

Vaginale cytologie bij de teef: een miskende techniek?

E. Wydooghe, A. Van Soom, T. Rijsselaere

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

eline.wydooghe@ugent.be

SAMENVATTING

Vaginale cytologie bij de teef is gemakkelijk uit te voeren in de praktijk, de staalname is vrij eenvoudig en het is een relatief goedkope techniek met vele toepassingsmogelijkheden. Doordat de resultaten bovendien snel beschikbaar zijn, kan het praktijkdierenartsen helpen bij het beoordelen en het opvolgen van het cyclusstadium van een teef. Vaginale cytologie kan ook voor andere doeleinden gebruikt worden, zoals het voorspellen van het exacte partustijdstip, het bevestigen van een (ongewenste) dekking en het vaststellen van vaginitis, verlengde loopsheid, ovariëel restsyndroom, problemen post partum of vaginale neoplasie. Het optimale moment van dekking of inseminatie kan niet met vaginale cytologie bepaald worden en dient te worden uitgevoerd door middel van vaginoscopie en/of progesteronbepaling.

INLEIDING

Het epitheel van de vagina is een van de organen waar ovariële hormonen een invloed op uitoefenen. Stijgende oestrogeenconcentraties leiden immers tot karakteristieke veranderingen van het vaginale epitheel. Onder invloed van oestrogeen groeit het epitheel van de vagina van enkele lagen tijdens de anoestrus tot 20 à 30 cellagen op het einde van de pro-oestrus. Hierdoor veranderen de grootte en de morfologie van vaginale epitheelcellen, wat eenvoudig kan waargenomen worden met vaginale cytologie (England, 2013a). Vaginale cytologie kan voor praktijkdierenartsen bijgevolg niet alleen nuttig zijn bij het bepalen van het cyclusstadium van de teef, maar ook bij het evalueren van bepaalde hormoonafhankelijke pathologieën in de genitale tractus van de teef (Wehrend et al., 2013). In dit artikel worden de staalname, de interpretatie en verschillende indicaties voor vaginale cytologie bij de teef besproken.

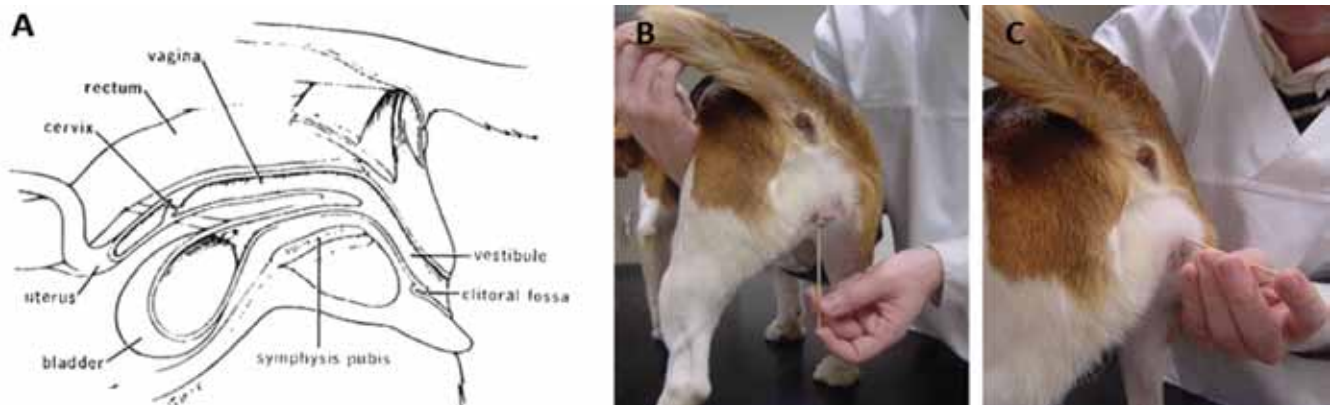
STAALNAME

De staalname gebeurt met behulp van een katoenen swab die eventueel vooraf bevochtigd wordt met enkele druppels zoutoplossing. Dit laatste is niet noodzakelijk wanneer er enige vorm van vaginale uitvloeï aanwezig is, zoals tijdens de loopsheid. De swab wordt zonder voorafgaande sedatie of anesthesie bij een staande teef ingebracht in de

dorsale vulvacommissuur (Figuur 1). Het aanbrengen van de swab in de ventrale vulvacommissuur kan namelijk de fossa clitoridis en/of hogerop, de urethraopening, irriteren. Niet alleen irritatie van de fossa clitoridis is een probleem. Het is bovendien ook af te raden om op die plaats een swab te nemen, omdat daar op elk moment van de cyclus verhoorde cellen kunnen aangetroffen worden. Deze verhoorde cellen kunnen abusievelijk voor superficiële cellen (typisch voor de pro-oestrus en oestrus) gehouden worden (Johnston et al., 2001a). Vervolgens worden de vulvalippen gespreid en wordt de swab in een hoek van ongeveer 60° in craniodorsale richting geschoven tot wanneer weerstand gevoeld wordt ter hoogte van de vestibulo-vaginale overgang. Tenslotte wordt de swab horizontaal in de bekkenholte gebracht, enkele keren rondgedraaid en opnieuw onder een hoek van 60° uit de vulva gehaald. De swab wordt hierna voorzichtig op een draagglasje uitgerold. Na het drogen aan de lucht gedurende dertig minuten of na fixatie met fixeerspray of 95-100% methanol wordt het preparaat gekleurd door middel van Diff-Quik, methyleenblauw of Wright-Giemsa (Wehrend et al., 2013).

INTERPRETATIE VAN VAGINALE CYTOLOGIE

Na kleuring kan het preparaat afgelezen worden met behulp van een lichtmicroscop. De verschillende celtypen die hierbij kunnen gezien worden, worden hieronder beschreven.



Figuur 1. Staalname. De vagina van een teef vertoont eerst een verticaal verloop tot aan de vestibulovaginale overgang (A). Daarom wordt een swab eerst in een hoek van ongeveer 60° in craniodorsale richting geschoven (B) om vervolgens horizontaal in het bekkenkanaal te worden gebracht (C).

Epitheliale cellen die aangetroffen kunnen worden in vaginale uitstrijkjes

Basale cellen

Dit zijn kleine ronde cellen die de stamcellen zijn van de vaginale epitheelcellen. Ze worden bijna nooit in uitstrijkjes aangetroffen.

Parabasale cellen

Dit zijn de kleinste cellen die aangetroffen worden in de uitstrijkjes. Ze hebben de grootste nucleus/cytoplasmaraatio van de cellen die in een uitstrijkje voorkomen (Figuur 2A).

Intermediaire cellen

Deze cellen variëren in grootte tussen 20 en meer dan 30 µm. Kleine intermediaire cellen zijn rond tot ovaal, terwijl grote een onregelmatige of hoekige cytoplasmaraand hebben. Grote intermediaire cellen kunnen soms verward worden met superficiële cellen omdat ze even groot zijn (Figuur 2B).

Superficiële cellen

Dit zijn grote epitheelcellen met een diameter tussen 30 en 75 µm. Ze bevinden zich aan de oppervlakte van het vaginaepitheel op het moment van de oestrogenenstimulatie (dit is tijdens de pro-oestrus en oestrus); vandaar hun naam. De kern van de superficiële cellen is donker en pycnotisch (Figuur 2C).

Anucleaire cellen

Dit zijn superficiële cellen, waarbij de kern zwak gekleurd is en niet te onderscheiden is van de rest van het cytoplasma (Figuur 2D). Superficiële en anucleaire cellen zijn verhoorde cellen terwijl parabasale en intermediaire cellen niet verhoord zijn.

Andere celtypen die in vaginale uitstrijkjes kunnen gevonden worden

Rode bloedcellen

De rode bloedcellen kunnen aanwezig zijn in uitstrijkjes van pro-oestrische, oestrische en met-oestrische teven (Figuur 2E en 2F).

Witte bloedcellen

Witte bloedcellen komen meestal onder de vorm van neutrofielen voor (Figuur 2F en 2G). De aanwezigheid van neutrofielen in een vaginaal uitstrijkje is een normale bevinding, behalve tijdens de oestrus (aangezien de neutrofielen dan niet door de vele cellagen kunnen migreren). Bij afwezigheid van klinische symptomen van vaginitis moet dit echter niet geassocieerd worden met een ontsteking. Lymfocyten en eosinofielen daarentegen komen zelden voor in normale uitstrijkjes.

Bacteriën

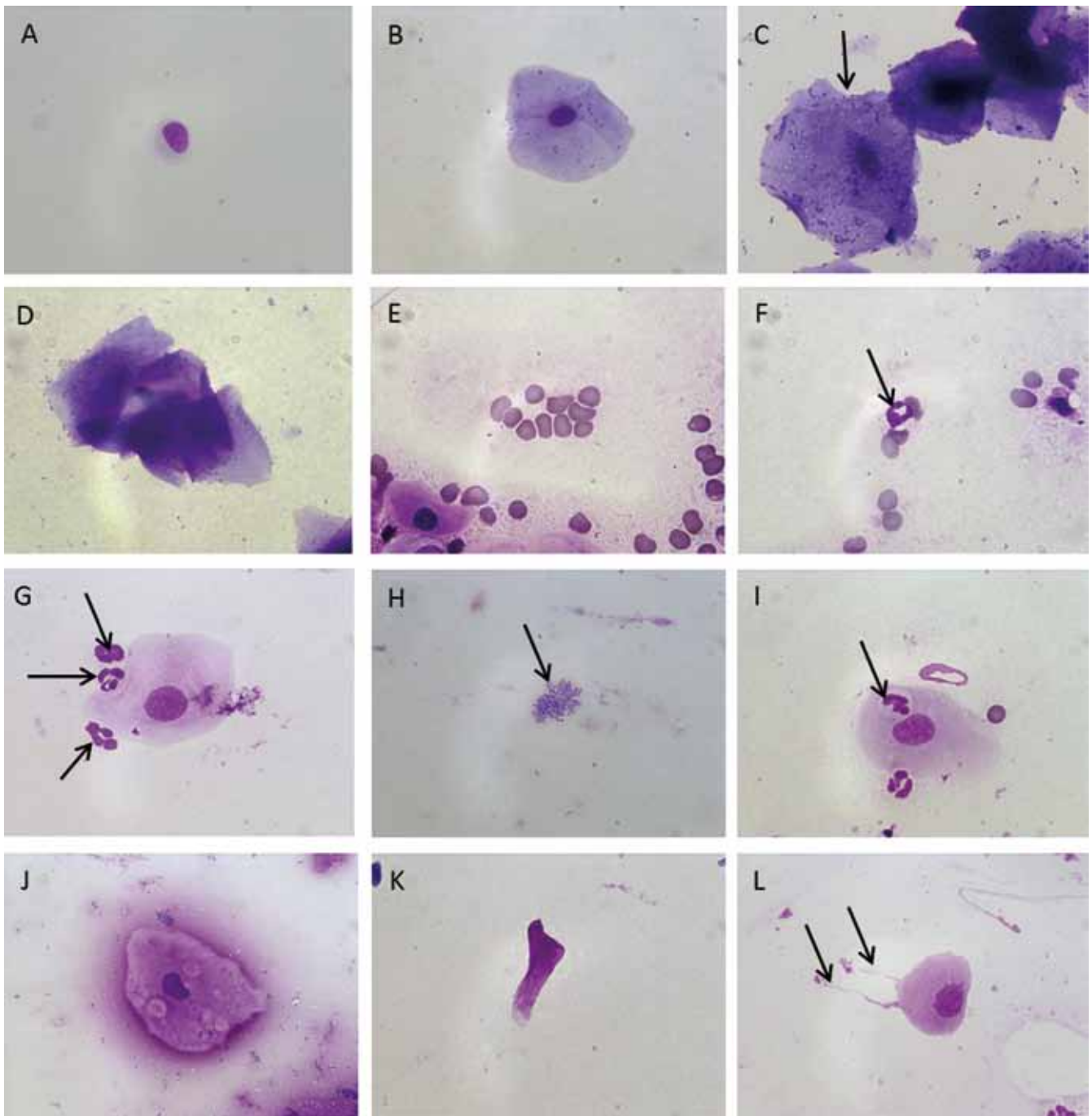
Bacteriën komen vaak voor in normale vaginale uitstrijkjes. Routinematig wordt een mengflora van twee tot vijf soorten bacteriën gevonden: hemolytische streptokokken, andere streptokokken, stafylokokken, ureoplasmen en mycoplasmen (Figuur 2H).

Metoestruscellen

Dit zijn niet-verhoorde cellen die een neutrofiel in het cytoplasma lijken te hebben. Deze cellen wijzen op de fagocytotische activiteit van het vaginale epitheel. Metoestruscellen komen niet alleen voor tijdens de metoestrus maar tijdens alle fasen waarbij neutrofielen aanwezig zijn (dus ook bij teven met vaginitis en zelfs in preputiale swabs) (Figuur 2I).

Schuimcellen

Schuimcellen zijn parabasale of intermediaire cellen



Figuur 2. Cellen die kunnen aangetroffen worden op een vaginaal cytologisch onderzoek bij een teef na diff-quickkleuring (vergroting 1000x) A. Parabasale cel; B. Intermediaire cel; C. Superficiële cel (zie pijl); D. Anucleaire cel; E. Rode bloedcellen; F. Rode bloedcellen en een neutrofiel (zie pijl); G. Intermediaire cel met drie neutrofielen (zie pijlen); H. Bacteriën in een cluster (zie pijl); I. Metoestruscellen: niet-verhoornde cel met een neutrofiel (zie pijl) intracellulair; J. Schuimcel: intermediaire cel met cytoplasmavacuolen; K. Epitheelcel van de fossa clitoridis; L. Artefact: het onvoorzichtig uitrollen van de katoenen swab veroorzaakt kapotte cellen zichtbaar als strepen (zie pijl) op het preparaat.

met cytoplasmavacuolen. Hun betekenis is onbekend (Figuur 2J).

Epitheelcellen van de fossa clitoridis

Dit zijn verhoorde epitheelcellen in verkeerdelijk genomen uitstrijkjes afkomstig van de fossa clitoridis (Figuur 2K).

Superficiële cellen met “cytoplasmic bodies”

Dit zijn cellen met een groot aantal donker gekleurde intracellulaire inclusies. Deze cellen komen vaak voor bij teven in oestrus, maar de betekenis van die intracellulaire inclusies is onbekend. Ze kunnen onderscheiden worden van bacteriën, die kleiner zijn en vaak ook extracellulair worden aangetroffen.

Melanine bevattende epitheliale cellen

Deze cellen komen voor in uitstrijkjes van teven met een gepigmenteerd epitheel.

INDICATIES VOOR VAGINALE CYTOLOGIE

In de praktijk wordt vaginale cytologie het vaakst gebruikt om te bepalen in welk cyclusstadium de teef zich bevindt. Ook andere indicaties voor vaginale cytologie worden hieronder besproken.


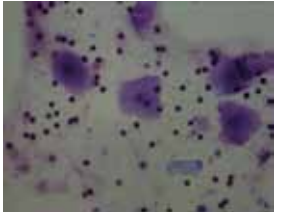
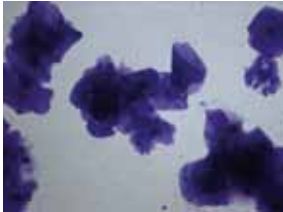
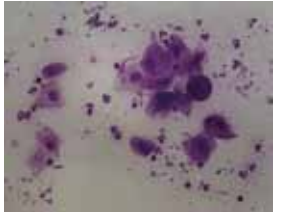
Cyclusopvolging

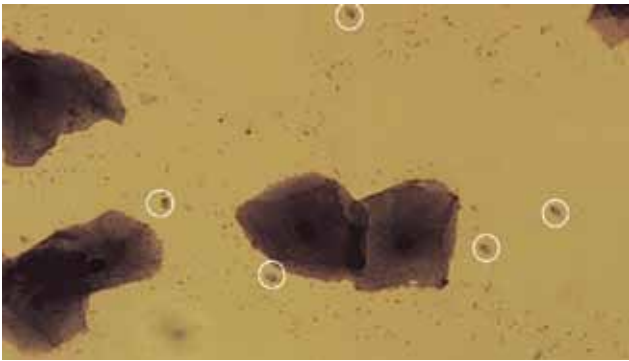
Het bepalen van het cyclusstadium gebeurt door de verhoorningsgraad van de vaginale epitheelcellen en de aanwezigheid van rode en witte bloedcellen te beoordelen (Root Kustritz, 2012). Tijdens de anoestrus

worden voornamelijk parabasale en intermediaire cellen aangetroffen en kunnen neutrofielen aan- of afwezig zijn (Tabel 1). Tijdens de pro-oestrus wordt het vaginale epitheel meerlagig (twintig tot dertig cellagen) en gebeurt het verhoornen onder invloed van een stijgende oestradiolconcentratie in het plasma (England, 2013). Daarnaast worden gewoonlijk rode bloedcellen en neutrofielen aangetroffen en is er een geleidelijke afname van het aantal gekernde vaginale cellen (Groppetti et al., 2012). Bij het begin van de oestrus wordt maximale verhoorning gezien, wat een schollenbeeld genoemd wordt, hoewel oestrogenen dan reeds aan het dalen zijn. Neutrofielen worden niet waargenomen bij oestrische teven, waarschijnlijk omdat het epitheel te dik is geworden om diapedese vanuit de submucosa toe te laten. Als ze toch aanwezig zijn tijdens de oestrus, moet er aan een ontsteking van de vagina/uterus gedacht worden. Het einde van de oestrusperiode en het begin van de metoestrus worden gekenmerkt door het opnieuw verschijnen van gekernde vaginale cellen en leukocyten (neutrofielen) (Holst en Phemister, 1974). Eenmalige vaginale cytologie kan evenwel geen onderscheid maken tussen pro-oestrus en metoestrus. De klinische symptomen, herhaaldelijke staalnamen en/of in combinatie met het bepalen van de progesteronconcentratie kunnen hierbij uitsluitsel geven.

Hoewel vaginale cytologie geen precieze voorspelling van het juiste dek- of inseminatietijdstip geeft (noch de LH-piek, noch de ovulatie worden immers exact bepaald), kan deze techniek gebruikt worden om op een snelle en goedkope manier het cyclusstadium van de teef te bepalen. Het berekenen van de anucleaire celindex kan ook een indicatie geven wanneer de teef gedekt moet worden. De anucleaire celindex is de verhouding van de anucleaire cellen ten opzichte van het totaal aantal epitheelcellen die

Tabel 1. Het bepalen van het cyclusstadium van de teef.

	Anoestrus	Pro-oestrus	Oestrus	Metoestrus
				
Vaginale cellen	Parabasale en kleine intermediaire cellen	Progressief meer grote intermediaire en superficiële cellen	Grote superficiële en anucleaire cellen (schollenbeeld)	Plots opnieuw intermediaire en parabasale cellen ipv anucleaire cellen
RBC	Afwezig	Meestal	Aanwezig maar in mindere mate	Weinig tot geen (kunnen aanwezig zijn)
Neutrofielen	Weinig tot geen	Weinig tot geen	Geen	Plots verschijnen van neutrofielen
Bacteriën	Meestal afwezig	In stijgende aantallen	Veel tot einde oestrus	Dalen drastisch in aantal



Figuur 3. Bevestiging van een (on)gewenste dekking. De aanwezigheid van spermacellen of spermakoppen (zie witte cirkels) in een vaginaal uitstrijkje wijst op een recente dekking.

onderzocht worden. Wanneer deze verhouding hoger is dan 80% en er geen neutrofielen gezien worden, kan een dekking aangeraden worden (England, 2013). Voor de bepaling van het exacte dek- of inseminatietijdstip wordt deze methode echter het beste gecombineerd met vaginoscopie en/of progesteronbepalingen (Goodman, 2001). Een eenmalige progesteronbepaling kan in bepaalde situaties immers leiden tot verkeerde conclusies. Een progesteronconcentratie van bijvoorbeeld 10 ng/ml kan zowel gezien worden bij een teef in oestrus als bij een teef op het einde van de metoestrus. Hierbij kan vaginale cytologie bijkomende informatie geven aangezien elk cyclusstadium zeer specifieke kenmerken heeft.

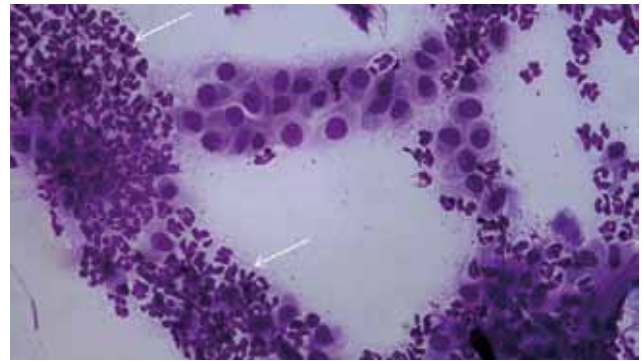
Voorspellen van het partustijdstip

De drachtduur bij de hond is gemiddeld 63 dagen, met een spreiding van 56 tot 72 dagen geteld vanaf de dag van de eerste dekking (Linde-Forsberg en Eneroth, 1998). Deze grote variatie in drachtduur heeft verschillende redenen. De lange overleving van hondensperma in de vrouwelijke geslachtstractus, het vrijkomen van onrijpe eicellen bij ovulatie, de langdurige maturatieperiode van de eicellen, de lange overleving van mature eicellen en het feit dat vaak meerdere dekkingen tijdens dezelfde oestrus plaatsvinden (Eilts et al., 2005; Luvoni en Beccaglia, 2006). Hierdoor kan er een grote variatie zijn tussen de dekdatum en de eigenlijke bevruchtingsdatum.

Er zijn verschillende methoden beschreven om de partusdatum nauwkeuriger te voorspellen, onder andere door het radiografisch of echografisch onderzoek van de foeti (Beccaglia en Luvoni, 2012; de Wispelaere et al., 2011).

Daarnaast kan de partusdatum ook endocrinologisch bepaald worden. Geteld vanaf de ovulatie, vastgesteld door middel van de progesteronconcentratie in het bloed (4-10 ng/ml), is de gemiddelde drachtduur 63 ± 1 dagen (Concannon et al., 1983).

Tot slot kan de drachtduur ook voorspeld worden met behulp van vaginale cytologie. Een plotse afname van verhoorning en het opnieuw verschijnen



Figuur 4. Vaginitis. Vaginale cytologie met massale infiltratie van neutrofielen bij een labradorpup van tien weken met een vaginitis veroorzaakt door een strictuur ter hoogte van de vestibulo-vaginale overgang.

van neutrofielen over een verloop van 24-48 uur (Figuur 2F en 2G) zijn typisch voor de start van de metoestrus en de partus kan 57 ± 1 dagen later verwacht worden (Concannon, 2000). Men kan de eigenaar aanleren om tijdens de loopsheid dagelijks een vaginaal uitstrijkje te nemen dat later door de dierenarts kan geïnterpreteerd worden om zo de exacte partusdatum te voorspellen. Indien de eigenaar de uitstrijkjes maakt, dient hij/zij ze in een speciale microscopiedoos te bewaren, zodat de glaasjes elkaar niet kunnen raken. Aan de lucht gedroogde uitstrijkjes kunnen enkele dagen tot weken bewaard worden tot de fixatie en kleuring.

Bevestiging van een (on)gewenste dekking

Vaginale cytologie kan een indicatie geven of een dekking, al dan niet gewenst, heeft plaatsgevonden (Figuur 3). Spermakoppen kunnen bij 65% van de gedekte teven gevonden worden in een uitstrijkje tot 24 uur na de dekking (Johnston et al., 2001a). Met behulp van een aangepaste staalname kunnen spermacellen gevonden worden bij 100% van de teven 24 uur na de dekking en bij 75% van de teven 48 uur na de dekking (England, 1998). Hierbij wordt de swab, vooraleer men deze op de gebruikelijke manier vaginaal inbrengt, eerst bevochtigd met een aantal druppels fysiologische zoutoplossing. De swab wordt vervolgens ongeveer één minuut in de vagina gehouden en daarna gedurende tien minuten in een proefbuisje met 0,5 ml fysiologische zoutoplossing gebracht. Daarna wordt de swab uitgeknepen tot hij droog is en wordt het buisje gedurende tien minuten gecentrifugeerd (2000 toeren/minuut). Het sediment wordt vervolgens verzameld, op een draagglaasje gebracht en gekleurd.

Hoewel de aanwezigheid van spermatozoa in een vaginaal uitstrijkje een dekking bevestigt, kan de afwezigheid van sperma op een vaginaal uitstrijkje niet uitsluiten dat er geen dekking geweest is. Bovendien is de aanwezigheid van spermacellen geen garantie dat de teef ook effectief drachtig zal zijn.

Vaginitis

Vaginitis is een ontsteking van de vagina die zowel kan voorkomen bij prepuberale teven vanaf de leeftijd van acht weken (juvenile vaginitis), als bij adulte teven. Beide vormen worden gekenmerkt door een mucoze tot mucopurulente vaginale uitvloeï en het frequent likken van de vagina, meestal met afwezigheid van systemische symptomen. De klinische symptomen van vaginitis kunnen zeer mild zijn en deze aandoening wordt bij de adulte teef bijgevolg vaak ondergediagnosticeerd. Wanneer overmatig veel neutrofielen gevonden worden op het vaginale cytologische onderzoek, is dit een indicatie voor vaginitis (Figuur 4). Ook bij de aanwezigheid van een groot aantal neutrofielen tijdens de oestrus moet er aan vaginitis gedacht worden. De uiteindelijke diagnose kan gesteld worden met behulp van vaginoscopie en bacteriële cultuur, waarbij de bacteriële swab zo craniaal mogelijk moet genomen worden. De overgroei van één of twee stammen van bacteriën kan enkel als pathogeen beschouwd worden in combinatie met het voorkomen van klinische symptomen (Maksimovic et al., 2012). Bij 60% van de klinisch gezonde honden wordt een vaginale, bacteriële populatie aangetroffen, meestal met meerdere stammen (Bjurstrom en Linde-Forsberg, 1992; Olson en Mather, 1978).

Verlengde loopsheid

Een teef heeft een persisterende (pro-)oestrus als dertig dagen na de start van de folliculaire fase geen ovulatie heeft plaatsgevonden (England, 2010). Dit uit zich klinisch in het aanwezig blijven van loopsheidsymptomen, zoals bloederige, vaginale uitvloeï en de aantrekkelijkheid voor reuen. Op het vaginale cytologische onderzoek wordt een blijvende verhoorning gezien en de progesteronconcentratie in het perifere bloed blijft laag (< 5 ng/ml). Een verlengde loopsheid kan veroorzaakt worden door een folliculaire cyste, een oestrogenproducerende ovariumtumor, de exogene toediening van oestrogenen of een leverprobleem. Naast vaginale cytologie en het bepalen van de progesteronconcentratie zijn een uitgebreide anamnese, echografie en bloedonderzoek (van de leverwaarden) noodzakelijk om tot een uiteindelijke diagnose te komen. Differentiaal diagnostisch kan men denken aan een gespleten pro-oestrus of 'split heat', waarbij de loopsheid eindigt vóór de ovulatie en enkele dagen tot weken later hervat wordt. Wanneer het interval erg kort is, kan een gespleten oestrus moeilijk te onderscheiden zijn van een persisterende (pro-)oestrus.

Ovarieel restsyndroom

Het ovarieel restsyndroom (ORS) is na bloeding afkomstig van het mesovarium (a. ovarica) of de cervix (a. uterina), de meest voorkomende complicatie na gonadectomie (Howe, 2006). De aanwezigheid van resterend functioneel ovarieel weefsel uit zich

bij de teef in het opnieuw cyclisch worden, wat gepaard gaat met aantrekkelijkheid voor de reu, vulvazwelling en eventueel ook bloedverlies. Een dergelijke loopsheid kan ook enkele weken later gevolgd worden door schijndracht. Bij een teef kan tijdens de periode van loops gedrag een vaginale swab genomen worden. Indien hierbij verhoorde vaginale cellen worden aangetroffen (> 80% verhoorning), is dit sterk indicatief voor ORS. Dit wordt het beste gecombineerd met een hormonale stimulatietest, waarbij met behulp van GnRH (50 µg IM, Fertagyl) of hCG (400 IU IV of 1 000 IU, half IV en half IM, Chorulon®) luteïnisatie geïnduceerd wordt (Johnston et al., 2001b). Hierbij wordt een bloedstaal vóór en één tot twee weken na de injectie van GnRH of hCG genomen om de progesteronconcentratie te bepalen. Indien het progesteron gehalte vóór de stimulatie lager is dan 1 ng/ml en daarna hoger is dan 2 ng/ml, dan is dit indicatief voor ORS. Voor een overzichtsartikel over ORS bij de hond en de kat kan verwezen worden naar Van Soom et al., (2008).

Problemen post partum

Een serosanguineuze tot hemorragische vaginale uitvloeï die langer blijft bestaan dan 16 weken post partum, kan veroorzaakt zijn door een subinvolutie van de placentaplaatsen (SIPS) (Davidson, 2010). Bij histologisch onderzoek van de baarmoeder van dergelijke teven wordt gezien dat foetale trofoblastcellen, die normaal gedurende twee weken in de lamina propria aanwezig zijn, niet degenereren zoals normaal, maar de diepe klierlagen van het endometrium of zelfs het myometrium invaderen en daar de bloedvaten beschadigen. Deze trofoblastcellen kunnen worden waargenomen in vaginale uitstrijkjes van teven met klinische symptomen van SIPS, maar niet bij normale teven post partum. De trofoblastachtige cellen zijn multinucleair en gevacuoliëerd (Fernandez et al., 1998).

Tumoren in vagina

Vaginatumoren vertegenwoordigen 2,8 tot 3,0% van alle tumoren bij de hond en 67 tot 88% van alle tumoren in het vrouwelijke voortplantingsstelsel bij de hond (Brodey en Roszel, 1967; Cotchin, 1954). De meest voorkomende vormen zijn fibroma, condyloom ('transmissible venereal tumor'), leiomyoom, leiomyosaroom of plaveiselcelcarcinoom. Ze komen meestal voor bij teven ouder dan tien jaar, met uitzondering van een condyloom dat bij jonge teven gezien wordt, en het vaakst bij intacte teven (Fontbonne, 2010). Klinische symptomen zijn een intravaginale massa die de vorm van het perineum kan aantasten, eventueel via de vulvalippen kan naar buiten komen, vaginale uitvloeï, urinaire problemen en tenesmus. Wanneer bij teven met een vaginatumor een vaginale swab genomen wordt, kunnen in bepaalde gevallen neoplastische cellen opgemerkt worden in de cytologie. De definitieve diagnose kan gesteld

worden door rectale en vaginale palpatie, endoscopie en eventueel door de cytologische evaluatie van een fijnaaldaspiraats om te differentiëren tussen de verschillende vormen van vaginale tumoren.

CONCLUSIE

Vaginale cytologie is een eenvoudige, snelle en weinig invasieve methode die dierenartsen kan helpen bij het bepalen van het cyclusstadium van een teef, het voorspellen van het partustijdstip en het bevestigen van een eenmalige, (on)gewenste dekking. Daarnaast kan vaginale cytologie ook helpen bij het stellen van de diagnose van bepaalde pathologieën, zoals vaginitis, verlengde loopsheid, subinvolutie van de placentaplaatsen en vaginale neoplasie.

REFERENTIES

- Beccaglia M., Luvoni G.C. (2012). Prediction of parturition in dogs and cats: accuracy at different gestational ages. *Reproduction of Domestic Animals* 47 Suppl 6, 194-196.
- Bjurstrom L., Linde-Forsberg C. (1992). Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *American Journal of Veterinary Research* 53, 665-669.
- Brodey R.S., Roszel J.F. (1967). Neoplasms of the canine uterus, vagina and vulva: a clinicopathologic survey of 90 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 151, 1294-1307.
- Concannon P., Whaley S., Lein D., Wissler R. (1983). Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *American Journal of Veterinary Research* 44, 1819-1821.
- Concannon P. (2000). Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation. Recent advances in small animal reproduction. *International Veterinary Information Services (www. ivis. org)*.
- Cotchin E. (1954). Neoplasia in the dog. *Veterinary Record* 66, 879-888.
- Davidson A.P. (2010). Problems during and after parturition. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester, p121-134.
- de Wispelaere P.A., Van Soom A., Rijsselaere T., Saunders J.H. (2011). Echografische voorspelling van de partusdatum bij de hond. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 80, 87-94.
- Eilts B.E., Davidson A.P., Hosgood G., Paccamonti D.L., Baker D.G. (2005). Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology* 64, 242-251.
- England G.C.W. (2013°). Endocrinology of the female. In: *Dog Breeding, Whelping and Puppy Care*. First edition, Willey-Blackwell, West Sussex. P 35-40.
- England G.C.W. (2013b). Clinical examination of the female. In: *Dog Breeding, Whelping and Puppy Care*. First edition, Willey-Blackwell, West Sussex. p 40-63.
- England G.C.W. (2010). Clinical approach to the infertile bitch. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester, p 51-62.
- England G.C.W. (1998). Clinical examination of the bitch's reproductive tract. In: *Allen's Fertility and Obstetrics in the Dog*. Second edition, Blackwell Science Ltd, Oxford, p 17-42.
- Fernandez P.E., Portiansky E.L., Barbeito C.G., Gimeno E.J. (1998). Characterisation of cytotrophoblastic-like cells present in subinvolutioned placental sites of the bitch. *Histology and Histopathology* 13, 995-1000.
- Fontbonne A. (2010). Clinical approach to conditions of the non-pregnant and neutered bitch. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. British Small Animal Veterinary Association. Gloucester, p166-184.
- Goodman M. (2001). Ovulation timing. Concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 31, 219-235.
- Groppetti D., Pecile A., Barbero C., Martino P.A. (2012). Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: role on fertility. *Theriogenology* 77, 1549-1556.
- Howe L.M. (2006). Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66, 500-509.
- Holst P.A., Phemister R.D. (1974). Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *American Journal of Veterinary Research* 35, 401-406.
- Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Oades P.J. (2001a). Vaginal cytology. In: *Canine and Feline Theriogenology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. P 32-40.
- Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. (2001b). Disorders of the canine ovary. In: *Canine and Feline Theriogenology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia. p193-205.
- Johnston S.D., Root Kustritz M.V., Olson P.N.S. (2001c). Disorders of the Canine Vagina, Vestibule and Vulva. In: *Canine and Feline Theriogenology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia. P 225-242.
- Luvoni G.C., Beccaglia M. (2006). The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reproduction of Domestic Animals* 41, 27-32.
- Maksimovic A., Maksimovic Z., Filipovic S., Besirovic H., Rifatbegovic M. (2012). Vaginal and uterine bacteria of healthy bitches during different stages of their reproductive cycle. *Veterinary Record* 171, 375.
- Root Kustritz M.V. (2012). Managing the reproductive cycle in the bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 42, 423-437.
- Olson P.N., Mather E.C. (1978). Canine vaginal and uterine bacterial flora. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172, 708-711.
- Van Soom A., Van Goethem B., Rijsselaere T. (2008). Diagnosestelling van ovarieel restsyndroom bij hond en kat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77, 435-441.
- Wehrend A., von Plato K., Goericke-Pesch S. (2013). Exfoliative vaginal cytology in the bitch--indications, procedure, interpretation. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere/Heimtiere* 41, 267-274.