

## Vergelijking van twee kleuringsmethoden ter beoordeling van vaginale uitstrijkjes bij hond en kat

*Comparison of two staining methods to assess vaginal smears in dogs and cats*

L. Corvelyn, G. Domain, J. Lannoo, A. Van Soom, E. Wydooghe

Vakgroep Interne Geneeskunde, Voortplanting en Populatiegeneeskunde, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

voortplanting.gezelschapsdieren@Ugent.be

### SAMENVATTING

Vaginale cytologie is een nuttige diagnostische techniek vanwege de eenvoud en mogelijkheid om snel resultaten te verkrijgen. De voornaamste aanleiding voor het nemen van een uitstrijkje is het bepalen van het cyclusstadium bij teven. Het beoordelen van het staal gebeurt meestal door middel van een Diff-Quick (DQ)-kleuring, waarbij het in de praktijk niet altijd zo eenvoudig is om verhoorde of gekeratiniseerde cellen te differentiëren van niet-verhoorde. De Harris-Shorr (HS)-kleuring daarentegen is in staat cellen die keratineprecursoren bevatten, te differentiëren van overige celtypes, maar is omslachtig. In dit onderzoek werd een nieuwe, vereenvoudigde Harris-Shorr-kleuring vergeleken met de gebruikelijke Diff-Quick-methode. Uit de vergelijkende studie blijkt dat de correlatie tussen de verhoorde cellen (DQ) enerzijds en de som van de volledig rode cellen en >50% rode cellen (HS) anderzijds duidelijk positief is ( $r_s(72) = 0,574$  ( $p < 0,001$ )). Bijgevolg kan deze gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring een meerwaarde betekenen in praktijkomstandigheden.

### ABSTRACT

Vaginal cytology is a useful diagnostic technique due to its simplicity and ability to obtain results quickly. The main reason to obtain a vaginal smear is to distinguish the stages of the ovarian cycle in bitches. Evaluation of the sample is usually done by means of a Diff-Quick (DQ) staining. In clinical practice, differentiation between cornified or keratinized cells and non-keratinized cells by using this coloration method is not always straight forward. The Harris-Shorr (HS) stain, however, is able to differentiate cells containing keratin precursors from other cell types by marking them red, but is cumbersome to perform. In this study, a new, simplified version of this Harris-Shorr stain was compared with the conventional Diff-Quick method. A positive correlation was found between the cornified cells (DQ) on the one hand and the sum of the completely red cells and >50% red cells (HS) on the other hand ( $r_s(72) = 0.574$  ( $p < 0.001$ )). As a result, this modified Harris-Shorr stain can provide added value in practical conditions.

### INLEIDING

Het vaginale epitheel is bij de hond en de kat gevoelig voor de invloed van ovariële hormonen zoals oestrogenen (Roszel, 1977). Bij een stijgende bloed-oestrogeenconcentratie wordt het vaginale epitheel geactiveerd, waardoor de epitheelcellen prolifereren, differentiëren, keratiniseren en exfoliëren. Zo transformeert het vaginale epitheel van een twee- tot

vierlagig kubisch epitheel tijdens anoestrus naar een meerlagig plaveiselepitheel bestaande uit twintig tot dertig cellagen op het einde van de pro-oestrus (Schutte, 1967; Roszel, 1977; Aydin et al., 2011; Wehrend et al., 2013; Wydooghe et al., 2013; Sharma en Sharma, 2016). Door de toename in epitheeldikte zijn de cellen in de luminale lagen van het epitheel steeds verder verwijderd van de bloedtoevoer, waardoor ze afsterven en exfoliëren in het vaginale lumen en vervolgens

waargenomen kunnen worden aan de hand van vaginale cytologie (Aydin et al., 2011).

De populairste kleuringen voor vaginale cytologie zijn grofweg in twee types onder te verdelen: enerzijds zijn er de morfologische, monochrome kleuringen zoals Wright-Giemsa, Diff-Quik, methyleenblauw- en de hemacolor-kleuring, en anderzijds de trichrome kleuringen die keratineprecursoren aankleuren, namelijk de Harris-Shorr-kleuring en de kleuring volgens Papanicolaou (Wright en Parry, 1989).

Diff-Quik en hemacolor zijn snelle en gebruiksvriendelijke technieken waar men in de dagelijkse dierenartsenpraktijk het vaakst voor opteert (Antonov, 2017). Bij gebruik van deze kleuringen wordt het cyclusstadium bepaald op basis van de morfologie van de epitheelcellen. Ieder stadium wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van specifieke celtypes, die in feite de verschillende stadia van celdood representeren. Wanneer gezonde, ronde epitheelcellen keratiniseren oftewel afsterven, worden ze groter en onregelmatiger van vorm. Ook de nucleus in de cel wordt progressief kleiner en pycnotischer, desintegreert en levert uiteindelijk een anucleaire cel op (Srinivas et al., 2004). Zodoende kunnen parabasale, intermediaire, nucleaire en anucleaire superficiële (verhoorde) cellen bemerkt worden op een vaginaal uitstrijkje (Schutte, 1967; Mills et al., 1979).

De Harris-Shorr- en Papanicolaou-kleuringen zijn in staat cellen die keratineprecursoren bevatten, te differentiëren (oranje-rood, acidofiel) van de overige celtypes (blauw, basofiel) (England, 2013). Vaginale epitheelcellen reageren op oestrogenen door keratinisatie en verkleuren hierdoor van blauw naar rood. Zo kan op een eenvoudige manier de oestrogeeninvloed op de vaginale epitheelcellen geïnterpreteerd worden. Deze interpretatie van de stalen blijkt eenvoudiger dan met Diff-Quick-kleuring. Men hoeft immers enkel de kleur van de epitheelcellen te beoordelen om een idee te krijgen van de keratinisatie van het vaginale epitheel. Vergeleken met het herkennen van de verschillende morfologische celtypes, is dit onbetwistbaar minder complex en hanteerbaar voor elke eerstelijnsdierenarts.

Nadelig aan het gebruik van deze kleuringen is dat de uitvoering ervan veel omslachtiger en tijdrovender is dan de doorgaans gebruikte Diff-Quick-methode (Wright en Parry, 1989). Het protocol bestaat uit meerdere stappen die in totaal zestien minuten duren (Oettlé en Weldhagen, 1982). Recent werd gepoogd om een gemodificeerde versie van deze kleuring te ontwikkelen (Fontbonne et al., 2015). Hoewel nog steeds dezelfde kleuringoplossingen gebruikt worden, is men erin geslaagd de duur van het proces opvallend te verkorten van zestien naar twee minuten. Dit werd gerealiseerd door het aantal immersies van het uitstrijkje in de kleuringoplossingen en de duur ervan drastisch te verminderen. De producenten van deze vereenvoudigde methode verklaren dat, ondanks de wijzigingen in de procedure, deze even betrouwbaar is als de voor-

gaande techniek. Het doel van deze studie was om na te gaan in hoeverre deze nieuwe gemodificeerde Harris-Shorr-kleuringsmethode correleert met de in de praktijk doorgaans gebruikte Diff-Quick-kleuring. Daarnaast werd er gepoogd een standpunt in te nemen over de gebruiksvriendelijkheid van de kleuring en nagegaan of ze een meerwaarde zou kunnen bieden in de dagelijkse dierenartsenpraktijk.

## MATERIAAL EN METHODEN

### Materiaal

Voor het uitvoeren van de studie werd volgend materiaal gebruikt: vaginale swabs, fysiologische zoutoplossing, microscopische draagglasjes, een Diff-Quick-kleuringskit (Novolab, België), de CytoRAL fixeerspray en de kleuringskit Diag-Oestro (RAL Diagnostics, Frankrijk) om de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring uit te voeren, gedestilleerd water, papieren doeken, een opbergdoos voor microscopische draagglasjes, een manuele celler en een lichtmicroscoop (objectieven 10x, 40x en 100x met immersieolie).

### Staalname

Gedurende de periode van juli 2020 tot april 2021 werd op de dienst Voortplanting van Gezelschapsdieren van de Faculteit Diergeneeskunde (UGent) van 39 dieren een uitstrijkje genomen. Tweeënzeventig stalen van het genitale stelsel van 36 teven, 2 kattinnen en 1 reu werden in deze studie gebruikt. Het betreft stalen van dieren die om uiteenlopende redenen op consultatie kwamen op de dienst Voortplanting van de Faculteit Diergeneeskunde en waarbij een cytologiestaal nuttige diagnostische waarde bood. Het merendeel van de stalen betrof vaginale cytologiestalen van teven. De belangrijkste indicatie voor het nemen van deze stalen was als onderdeel van een cycluspvolgning om het optimale moment voor de dekking te bepalen. Bijgevolg werden van verschillende teven meerdere opeenvolgende stalen genomen. Ze werden genomen volgens de standaardmethode door drie ervaren klinici van de dienst Voortplanting.

De verzamelde cellen werden via een rollende beweging zorgvuldig op een draagglasje aangebracht. Belangrijk hierbij was dat de druk werd uitgeoefend in de lengte van het draagglasje om de cellen niet kapot te duwen bij het uitrollen. Er werden telkens drie rijen van cellen op een draagglasje aangebracht. Deze procedure werd vervolgens herhaald bij het tweede draagglasje gebruikmakend van dezelfde vaginale swab. Ten slotte werden alle stalen geanonimiseerd en genummerd. Zodoende was het voor de onderzoeker niet mogelijk te achterhalen welke stalen tot welke patiënt behoorden.

## Kleuringsmethode

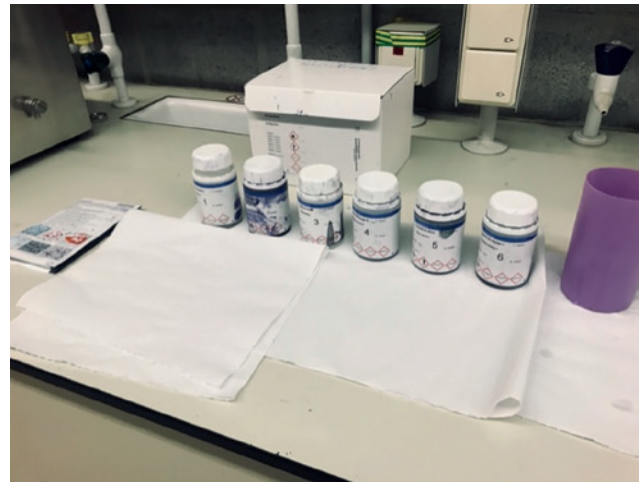
### *Diff-Quick*

Zoals bij de huidige standaardprocedure werd at random een van de twee stalen gekleurd door middel van de Diff-Quick-kleuring. Het staal werd eerst gedroogd aan de lucht en vervolgens gekleurd. Drie oplossingen zijn vereist: een fixatievloeistof bestaande uit 100% methanol, een gebufferde eosinofiele kleuring en een basofiele kleuring bestaande uit een gebufferde methyleenblauwkleurstof. Eerst werd het draagglaasje twaalf seconden ondergedompeld in de fixatievloeistof, vervolgens twaalf seconden in de eosinofiele kleurstof en ten slotte opnieuw twaalf seconden in de basofiele kleurstof gehouden. Tussen de verschillende immersies werd de overtollige kleuringvloeistof op een papieren doek afgegoten. Daaropvolgend werd het preparaat afgespoeld onder zacht stromend kraanwater. Tot slot werd het preparaat aan de lucht gedroogd.

### *Harris-Shorr*

Het andere staal werd gekleurd door middel van de nieuwe gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring, namelijk aan de hand van de Kit Diag-Oestro (RAL Diagnostics, Frankrijk) (Figuur 1). De uitstrijkjes werden vooreerst gefixeerd door de klinici gebruikmakend van de CytoRAL-fixeerspray.

De kleuringskit bestaat uit zes oplossingen met elk een volume van 100 ml. Om de oplossingen onvermengd te houden, werd een fractie van deze vloeistoffen overgegoten in een kleiner reservoir. In volgorde van gebruik ging het om een spoeloplossing A, een hematoxyline-gestabiliseerde oplossing, een differentiator, een spoeloplossing B, de Shorr-kleuringsoplossing en finaal een spoeloplossing C. Andere benodigdheden waren de CytoRAL-fixeerspray, gedestilleerd water en een papieren doek. Zoals de instructies het aangeven, werd het cytologiepreparaat na fixatie eerst twintig tot dertig minuten in spoeloplossing A gedompeld. Deze stap is echter niet nodig wanneer het mogelijk is het uitstrijkje meteen na staalname te kleuren. In zo'n geval zijn vijf immersies in spoeloplossing A voldoende. Vervolgens werd het staal afgespoeld door het vijf keer in het gedestilleerd water te dompelen. Nadien werd de overtollige vloeistof verwijderd door het draagglaasje verticaal op een papieren doek te deppen. Vervolgens werd het staal vijf keer in de hematoxylinekleurstof gedompeld en opnieuw afgespoeld in gedestilleerd water en gedroogd. Deze stappen werden ook herhaald voor oplossing drie, de differentiator. Daarna werd het glaasje vijf keer in spoeloplossing B ondergedompeld en gedroogd op de papieren doek. Het staaltje werd vanaf deze stap niet meer afgespoeld in het gedestilleerde water. Het uitstrijkje werd vervolgens tienmaal gedompeld in de Shorr-kleuringsoplossing en gedroogd.



**Figuur 1.** Kit Diag-Oestro geproduceerd door RAL Diagnostics (Frankrijk).

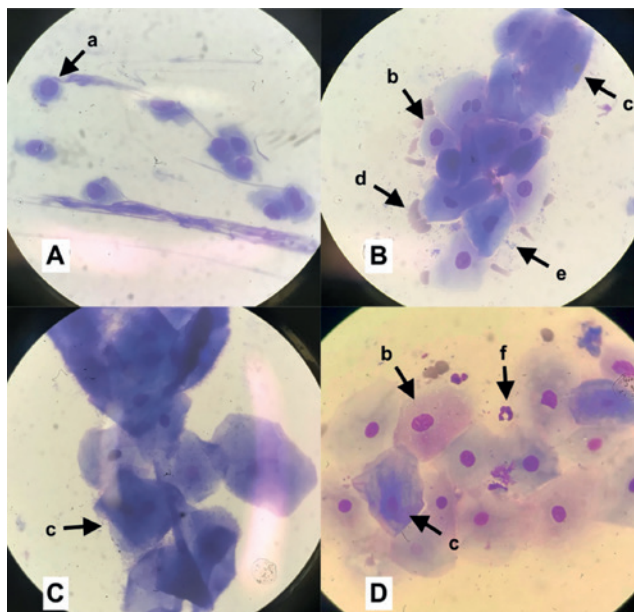
Finaal werd het staal vijf keer in de laatste spoeloplossing gedrenkt en gedroogd aan de lucht.

### **Microscopische beoordeling**

De evaluatie van alle cytologiepreparaten werd uitgevoerd door dezelfde persoon gebruikmakend van een lichtmicroscop. De anonimiteit van alle afzonderlijke stalen werd verzekerd. Zodoende was het voor de onderzoeker niet mogelijk te achterhalen welke stalen tot welke patiënt behoorden. Een eerste globaal overzicht van het preparaat werd verkregen via het 10X-objectief. Op die manier kon de gebruikte kleuring, Diff-Quick of Harris-Shorr, bepaald worden en een eerste inschatting van de hoeveelheid en het type epitheelcellen gemaakt worden. Het staal werd eerst volledig doorgenomen om vervolgens een observatieveld te selecteren dat representatief was voor het gehele preparaat. Aansluitend werd een druppel immersieolie op het preparaat gebracht en het objectief gewijzigd naar 100X om een gedetailleerd beeld van de cellen te bekomen. Om een objectieve en betrouwbare vergelijking tussen beide kleuringen te verkrijgen, werden honderd vaginale epitheelcellen per uitstrijkje geteld en gecategoriseerd. Voor de Diff-Quick-kleuring werden de cellen onderverdeeld in morfologische celtypes, namelijk: parabasale, intermediaire, superficieel nucleaire en superficieel anucleaire epitheelcellen (Figuur 2).

Vermits de auteurs de eosinofiele kleuringreactie typerend voor deze kleuring wilden beoordelen, werd besloten de epitheelcellen bij deze kleuring onder te verdelen op basis van kleur. Ook bleek het cellulaire detail van de preparaten gekleurd door middel van de Harris-Shorr-kleuring minder kwaliteitsvol en bijgevolg moeilijk in te delen op basis van morfologie. Om de vergelijking met de Diff-Quick-kleuring mogelijk te maken, werden eveneens vier categorieën opgesteld. 1) epitheelcellen die volledig blauw kleuren en waarbij dus geen rode kleurstof zichtbaar is (0% rood); 2)



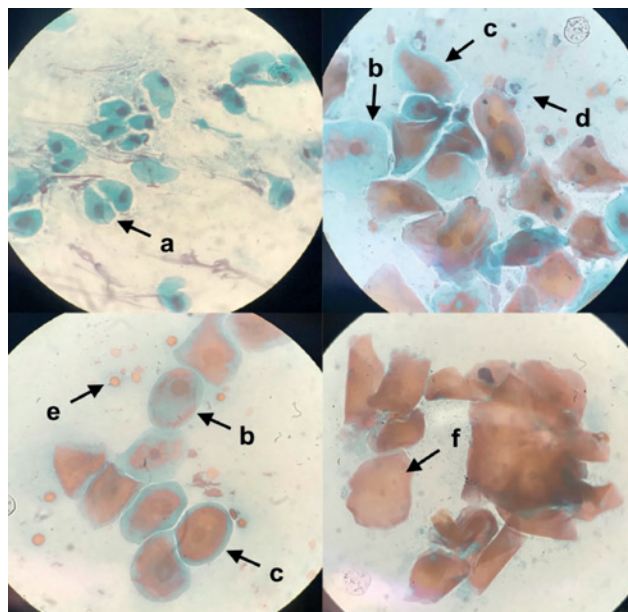


**Figuur 2.** Overzicht van het microscopisch beeld (100X objectief) van een vaginaal uitstrijkje gekleurd met Diff-Quick. A. Parabasale cellen (a). B. Intermediaire (b) en (anucleaire) superfiële cellen (c), rode bloedcellen (d) en bacteriën (e). C. (Nucleaire en anucleaire) superfiële cellen (c) en het typische schollenbeeld. D. Intermediaire (b) en (nucleaire) superfiële cellen (c) en neutrofielen (f).

epitheelcellen die overwegend blauw aankleuren en waar de rode kleurstof zichtbaar is, maar minder dan de helft van het oppervlak van de cel bedraagt (1-50% rood); 3) epitheelcellen waar nog blauwe kleurstof te zien is, maar meer dan de helft van het oppervlak rood kleurt (50-99% rood); 4) epitheelcellen die volledig rood kleuren (100% rood). De onderverdeling in deze celtypes werd op subjectieve wijze gemaakt door de uitvoerder van het onderzoek (Figuur 3).

**Statistische analyse**

De statistische analyse van de onderzoeksresultaten werd uitgevoerd met het statistisch softwareplatform SPSS. Om na te gaan in hoeverre de microscopische resultaten van de stalen gekleurd met Diff-Quick (DQ) overeenstemmen met de gemodificeerde Harris-Shorr (HS)-gekleurde uitstrijkjes, werd een correlatietest uitgevoerd. In deze studie werd gebruik gemaakt van een Spearmancorrelatie om het verband te onderzoeken tussen het percentage superfiële, ver-



**Figuur 3.** Microscopisch beeld (100X objectief) van vaginale uitstrijkjes gekleurd met de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring. A. Cel met 0% rode kleurstof (a). B. Cel met 1-50% rode kleurstof (b), cel met 50-99% rode kleurstof (c) en neutrofielen (d). C. Cel met 1-50% rode kleurstof (b), cel met 50-99% rode kleurstof (c) en rode bloedcellen (e). D. Cellen met 100% rode kleurstof (f).

hoorde cellen (superfiëel anucleaire + superfiëel nucleaire cellen) bij DQ-kleuring en het percentage epitheelcellen die volledig rood kleuren (100% rood) bij HS-kleuring. Vervolgens werd ook het verband onderzocht tussen het percentage verhoorde cellen en het percentage epitheelcellen die voor 50% of meer rood aangekleurd werden (50-99% rood en 100% rood opgeteld). Tenslotte werd ook de correlatiecoëfficiënt berekend tussen het percentage verhoorde cellen en het percentage epitheelcellen waarbij rode kleurstof te zien was (1-50% rood, 50-99% rood en 100% rood samen).

**RESULTATEN**

De totale hoeveelheid superfiële of verhoorde cellen bij Diff-Quick-gekleurde stalen was significant positief gecorreleerd met het aantal 100% rode cellen,  $r_s(72) = 0,553 (p < 0,001)$ . De correlatie tussen het percentage superfiële cellen en de epitheelcellen die

**Tabel 1.** Resultaten van de Spearman-correlatietest uitgevoerd door middel van SPSS.

		Rood	Rood + >50% rood	Rood + >50% rood + >50% blauw
Superfiëel	Spearman's rho	0,553**	0,574**	0,500**
Anucleair	P- waarde	0,000	0,000	0,000
+ Nucleair	N	72	72	72

\*\* correlatie is significant op het 0,01-niveau (2-tailed)

50% of meer rood aankleuren (50-99% rood en 100% rood opgeteld), bleek iets sterker,  $r_s(72) = 0,574$  ( $p < 0,001$ ) dan deze met de 100% rode cellen alleen. Wanneer de correlatiecoëfficiënt die het verband tussen het percentage superficiële cellen en het percentage cellen die rood aankleuren (de som van 1-50% rood, 50-99% rood en 100% rood) berekend werd, werd het resultaat  $r_s(72) = 0,500$  ( $p < 0,001$ ) bekomen. Een overzicht van de berekende correlaties wordt weergegeven in Tabel 1.

Wat de kwaliteit van de kleuring betreft, moet opgemerkt worden dat de rode kleur die volgens de producenten zichtbaar wordt in cellen die keratineprecursoren bevatten, eerder bruinrood tot zelfs oranje werd bevonden. Ook de blauwe kleur van niet-verhoorde cellen oogde dikwijls eerder blauwgroen tot groen. Afgezien daarvan bleef het contrast tussen beide kleuren duidelijk genoeg om ze van elkaar te kunnen onderscheiden. Ten tweede werd opgemerkt dat het gebruikte objectief een belangrijke invloed heeft op het aanzicht van het microscopisch beeld. Vaststellingen gemaakt via het 10X-objectief stemden niet steeds overeen met het beeld gezien door het 100X-objectief. Voor duidelijke waarneming van de discrepantie tussen beide kleuren van de Harris-Shorr-kleuring was het 100X-objectief vereist. Tot slot leek het cellulaire detail bij Harris-Shorr-kleuring minder zuiver en afgetekend te zijn dan bij Diff-Quick-kleuring. De vaginale epitheelcellen morfologisch categoriseren zoals bij Diff-Quick-kleuring gedaan wordt, bleek een stuk minder eenvoudig en eenduidig. De omlijning van de cellen leek dikwijls vervaagd te zijn, wat onder meer het onderscheid tussen grote intermediaire en super-

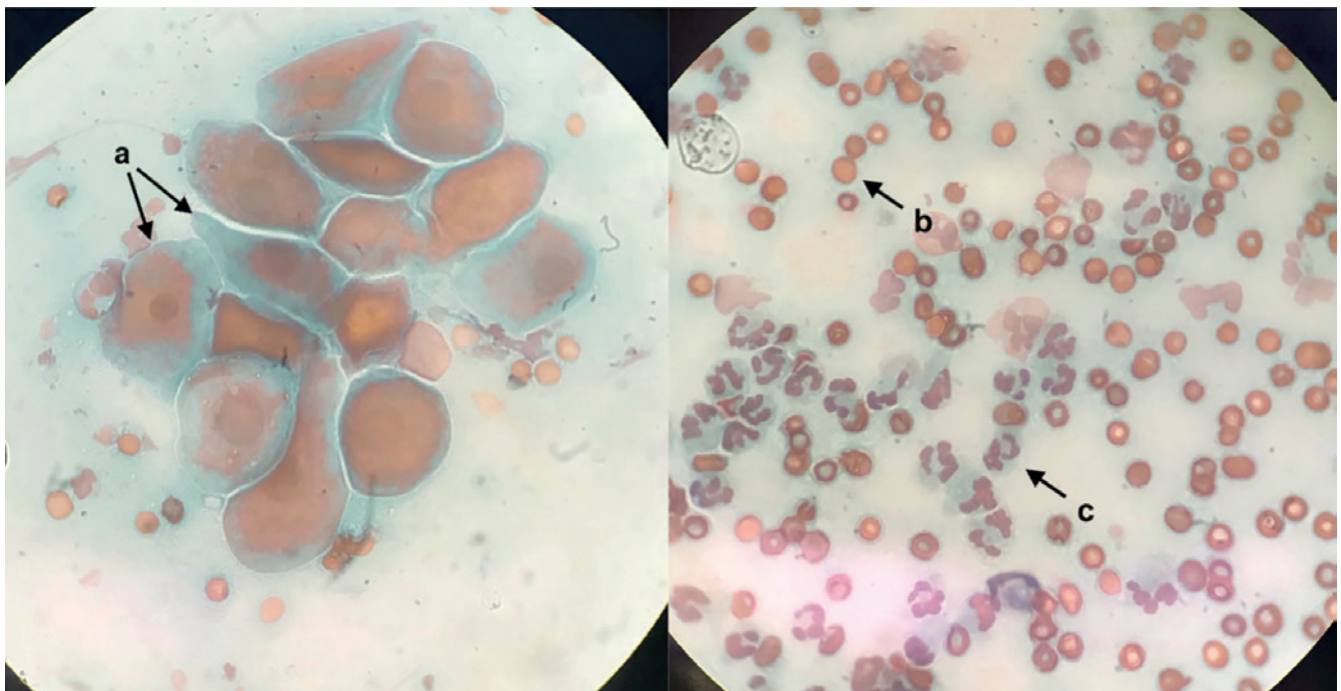
ficiële cellen bemoeilijkte en bijgevolg discussie kon teweegbrengen.

## DISCUSSIE

In deze vergelijkende studie werd vooral de nadruk gelegd op het verband tussen het aantal superficiële of verhoorde cellen gezien op de uitstrijkjes die met Diff-Quick gekleurd werden en de rode kleur zichtbaar in cellen van uitstrijkjes die door middel van de gemodificeerde Harris-Shorr gekleurd werden. Op deze manier werd er getracht na te gaan in hoeverre deze eosinofiele kleuringreactie adequate beelden oplevert. Een van de vragen die zich opdrong tijdens het uitvoeren van dit onderzoek was vanaf wanneer er kan besloten worden dat cellen met een rode kleur ook effectief verhoorde cellen voorstellen, en of dit geldt van zodra het rode pigment in een cel wordt opgemerkt of dat de volledige cel rood gekleurd dient te zijn. De producenten van de kleuring bieden evenmin antwoord op de betekenis van deze polychromatofiele cellen. Een antwoord op deze vraag zou de interpretatie van het met Harris-Shorr-gekleurde vaginale cytologiestaal eenvoudiger maken.

Op basis van deze beperkte studie kan geconcludeerd worden dat wanneer men verhoorde cellen wil evalueren bij cytologiestalen gekleurd door middel van de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring, idealiter enkel de epitheelcellen die voor de helft of meer rood aankleuren in beschouwing worden genomen.

Volgende vaststellingen zijn eveneens waardevol in het beoordelen van de gemodificeerde Harris-



**Figuur 4.** Microscopisch beeld (100X objectief) van vaginale uitstrijkjes gekleurd met de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring met perinucleair startende keratinisatie (a), rode bloedcellen (b) en neutrofielen (c).



Shorr-kleuring. Er werd opgemerkt dat de eosinofiele kleuringsreactie die plaats vindt omwille van de aanwezigheid van keratineprecursoren in het cytoplasma, zich steeds ontplooit rond de kern van de cel. Hieruit kan geconcludeerd worden dat keratinisatie of verhoorning perinucleair aanvangt en zich zo over de volledige cel verder uitbreidt. De celkern kleurt steeds oranje-rood aan, ook voor neutrofielen is dit het geval. Het cytoplasma van de neutrofiel is blauwgroen en rode bloedcellen kleuren steeds eosinofiel, rood-oranje aan (Figuur 4).

Volgens de producenten van de aangepaste Harris-Shorr-kleuringsmethode neemt deze nieuwe kleuringstechniek slechts twee minuten in beslag. Dit is in vergelijking met de 16 minuten durende, oudere Harris-Shorr-kleuring, een sterke verscherping van deze tijd. Uit de voorliggende studie is echter gebleken dat de kleuring niet binnen de twee minuten voltooid kon worden. Afgezien van het feit dat de procedure langer in beslag neemt dan de vooropgestelde tijd, kan nog steeds verondersteld worden dat deze duur haalbaar is in praktijkomstandigheden.

Het bepalen van het cyclusstadium en het achterhalen van het optimale dektijdstip, in combinatie met progesteronbepaling, is de belangrijkste en meest toegepaste indicatie voor het nemen van een vaginaal cytologiestaal bij de teef. De ideale periode voor natuurlijke dekking of kunstmatige inseminatie is de oestrusfase. Dekking wordt aangeraden wanneer het percentage oppervlakkige of verhoorde cellen in vaginale uitstrijkjes hoger is dan 80% (England, 2013). Een interval van twee tot drie dagen tussen iedere dekking wordt geadviseerd tot cytologische metoestrus optreedt, gekenmerkt door het opnieuw verschijnen van niet-verhoorde cellen en neutrofielen (Antonov, 2017). De trichrome Harris-Shorr-kleuring kan hierbij een nuttige tool vormen. Indien via wetenschappelijk onderzoek kan nagegaan worden vanaf welk percentage gekeratiniseerde, of dus meer dan 50% rode cellen, dekking kan toegelaten worden, wordt het geven van dekadvis eenvoudiger. De resultaten van het vaginale uitstrijkje moeten echter nog steeds gecombineerd worden met het meten van het serum progesteron gehalte (Hiemstra et al., 2001). Andere indicaties waarbij de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring een nuttig hulpmiddel kan blijken, zijn onder andere het stellen van de diagnose van het ovarieel restsyndroom, een verlengde loopsheid en folliculaire cysten. Ook de blootstelling aan exogene oestrogenen kan met behulp van deze nieuwe kleuring snel gedetecteerd worden. Via de eosinofiele kleuringsreactie typerend voor deze kleuring zou de aanhoudende oestrogene invloed en bijgevolg keratinisatie van het vaginale epitheel immers vlot kunnen vastgesteld worden. Om de oorzaak van deze oestrogene invloed te achterhalen, moet echter steeds bijkomend onderzoek uitgevoerd worden. Bij de reu kan het “feminizing syndrome” als gevolg van hyperoestrogenisme veroorzaakt door een sertoliceltumor sneller vermoed worden door middel van de Harris-Shorr-kleuring.

Normaliter bevat een preputiaal cytologiestaal weinig tot geen gekeratiniseerde cellen. Onder invloed van oestrogenen neemt deze hoeveelheid echter prominent toe. Dit kan met behulp van een keratinekleuring duidelijk worden door de verhoogde hoeveelheid roodgekleurde cellen.

## CONCLUSIE

Vaginale exfoliatieve cytologie is een zeer nuttige techniek vanwege de eenvoud, toegankelijke apparatuur en de mogelijkheid om snel resultaten te verkrijgen. Het kan, net zoals vaginoscopisch onderzoek, worden gebruikt als een waardevolle aanvulling op elke reproductieve diagnostiek bij de teef en de kattin. Ook bij de reu kan preputiale cytologie een bruikbare diagnostische techniek zijn, in het bijzonder voor het constateren van een toegenomen plasma-oestrogenconcentratie, bijvoorbeeld als gevolg van een sertoliceltumor. Uit deze beperkte studie kan besloten worden dat voor de evaluatie van verhoorde cellen bij cytologiestalen gekleurd door middel van de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring, idealiter enkel de voor meer dan 50% rode cellen in beschouwing worden genomen. De kleuringprocedure zelf is haalbaar in praktijkomstandigheden wanneer er gekeken wordt naar de afnameduur. Ook de interpretatie van de stalen gekleurd door middel van de gemodificeerde Harris-Shorr-kleuring wordt een stuk eenvoudiger dan door middel van Diff-Quick-kleuring. Het is echter aangegeven verder onderzoek uit te voeren naar de toepassingsmogelijkheden van de kleuring. Richtlijnen omtrent het gebruik van de kleuring bij onder andere het bepalen van het cyclusstadium of het diagnosticeren van aandoeningen van het genitale stelsel zijn absoluut waardevol en kunnen grootschalig gebruik van de kleuring aanmoedigen.

## REFERENTIES

- Antonov, A.L., (2017). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 20, 193–203.
- Aydin, I., Sur, E., Ozaydin, T., Dine, D.A., (2011). Determination of the stages of the sexual cycle of the bitch by direct examination. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 15, 1962-1967.
- Becha, B.B., Ghosh, K.N.A., (2013). Timing of ovulation using eosinophilic index and progesterone profile during natural and induced oestrous cycles in bitches – a retrospective study. *Indian Journal of Canine Practice* 5, 132–135.
- Christie, D.W., Bell, E.T., (1971). Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. *Journal of Small Animal Practice* 12, 383–389.
- England, G.C.W., (2013). Clinical examination of the female, In: England, G. (Editor). *Dog Breeding, Whelping and Puppy Care*. John Wiley & Sons Inc., West Sussex, UK, West Sussex, UK, pp.41–63.
- Hazra, A., Gogtay, N., (2016). Biostatistics series module

- 6: Correlation and linear regression. *Indian Journal of Dermatology* 61, 593–601.
- Hiemstra, M., Schaefers-Okkens, A.C., Teske, E., Kooistra, H.S., (2001). De betrouwbaarheid van vaginacytologie bij het bepalen van het optimale dektijdstip bij de teef. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 126, 685–689.
- Post, K., (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *The Canadian Veterinary Journal* 26, 101–104.
- Roszel, J.F., (1977). Normal canine vaginal cytology. *The Veterinary Clinics of North America* 7, 667–681.
- Schutte, A P, (1967). Canine vaginal cytology. II. Cyclic changes. *The Journal of Small Animal Practice* 8, 307–311.
- Schutte, A. P., (1967). Canine vaginal cytology - compilation and evaluation of cellular indices. *Journal of Small Animal Practice* 8, 313–317.
- Sharma, M., Sharma, N., (2016). Vaginal cytology: An historical perspective on its diagnostic use. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 4, 283–288.
- Wehrend, A., von Plato, K., Goericke-Pesch, S., (2013). Die exfoliative Vaginalzytologie bei der Hündin – Indikationen, Durchführung, Interpretation. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere* 41, 267–274.
- Wright, P.J., Parry, B.W., (1989). Cytology of the canine reproductive system. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 19, 851–874.
- Wydooghe, E., Van Soom, A., Rijsselaere, T., (2013). Vaginale cytologie bij de teef: Een miskende techniek? *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 82, 363–369.



© 2022 by the authors. Licensee Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, Ghent University, Belgium. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of

the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Oproep

### Gevallen uit de praktijk in het Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift

Omdat het Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift in de eerste plaats een tijdschrift van en voor dierenartsen is, wil de redactieraad een oproep doen om bijzondere gevallen die u in uw praktijk ziet, kenbaar te maken in de vorm van een artikel dat in het tijdschrift na beoordeling gepubliceerd kan worden.

Geïnteresseerden worden voor de opmaak van hun case-report aangeraden de richtlijnen voor auteurs te volgen: <https://openjournals.ugent.be/vdt/site/guidelines/> of kunnen terecht bij [nadia.eeckhout@ugent.be](mailto:nadia.eeckhout@ugent.be)

Als voorbeeld kunnen reeds eerder in het VDT gepubliceerde casuïstieken dienen.