professionals in detecting diseases from medical imaging: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Digital Health*, 1(6), e271-e297.
[https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(19\)30123-2](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(19)30123-2)
- Lyman, C. C., Holyoak, G. R., Meinkoth, K., Wieneke, X., Chillemi, K. A., & DeSilva, U. (2019). Canine endometrial and vaginal microbiomes reveal distinct and complex ecosystems. *PLOS ONE*, 14(1), e0210157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210157>
- Mar, V. J., & Soyer, H. P. (2018). Artificial intelligence for melanoma diagnosis: how can we deliver on the promise? *Annals of Oncology*, 29(8), 1625-1628.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy193>
- Marinho, G., De Jesus, V., Palhano, H., & Abidu-Figueiredo, M. (2017). Pyocolpos in a Pinscher bitch: a case report. *Journal of Morphological Sciences*, 30(3), 0-0.
- Meghasree, C., Sudha, G., Darshan, C., Ravindranath, B., Navya, M., & Becha, B. (2019). Vaginal exfoliative cytology, serum progesterone and vaginoscopy for breeding management in bitches. *Indian Journal of Canine Practice*, 11(1), 31-34.
- Mills, J. N., Valli, V. E., & Lumsden, J. H. (1979). Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *Can Vet J*, 20(4), 95-101.
- Mingoas, J. K., & Ngayam, L. L. (2009). Preliminary findings on vaginal epithelial cells and body temperature changes during oestrous cycle in Bororo zebu cow. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(1).
- Mori, I. (2017). Glass slide preparation and digital pathology. *Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 7(6), 27. <https://doi.org/10.4172/2161-0681-C1-043>
- Moxon, R., Batty, H., Irons, G., & England, G. C. W. (2012). Periovarian changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology*, 78(9), 1907-1916. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.002>
- Moxon, R., Copley, D., & England, G. C. (2010). Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology*, 74(3), 479-485.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.031>
- Nagamori, Y., Hall Sedlak, R., DeRosa, A., Pullins, A., Cree, T., Loenser, M., Larson, B. S., Smith, R. B., & Goldstein, R. (2020). Evaluation of the VETSCAN IMAGYST: an in-clinic canine and feline fecal parasite detection system integrated with a deep learning algorithm. *Parasites & Vectors*, 13(1), 346. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04215-x>

- Nagamori, Y., Sedlak, R. H., DeRosa, A., Pullins, A., Cree, T., Loenser, M., Larson, B. S., Smith, R. B., Penn, C., & Goldstein, R. (2021). Further evaluation and validation of the VETSCAN IMAGYST: in-clinic feline and canine fecal parasite detection system integrated with a deep learning algorithm. *Parasites & Vectors*, *14*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04591-y>
- Nett, T. M., Akbar, A. M., Phemister, R. D., Holst, P. A., Reichert, L. E., & Niswender, G. D. (1975). Levels of Luteinizing Hormone, Estradiol and Progesterone in Serum During the Estrous Cycle and Pregnancy in the Beagle Bitch. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *148*(1), 134-139. <https://doi.org/10.3181/00379727-148-38491>
- Nöthling, J. O., Joonè, C. J., Hegarty, E., Schooley, E. K., & De Cramer, K. G. M. (2022). Use of a Point-of-Care Progesterone Assay to Predict Onset of Parturition in the Bitch. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 914659. Retrieved 2022, from <http://europepmc.org/abstract/MED/35812850>
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.914659>
<https://europepmc.org/articles/PMC9260388>
<https://europepmc.org/articles/PMC9260388?pdf=render>
- Okkens, A. (1994). Infertility in the bitch. *Veterinary Quarterly*, *16*(sup1), 17-18.
- Okkens, A., & Kooistra, H. (2006). Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reproduction in Domestic Animals*, *41*(4), 291-296.
- Ola, S. I., Sanni, W. A., & Egbunike, G. (2006). Exfoliative vaginal cytology during the oestrous cycle of West African dwarf goats. *Reprod Nutr Dev*, *46*(1), 87-95. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005067>
- Olson, P., Thrall, M., Wykas, P., Nett, T., & Sawyer, H. (1984). Vaginal cytology part I A useful tool for staging canine oestrus cycle. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian*, *6*(4), 288-297.
- Olson, P. N., Bowen, R. A., Behrendt, M. D., Olson, J. D., & Nett, T. M. (1982). Concentrations of Reproductive Hormones in Canine Serum Throughout Late Anestrus, Proestrus and Estrus1. *Biology of Reproduction*, *27*(5), 1196-1206. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.5.1196>
- Oxtoby, C., Ferguson, E., White, K., & Mossop, L. (2015). We need to talk about error: causes and types of error in veterinary practice. *Veterinary Record*, *177*(17), 438-438.
- Papa, P. C., & Kowalewski, M. P. (2020). Factors affecting the fate of the canine corpus luteum: Potential contributors to pregnancy and non-pregnancy. *Theriogenology*, *150*, 339-346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.081>
- Pérez, C. C., Rodríguez, I., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2005). Use of ultrafast Papanicolaou stain for exfoliative vaginal cytology in bitches. *Veterinary Record*, *156*(20), 648-650. <https://doi.org/10.1136/vr.156.20.648>
- Pertiwi, A., Tumbelaka, L., & Dramaga, J. A. K. I. (2018). Ultrasonographic and vaginal cytological diagnostics of the Queen.
- Phemister, R. D., Holst, P. A., Spano, J. S., & Lloyd Hopwood, M. (1973). Time of ovulation in the beagle bitch. *Biology of Reproduction*, *8*(1), 74-82.
- Post, K. (1985). Canine Vaginal Cytology During the Estrus Cycle. *Canadian Veterinary Journal*, *26*, 101-104.
- Reckers, F., Klopffleisch, R., Belik, V., & Arlt, S. (2022). Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.834031>

- Reddy, K., Raju, K., Rao, K., & Rao, K. (2011). Vaginal cytology, vaginoscopy and progesterone profile: breeding tools in bitches. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 25(2), 51-54.
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Van Cruchten, S., Coryn, M., Görtz, K., Maes, D., & de Kruif, A. (2004). Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *REPRODUCTION*, 128(6), 801-811.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00273>
- Romagnoli, S. (2014). Canine breeding management—optimising fertility in bitches.
- Romagnoli, S. (2017). Top 5 Reproduction Concerns in Dogs. *Clinician's Brief*, 15(1), 82-88.
<https://www.cliniciansbrief.com/article/top-5-reproduction-concerns-dogs>
- Romagnoli, S., & Lopate, C. (2014). Transcervical Artificial Insemination in Dogs and Cats: Review of the Technique and Practical Aspects. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 56-63.
<https://doi.org/10.1111/rda.12395>
- Root Kustritz, M. V. (2012a). Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(3), 423-437, v. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>
- Root Kustritz, M. V. (2012b). Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 42(3), 423-437. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.01.012>
- Röttger, K. (2010). *Untersuchungen zur Durchführung der exfoliativen Vaginalzytologie bei der Hündin: ein Beitrag zur Standardisierung dieser diagnostischen Methode* [Universitätsbibliothek]. Gießen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2010/7744>
- Sağsöz, H., Liman, N., Küçükaslan, İ., & Saruhan, B. G. (2013). Immunolocalization of vascular endothelial growth factor, its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bitch uterus during the sexual cycle. *Animal Reproduction Science*, 140(3), 241-254. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.014>
- Samik, A., & Safitri, E. (2017). Mycotoxin binders potential on histological of ovary mice exposed by zearalenone. *Veterinary world*, 10(3), 353-357. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.353-357>
- Schäfer-Somi, S., Kaya, D., & Aslan, S. (2022). Prepubertal Use of Long-Term GnRH Agonists in Dogs: Current Knowledge and Recommendations. *Animals (Basel)*, 12(17).
<https://doi.org/10.3390/ani12172267>
- Schäfer-Somi, S., Beceriklisoy, H., Budik, S., Kanca, H., Aksoy, O., Polat, B., Cetin, Y., Ay, S., & Aslan, S. (2008). Expression of genes in the canine pre-implantation uterus and embryo: implications for an active role of the embryo before and during invasion. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(6), 656-663.
- Schortz, L., Mossop, L., Bergström, A., & Oxtoby, C. (2022). Type and impact of clinical incidents identified by a voluntary reporting system covering 130 small animal practices in mainland Europe. *Veterinary Record*, 191(2), no-no.
- Schutte, A. P. (1967). Canine Vaginal Cytology—I Technique and Cytological Morphology*. *Journal of Small Animal Practice*, 8(6), 301-306. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1967.tb04554.x>
- Sharma, M., & Sharma, N. (2016). Vaginal Cytology: An Historical Perspective on its Diagnostic Use. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4, 283-288.
<https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.6.283.288>
- Sivapathasundharam, B., & Kalasagar, M. (2004). Yet another article on exfoliative cytology. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 8(2), 54-57.
https://journals.lww.com/jpat/Fulltext/2004/08020/Yet_another_article_on_exfoliative_cytology.3.aspx

- Skliarov, P. M., Holubiev, O. V., & Mylostyvyi, R. V. (2022). Determining the optimal insemination time of bitches. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 21(0), e0005. <https://doi.org/10.14409/favecv.2022.0.e0005>
- Stepien, R. L., Benson, K. G., & Forrest, L. J. (1999). Radiographic measurement of cardiac size in normal ferrets. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 40(6), 606-610.
- Stout, M. J., Zhou, Y., Wylie, K. M., Tarr, P. I., Macones, G. A., & Tuuli, M. G. (2017). Early pregnancy vaginal microbiome trends and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 217(3), 356.e351-356.e318. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.05.030>
- Suebkhampet, A., & Marcou, T. C. (2019). Vaginal cytology in buffaloes: A review. *Buffalo Bulletin*, 38(3), 399-412.
- Tan, S. Y., & Tatsumura, Y. (2015). George Papanicolaou (1883-1962): Discoverer of the Pap smear. *Singapore Med J*, 56(10), 586-587. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015155>
- Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 94 Suppl 161, 8-16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>
- Tran, B., Vu, G., & Ha, G. (2019). Global evolution of research in artificial intelligence in health and medicine: a bibliometric study. *J Clin Med.*, 8(3), 360.
- Tsutsui, T. (1989). Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, 39, 269-275.
- Tsutsui, T., & Ejima, H. (1988). Experimental induction of superfecundation in the dog. *Nihon Juigaku Zasshi*, 50(2), 581-583. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.50.581>
- Uhlmann, J., Weber, C., Kuechenmeister, U., & Muennich, A. (2016, 25.07.2016). What do the values really mean? - A comparison of an enzyme-linked fluorescent assay vs chemiluminescent immunoassay for measuring serum progesterone in bitches. ISCFR & EVSSAR Symposium, France, Paris.
- Uhlmann, J., Weber, C., Kuechenmeister, U., & Muennich, A. (2016, 22-25.07.2016). What Do the Values Really Mean? - A Comparison of an Enzyme-Linked Fluorescent Assay vs Chemiluminescent Immunoassay for Measuring Serum Progesterone in Bitches. 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction, France, Paris.
- Ukaha, R., Kene, R., & Gboniko, O. (2013). Vertebral scale system to measure heart size in thoracic radiographs of west african dwarf goats. *Nigerian Veterinary Journal*, 34(4).
- Varga, I., Miko, M., Kachlík, D., Žišková, M., Danihel, Ľ., & Babál, P. (2019). How many cell types form the epithelial lining of the human uterine tubes? Revision of the histological nomenclature of the human tubal epithelium. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 224, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.03.012>
- Volkman, D. H. (2006). The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology*, 66(6-7), 1583-1586. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.024>
- Volkman, D. H. (2006). The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology*, 66(6), 1583-1586. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.024>
- Weaver, D. M., Tyler, J. W., VanMetre, D. C., Hostetler, D. E., & Barrington, G. M. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of veterinary internal medicine*, 14(6), 569-577.

- Wehrend, A. (2010). *Leitsymptome Gynäkologie und Geburtshilfe beim Hund: diagnostischer Leitfaden und Therapie*. Enke Verlag. <https://books.google.de/books?id=UIX6kEMSFkoC>
- Wehrend, A., Plato, K., & Goericke-Pesch, S. (2013). Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, 41, 267-274. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1623715>
- Wildt, D., Chakraborty, P., Panko, W., & Seager, S. (1978). Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biology of Reproduction*, 18(4), 561-570.
- Wildt, D. E., Panko, W. B., Chakraborty, P. K., & Seager, S. W. J. (1979). Relationship of Serum Estrone, Estradiol-17 β and Progesterone to LH, Sexual Behavior and Time of Ovulation in the Bitch. *Biology of Reproduction*, 20(3), 648-658. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.3.648>
- Wu, C.-H., Lin, C.-C., Lu, H.-L., Lu, T.-W., & Yeh, L.-S. (2014). Effects Of Pelvic And Femoral Positioning On Canine Norberg Angle Measurements And Test–Retest Reliability: A Computed Tomography-Based Simulation Study. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, 26(06), 1450076.
- Yang, M. Y., Cushman, R. A., & Fortune, J. E. (2017). Anti-Müllerian hormone inhibits activation and growth of bovine ovarian follicles in vitro and is localized to growing follicles. *Molecular Human Reproduction*, 23(5), 282-291. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax010>
- Yatu, M., Sato, M., Kobayashi, J., Ichijo, T., Satoh, H., Oikawa, T., & Sato, S. (2018). Collection and frozen storage of semen for artificial insemination in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(11), 1762-1765.
- Zhou, L. Q., Wang, J. Y., Yu, S. Y., Wu, G. G., Wei, Q., Deng, Y. B., Wu, X. L., Cui, X. W., & Dietrich, C. F. (2019). Artificial intelligence in medical imaging of the liver. *World J Gastroenterol*, 25(6), 672-682. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i6.672>
- Zoppei, A., Pinto Neto, A., Cattelan, J., Martinez, A., Trenkel, C., Steffens, R., & Gruchouskei, L. (2021). Quantification of multi-oocyte follicles in ovaries of bitches. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73, 1269-1277.
- Zuercher, J., Boes, K. M., Balogh, O., Helms, A. B., & Cecere, J. T. (2021a). Comparison of a Point-of-Care Analyzer With a Chemiluminescent Immunoassay for Serum Progesterone Measurement in Breeding Management of the Bitch. *Frontiers in veterinary science*, 8, 660923. Retrieved 2021, from <http://europepmc.org/abstract/MED/34055950>
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.660923>
<https://europepmc.org/articles/PMC8155301>
<https://europepmc.org/articles/PMC8155301?pdf=render>
- Zuercher, J., Boes, K. M., Balogh, O., Helms, A. B., & Cecere, J. T. (2021b). Comparison of a Point-of-Care Analyzer With a Chemiluminescent Immunoassay for Serum Progesterone Measurement in Breeding Management of the Bitch [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.660923>
- Zuraw, A., Staup, M., Klopffleisch, R., Aeffner, F., Brown, D., Westerling-Bui, T., & Rudmann, D. (2021). Developing a Qualification and Verification Strategy for Digital Tissue Image Analysis in Toxicological Pathology. *Toxicol Pathol*, 49(4), 773-783. <https://doi.org/10.1177/0192623320980310>

8 Publikationsverzeichnis

Peer reviewed Publikationen:

Autoren: Reckers Felix, Klopfleisch Robert, Belik Vitaly, Arlt Sebastian

Titel: Canine Vaginal Cytology: A Revised Definition of Exfoliated Vaginal Cells

Journal: Frontiers in Veterinary Science

VOLUME: 9

Jahr: 2022

URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.834031>

DOI: 10.3389/fvets.2022.834031

ISSN: 2297-1769

Poster Präsentationen:

2021:

Autoren: Reckers Felix, Klopfleisch Robert, Belik Vitaly, Arlt Sebastian

Titel: Canine vaginal cytology: towards a tutorial for the definition of vaginal cells

Ort: 23. Kongress der European Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR)

2022:

Autoren: Reckers Felix, Klopfleisch Robert, Belik Vitaly, Arlt Sebastian

Titel: Gynaecological examination of the female dog - a tutorial for vaginal cytology and revised definitions of cells

Ort: 55. Jahrestagung "Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung" und gleichzeitig 47. "Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung"

2024:

Autoren: Reckers Felix, Dong Gaojun, Klopfleisch Robert, Stepanov Dimitri, Belik Vitaly, Arlt Sebastian

Titel: Artificial Intelligence- Based evaluation of vaginal cells of the female dog

Ort: 2nd ECAR Symposium, Zürich

Mündliche Präsentationen:

2024:

Autoren: Reckers Felix, Dong Gaojun, Klopfleisch Robert, Stepanov Dimitri, Belik Vitaly, Arlt Sebastian

Titel: Computergestützte Analyse der Vaginalzytologie von Hündinnen

Ort: 57. Jahrestagung "Physiologie & Pathologie der Fortpflanzung" und gleichzeitig 49. "Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung"

9 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Dr. Sebastian Arlt bedanken, der mir stets mit seiner ruhigen, aufmunternden Art zur Seite stand und mich fantastisch betreut hat!

Des Weiteren möchte ich Johanna, Lisa, Julia und Luisa bedanken. Ohne euch wäre es nicht möglich gewesen, so viele Abstriche von Hündinnen zu bekommen. Vielen Dank dafür.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Robert Klopffleisch, der mir den Scanner für die Vaginalzytologien zur Verfügung gestellt hat und mich sehr gut beraten und mitbetreut hat.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Vitaly Belik für die Betreuung und Unterstützung während des Projekts.

Ein großer Dank geht auch an meine Familie. Vielen Dank für die Unterstützung während des ganzen Projekts.

Und ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Freundin Johanna bedanken, die immer ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatte.

Nur mit eurer Hilfe konnte ich das schaffen. Vielen Dank euch allen!

10 Finanzierungsquelle

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

11 Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Leipzig, den 19.08.2024

Felix Reckers



9 783967 292596

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-259-6