

Hur kan laboratorie- diagnostik bidra till framgång i hundaveln?

Tiken har en unik reproduktionscykel och olika metoder för korrekt identifiering av ovulation har undersökts. I den tredje delen av Svensk Veterinärtidnings artikelserie från Klinisk kemiska laboratoriet vid SLU Universitetsdjursjukhuset (UDS) beskrivs hundens reproduktionscykel, olika metoder för progesteronanalys för bestämning av parningstidpunkt, beräkning av förväntat förlossningsdatum samt fördelar och nackdelar med olika typer av analyser.

Författare: Sarah Jensen, leg veterinär, resident i klinisk patologi på Klinisk kemiska laboratoriet, Universitetsdjursjukhuset, Sveriges Lantbruksuniversitet och Anicura Regionsdjursjukhuset Bagarmossen.

Introduktion

Hunduppfödningen har utvecklats mycket genom tiden. Uppfödare är idag oftast välinformerade och uppdaterade, och avancerade tekniker som till exempel artificiell insemination (AI) och användning av fryst sperma har blivit mer tillgängligt. Uppfödare kan även resa långt för naturlig parning. Forskningen har bidragit med information om tikens unika reproduktionscykel, och olika metoder för korrekt identifiering av ovulation har undersökts för att guida veterinärer och ägare i fastställning av optimal parningstidpunkt. På laboratoriesidan har det utvecklats flertalet instrument som möjliggör hormonanalys även på den mindre kliniken, så kallade in house-analyser, med snabba svar och till rimligt pris, vilket betyder att fler veterinärer runt om i landet har möjlighet att erbjuda denna tjänst. Analys av progesteron används som indikator för LH-peaken och för att fastställa tidpunkten för ovulationen, och är därmed en bra analys för att bestämma rätt datum för parning eller artificiell insemination (1–3). Utifrån progesteronkoncentrationen vid parning kan även ett beräknat förlossningsdatum tas fram (1, 4–6). Progesteronkoncentrationen ökas snabbt runt tiden för LH-peaken och ovulationen, vilket ställer krav till analysmetodens prestation och tillgänglighet (1). I en idealisk värld är resultatens precision hög vid de kritiska tidpunkterna för parning eller AI (1, 7). Det är också en fördel om resultaten från olika instrument är så väl korrelerade att en direkt jämförelse är tillförlitlig, eftersom uppfödare ibland reser långt och upprepade provtagningar och analyser av progesteron ofta behövs för att identifiera optimalt parnings- eller AI-datum (2, 7). I denna artikel presenteras en kort repetition av hundens reproduktionscykel, vilken följs av en genomgång av användning av progesteronanalys för bestämning av parningstidpunkt, samt beräkning av förväntat förlossningsdatum. Olika metoder för progesteronanalys samt fördelar och nackdelar med olika typer av analyser kommer även diskuteras.

Tikens reproduktionscykel

Tikens reproduktionscykel avviker från många av våra andra

sällskapsdjur, då de har en lång löpning (proöstrus- och östrus), samt ett långt intervall mellan löpningarna (inter-östrus), i genomsnitt 5–12 månader (1, 3). Det innebär att hundar har få lopp per år vilket medför få chanser för parning. Korrekt identifiering av ovulation för att fastställa lämplig tid för parning är därför viktigt, för att optimera parningstid med ökad möjlighet till dräktighet.

Hundens reproduktionscykel delas klassiskt in i fyra faser. Nedan finns de fysiska förändringar, resultat från ultraljud, vaginalcytologi och hormonanalys beskrivet. Viktigt att notera är, att de angivna hormonkoncentrationerna i denna artikel är tagna från litteraturen och att progesteron har analyserats med antingen gold standard-metod eller välvaliderat alternativ.



Sarah Jensen.

Proöstrus (förlöpfung): Inledningen till proöstrus är ofta det första tecknet på lopp som uppmärksammas av djurägaren. Fasen definieras av de första yttre tecken med svullnad av vulva och blodig flytning. Tiken attraherar hanhundar, men visar själv inget intresse för parning (1, 8). Det är i denna period folliklarna utvecklas och producerar östradiol, och det ses en långsam stegring i serumkoncentrationen till en peak-koncentration runt 150–450 pmol/L mot slutet av proöstrus (1, 3, 9). Folliklarna kan identifieras med ultraljud och når maximal storlek i genomsnitt 6–12 dagar från första dagen blodig flytning observerats (10). Under proöstrus förbereds livmodern för eventuell dräktighet. Cellbilden på vaginalutstryk ändras från att bestå av huvudsakligen erythrocyter och parabasceller, till att domineras av först små och sedan stora intermediär-celler, för att mot slutet främst utgörs av förhornade superficial-celler (1, 11, 12) Längden av proöstrus varierar stort, från 5 till upp emot 20 dagar. Genomsnittlig proöstrusfas är 9 dagar (1).

Östrus (höglöpning): Fasen karakteriseras av att tiken blir mottaglig för hanhunden, och de yttre tecken som ses är att flytningen blir klarare och vulva mjukare (11). Hormonellt ses en fallande östradiolkoncentration till runt 40–90 pmol/L, och en kraftig stegring av LH (luteiniserande hormon) upp till 11–90,3 ng/ml (genomsnittligt 45,1 ng/ml), också kallat "LH-peaken" (13). LH-peaken varar från mindre än ett dygn och upp till 3 dagar, och föregår ovulationen (1, 10). Typiskt för hund är att folliklarna luteiniserar under denna fas, och i och med detta går progesteronkoncentrationen i serum från att vara basal i proöstrus, till att under LH-peaken nå koncentrationer på 3–6 nmol/l (1) och vid tiden för ovulation ligga runt 12–24 nmol/L (2, 10, 14). Därefter fortsätter progesteronkoncentrationen att öka tills maximala koncentrationer nås i diöstrus (1, 3). Cytologiskt ses en maximal förhornning och andelen erythrocyter sjunker ofta (1, 8). Ovulationen kan identifieras med ultraljud, men det krävs utbildad personal, avancerad utrustning, samt täta undersökningar. Studier har visat att ultraljud inte är lika tillförlitligt som hormonanalys för att identifiera ovulationen (10, 15). Hos hund sker ovulationen gradvis över minst 24 och ända upp till 36 timmar, vilket betyder att de första äggen kan avlossas mer än ett dygn före de sista (14, 15).

Diöstrus (metöstrus, efterlöpning): Tikens mottaglighet för hanhunden upphör. Den hormonella bilden domineras av progesteron som produceras av gulkroppen, vilket leder till fortsatt stegring i serumprogesteronkoncentrationen, som når en peak på 50–250 nmol/L cirka 20–30 dagar efter LH-peaken (1, 3). Därefter faller koncentrationen sakta till låga basala nivåer (<3 nmol/L) runt dag 55–90 (1, 3). Östradiolkoncentrationen varierar, men ligger på medelnivå runt 15–110 pmol/L. Cytologiskt ses en abrupt övergång i diöstrus till icke-förhornat epitel och riklig förekomst av polymorf nukleära leukocyter (PMNs). Den plötsliga övergången kan användas för att retrospektivt fastställa när ovulationen inträffat (1, 11). Gulkroppen kan identifieras med ultraljud, men utseendet förändras inte nämnvärt under diöstrus (14). Periodens längd varierar från 45–70 dagar, men varar i genomsnitt 60 dagar (1).

Anöstrus: Perioden börjar när serumprogesteronkoncentrationen har fallit till mindre än 3 nmol/L och varar fram till nästa proöstrus (1). Längden är i genomsnitt fem månader, men varierar från tre till tio månader (1, 3). Det är i denna period endometriet återuppbyggs. Cytologiskt ses sparsamt med celler varav de flesta är parabasceller och eventuellt lindrigt med neutrofiler. Koncentrationen av östradiol är låg (cirka 15–35 pmol/L) och LH-koncentration är basal (<1–2 ng/ml) med sporadiska pulsartade sekretioner en till flera gånger dagligen (upp mot 3–30 ng/ml). Koncentrationen av follikelstimulerande hormon (FSH) är hög (cirka 50–400 ng/ml) (1).

Diagnostiska möjligheter

Det finns olika möjligheter, både subjektiva och objektiva, som kan användas för att identifiera när ovulationen sker.

Fysiska förändringar och ett ändrat beteende är något som inte kräver avancerade instrument eller provtagning. Det är en mycket subjektiv och osäker metod (1, 3, 4, 11, 13, 16).

Ultraljudsundersökning av livmoder och ovarier ger bra information om patologiska tillstånd i reproduktionsorganen, men att fastställa ovulationstidpunkten är utmanande. Det krävs utbildad och erfaren personal för att upptäcka de små förändringar som sker

i ovarierna vid ovulationen, och folliklar och gulkroppar kan ha ett liknande utseende på ultraljud (10, 15). Vidare kan hundens anatomi försvåra, då tjocka eller djupbröstad hundar kan vara svårare att undersöka (15). För optimala bilder och bättre sensitivitet för ovulationen krävs även modern ultraljudsutrustning (15). Under ovulationen sker en snabb förändring av follikelns form, vilket betyder att undersökning flera gånger dagligen krävs för att minimera chansen för att missa ovulationen, och även då är risken att man missar den stor (10, 15, 16).

Vaginalcytologi är lättillgängligt och snabbt att utföra. Här utnyttjas hur de stegrande östradiolkoncentrationerna under proöstrus påverkar epitelet i vaginalslemhinnan (1, 11). Metoden kan användas för att identifiera proöstrus och därmed planera för progesteronprovtagning när tiken löper, men inte för att fastställa tidpunkten för ovulationen (1, 7). Vidare så är det en subjektiv metod, där personalens erfarenhet och utbildning spelar en viktig roll för resultatens tillförlitlighet (17).

Samtliga könshormon kan analyseras i serum. För att detektera ovulation är endast analys av LH och progesteron intressant (1, 3, 4). För analys av LH används ofta radioimmunoassay (RIA) för kvantitativa resultat (1, 3, 4, 9). Dessa analyser är kostsamma och kräver speciell reagens, samt specialutbildad personal. RIA analyser innebär även hälsorisker för de som jobbar med dem, då de baseras på radioaktivitet, vilket gör att de sällan är praktiskt användbara kliniskt (2). För att träffa LH-peaken och kunna bestämma ovulationstidpunkten, behövs tät monitorering med frekventa provtagningar. Det medför att prover inte kan skickas till externa laboratorier med påföljande fördröjning av analysresultatet (1, 2).

Med en kombination av vaginalcytologi och hormonanalys är det möjligt att identifiera viktiga tidpunkter med ganska stor säkerhet (1, 12).

Progesteronanalys

Traditionellt har progesteron, liksom LH, analyserats med RIA teknik som av många anses vara gold standard och den metod som ger det sanna värdet. Metoden används ofta i jämförelsestudier när nya metoder valideras (18–21). Denna analysmetod ger kvantitativa, pålitliga svar. Nackdelen är dock som tidigare beskrivet att det inte är en lättillgänglig metod, analysen i sig är kostsam och tar lång tid, vilket medför fördröjda provsvar samt höga kostnader (18, 20). Masspektrometri kan också användas för att analysera progesteron, men även här krävs specialutbildad personal och avancerade instrument vilket gör metoden mindre användbar i kliniken (22). Masspektrometri används, liksom RIA, också i vissa studier som gold standard och för att jämföra nya instruments prestation (23).

Immunologiska analysmetoder som inte utnyttjar radioaktivitet har utvecklats vilket möjliggör mindre instrument, tillgängliga för mindre kliniker utan specialutbildad personal. Det medför ofta analys till ett lägre pris och med kortare analystider. Dessa metoder är tekniskt olika, men bygger på samma princip: monoklonala antikroppars förmåga att binda till specifika molekyler för att fastställa mängden av dessa molekyler i serum eller plasma. Exempel på immunologiska metoder är chemiluminescence assay (CLIA), enzyme-linked fluorescence assay (ELFA), fluorescence enzyme immuno assay (FEIA), immunoturbidimetriskt test, Surface Plasmon enhanced Fluorescence (SPF) och enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (18–21, 23–25). Flera av dessa är tillgängliga på den svenska marknaden idag, och kan användas i instrument som även används för andra hormonanalyser och biokemiska analyser, vilket gör dem lättillgängliga och

kostnadseffektiva. Analystiden är dessutom oftast kort, ofta runt 10–45 minuter (19, 21, 23, 24, 26).

Flera av dessa metoder har validerats med tillfredsställande precision och korrelation med gold standard-metoder, inom sina respektive mätområden (18, 20, 21, 23, 24). Det finns mindre publicerat gällande korrelationen dessa metoder emellan, vilket gör att direkt jämförelse av resultat från instrumenten inte med säkerhet går att utföra. I en studie som publicerats ses det till exempel konsekvent skillnad i resultat från analys med ELISA och CLIA (20). I två andra studier har god korrelation mellan antingen SPF eller en immunoturbidimetrisk metod och CLIA setts (21, 24), men det betyder inte att dessa två kan jämföras med varandra. En tredje studie har visat markant skillnad mellan RIA och ELISA (27).

Även mätområden skiljer sig mellan de olika metoder, en har ett mätområde från 0,6–63,6 nmol/L (23), en annan från 3,8–63,6 nmol/L (24), men det finns även de som mäter högre värden: 0,6–127,2 nmol/L (21) och 0,63–254 nmol/L (19). Några instrument uppger i första hand resultat som ng/ml, varför antingen ändring av enhet som resultatet rapporteras i, eller omräkning till nmol/L kan behövas för att jämföra resultaten mellan olika instrument.

Det finns skillnader avseende vilket provmaterial de olika instrumenten kan använda. Vissa analyserar helblod, andra lithium-heparin plasma, serum från rör med eller utan gel-tillsats, eller EDTA-plasma (18, 20, 21, 24). Serum bör stå i rumstemperatur före analys. I en studie sågs en markant lägre progesteronkoncentration i serum om provet centrifugerades och separerades inom två timmar efter provtagning (27). Vidare finns det en studie där skillnad i progesteronkoncentrationen mellan serum, EDTA-plasma och lithium-heparin plasma setts (28), vilket dock inte kunde verifieras i en annan studie (27).

Det finns begränsad information om interferens från hemolys, ikterus och lipemi för analys av progesteron med immunologiska metoder, varför resultat från prov med några av dessa avvikelser bör tolkas med försiktighet. För några instrument avråds från analys av prov med uppenbar hemolys, ikterus eller lipemi (29). Med immunologiska metoder finns det även risk för interferens av heterofila antikroppar, som reagerar med metodens antikroppar och leder till missvisande resultat (30). Detta finns beskrivet för ELISA analys av AMH (anti-mülleriskt hormon) hos hund (31). Även humant har heterofila antikroppar setts vid hormonanalys, däribland progesteron, med immunologiska metoder (32, 33), och det kan därför inte uteslutas att progesteronprovsvär som inte är överensstämmande med den kliniska bilden kan bero på interferens från heterofila antikroppar.

För analys av progesteron finns det olika möjligheter gällande analysmetod som beskrivet ovan, och det är mindre viktigt med täta provtagningar i jämförelse med LH, då det vid tiden för ovulationen inte ses en peak, som för LH, utan en kontinuerlig stegring tills maxnivån nås i diöstrus (2, 6, 7, 14). Det betyder att djurägaren inte behöver komma för provtagning lika frekvent som vid analys av LH. Det är även möjligt – till en gräns, att skicka prov för extern analys och fortfarande ha nytta av provsvaret vid planering av parning, vilket gör analys av progesteron mer kliniskt användbart än LH.

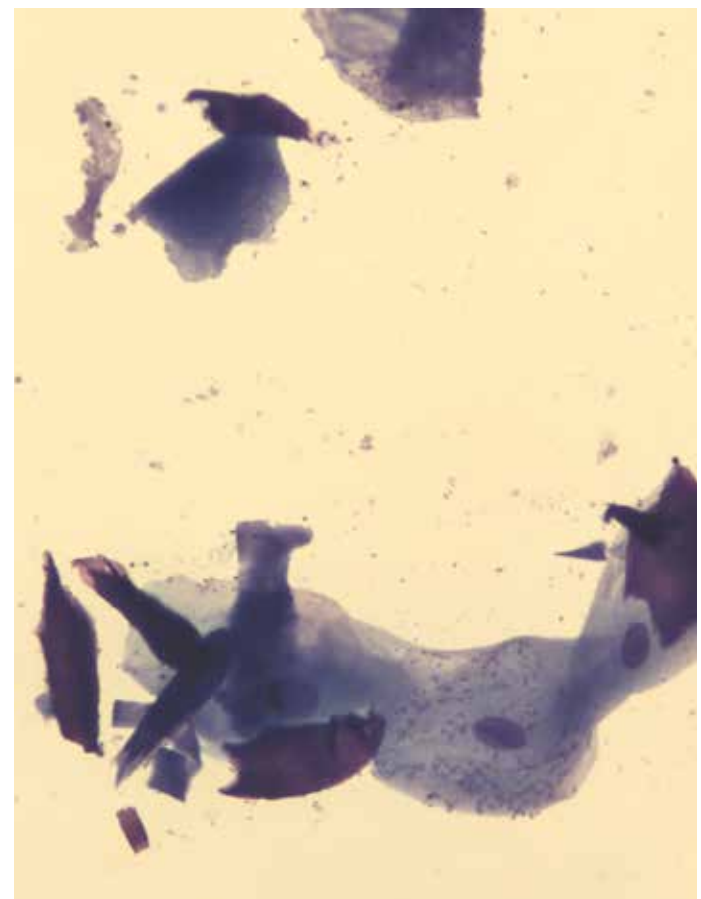
Analys av progesteron kan också användas för att planera AI (5, 6). Vid AI används antingen färsk eller fryst sperma, och spermerna har ofta en kortare livslängd (11), varför man för att uppnå bäst möjliga resultat bör inseminera vid den tiden där fertiliteten är bäst, det vill säga när oocyterna har mognat, vilket sker 2–5 dagar

efter ovulationen (2, 5), då progesteronkoncentrationen ofta ligger mellan 30 och 80 nmol/L (2, 5, 6).

Progesteronkoncentrationen vid parning kan även användas för att beräkna förväntat förlossningsdatum, då den kan användas för att retrospektivt fastställa när LH-peaken och ovulationen har inträffat (2, 3). Mäts progesteron varannan dag, kan dag 0 (dagen för LH-peaken) identifieras som dagen där progesteronkoncentrationen stigit från låg basal nivå till över 4,8 nmol/L, för att på följande provtagningsdag att vara över 9,5 nmol/L. Från denna

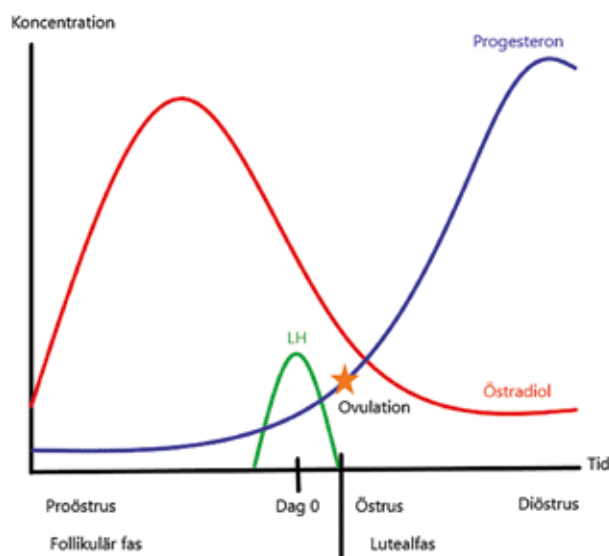


Figur 1. Ultraljud av vänster ovarie med follikelruptur. Bild lånad av Wojciech Atamaniuk, leg vet Anicura Regiondjursjukhuset Bagarmossen.



Figur 2. Vaginalcytologi med superficialceller och förhornat epitel.

räknas 65 dagar fram till förväntat förlossningsdatum (D65). Med denna metod kan beräknat förlossningsdatum +/- 1 dag fastställas med 67 procents säkerhet, +/- 2 dagar med 90 procents säkerhet och +/- 3 dagar med 100 procents säkerhet (3). Vidare ses det ett markant fall i progesteronkoncentrationen 24–40 timmar före förlossningen, och i några studier har fall i progesteronkoncentrationen använts för bedömning av om dräktigheten är fullgången inför kejsarsnitt (4, 7). I en annan studie har dock en ganska låg sensitivitet för bedömning av om dräktigheten är fullgången setts (46,88 procent), och därmed finns det risk att missa en förestående valpning om progesteron enbart analyseras vid ett provtagnings-tillfälle, då en stor andel av tikarna valpar trots en kvarstående ökat progesteronkoncentration (34).



Figur 3. Översikt över det hormonella förloppet vid proöstrus och östrus. Fritt skapat utifrån Concannon, P. (2011), Linde-Forsberg (1994) och Mellin (1976).

Diskussion

Det finns flera klara fördelar med analys av progesteron på plats. Till exempel behöver provet inte skickas vilket bidrar till lägre analyskostnader och snabbare svar. Djurägaren kommer även ha större tidsram för att resa för parning eller planering av AI, när resultat kommer direkt. Då flera av de instrument som erbjuder in-house analys dessutom redan finns på klinikerna, krävs inga extra kostnader för inköp av instrument och personalen är redan bekant med underhåll och hantering av instrumentet. Med in-house-analys följer även ansvaret för bedömning av eventuell interferens i form av hemolys, ikterus eller lipemi, och eventuell påverkan på resultatet, vilket ställer krav på personalens utbildning och kunskaper.

De instrument som finns tillgängliga för in-house analys av progesteron nyttjar olika immunologiska metoder, har olika mätområden, och det finns även skillnad i vilket provmaterial som kan analyseras (18, 19, 21, 23-25). Få studier har undersökt korrelationen mellan de olika instrumenten, varför det vid jämförelse av resultat från olika instrument finns risk för feltolkning av när ovulationen händer, samt av optimal tidpunkt för parning eller AI. Det kan ge sämre resultat och leda till ett förlorat förtroende för analysen och instrumentet från veterinärens sida och för kliniken från djurägarens sida, varför kommunikationen med djurägaren och planering av provtagning är essentiell. För att säkert kunna följa en individs progesteronnivåer och göra korrekta bedömningar utifrån dessa bör upprepade provtagningar utföras på samma klinik, eller åtminstone med samma typ av instrument, för säkrast resultat, och egna referensintervall för det instrumentet appliceras.

Ovulationen sker som tidigare angett när progesteron i blodet ligger mellan 12–24 nmol/L (1). För naturlig parning bör analysinstrumentet klara av att identifiera optimal parningstidpunkt (21, 23, 24). Vid användning för AI, där högre progesteronvärden oftast ska uppnås, finns risk att progesteronkoncentrationen vid den relevanta tidpunkten är högre än vissa av metodernas mätområde (2, 7). Då spädning av prov inför progesteronanalys inte rekommenderas för flera av de in-house instrument som är tillgängliga, kan de höga progesteronkoncentrationer som är aktuella för att identifiera den tidpunkt då oocyterna kan fertiliseras inte kvantifieras tillförlitligt med dessa instrument (24, 26) Det är därför viktigt att identifiera vad analysen ska användas till innan den tas i bruk.

UTRUSTNING FÖR REHAB OCH FRISKVÅRDSKLINIKER

GAIT4Dog - klinik och forskning,
FitFurLife löpband, FLIR, Djurvågar
samt övrig klinikutrustning.

Smartwalker - Vattentraskare
Smartcheck - Belastningsväg
Smartviber - Vibrationsbänk



4bens Rehab & Friskvård

Tel 076-776 11 01 | 4bensrehab@4bensrehab.se
www.smartwalker.se | www.4bensrehab.se

Konklusion

För utvärdering av hundens reproduktionscykel och fastställning av tidpunkt för ovulationen och optimalt parningsdatum, är analys av progesteron värdefullt, ofta i kombination med vaginalcytologi. Det finns olika möjligheter för analys av progesteron, dels analys på externt laboratorium, vilket leder till fördröjning innan provresultat erhålls och kostnader för transport, dels in-house analyser, där en acceptabel precision och korrelation med gold standard ses, till ett lägre pris och med en kortare svarstid. Man kan inte med säkerhet jämföra resultat från olika instrument och provmaterial, vilket bör tas i beaktande vid tolkning av provsvar,

och risk finns att det leder till diskrepans när djurägaren åker till olika kliniker inför parning eller AI. Det är även viktigt att veta metodens mätområde, speciellt om resultaten ska användas för att fastställa datum för AI.

Acknowledgement

Tack till kollegorna Helene Alm, leg veterinär, steg 1-specialist i hundens och kattens sjukdomar och Wojciech Atamaniuk, leg veterinär. Båda på Anicura Regiondjursjukhuset Bagarmossen. Tack även till Bodil Ström Holst, leg veterinär, DipECAR, docent, Universitetsdjursjukhuset, Sveriges Lantbruksuniversitet. •



REFERENSER

1. Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci.* 2011;124(3-4):200-10.
2. Hollinshead F, Hanlon D. Normal progesterone profiles during estrus in the bitch: A prospective analysis of 1420 estrous cycles. *Theriogenology.* 2019;125:37-42.
3. Concannon PW, Hansel W, Visek WJ. The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod.* 1975;13(1):112-21.
4. Concannon P, Hansel W, McEntee K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod.* 1977;17(4):604-13.
5. Kutzler MA, Mohammed HO, Lamb SV, Meyers-Wallen VN. Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology.* 2003;60(6):1187-96.
6. De Cramer KGM, Nothling JO. Curtailling parturition observation and performing preparturient cesarean section in bitches. *Theriogenology.* 2019;124:57-64.
7. Linde-Forsberg C. Accurate Monitoring of the Oestrus Cycle of the Bitch for Artificial Insemination. WSAVA XIX World Congress Durban *Theriogenology.* 1994.
8. Goodman M. Ovulation timing. Concepts and controversies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2001;31(2):219-35, v.
9. Mellin TN, Orczyk GP, Hichens M, Behrman HR. Serum profiles of luteinizing hormone, progesterone and total estrogens during the canine estrous cycle. *Theriogenology.* 1976;5(4):175-87.
10. Hase M, Hori T, Kawakami E, Tsutsui T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J Vet Med Sci.* 2000;62(3):243-8.
11. Root Kustritz MV. Managing the reproductive cycle in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42(3):423-37, v.
12. Linde CK, I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. *J small Anim Pract.* 1984;25:77-82.
13. Wildt DE, Chakraborty PK, Panko WB, Seager SW. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol Reprod.* 1978;18(4):561-70.
14. Groppetti D, Aralla M, Bronzo V, Bosi G, Pecile A, Arrighi S. Periovarian time in the bitch: what's new to know?: Comparison between ovarian histology and clinical features. *Anim Reprod Sci.* 2015;152:108-16.
15. Renton JP, Boyd JS, Harvey MJ, Ferguson JM, Nickson DA, Eckersall PD. Comparison of endocrine changes and ultrasound as means of identifying ovulation in the bitch. *Res Vet Sci.* 1992;53(1):74-9.
16. Wilborn RR, Maxwell HS. Clinical approaches to infertility in the bitch. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42(3):457-68, v.
17. Moxon R, Copley D, England GC. Quality assurance of canine vaginal cytology: a preliminary study. *Theriogenology.* 2010;74(3):479-85.
18. Chapwanya A, Clegg T, Stanley P, Vaughan L. Comparison of the Immulite and RIA assay methods for measuring peripheral blood progesterone levels in Greyhound bitches. *Theriogenology.* 2008;70(5):795-9.
19. Brugger N, Otsdorff C, Walter B, Hoffmann B, Braun J. Quantitative determination of progesterone (P4) in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay. *Reprod Domest Anim.* 2011;46(5):870-3.
20. Gloria A, Contri A, Carluccio A, Robbe D. Blood periovarian progesterone quantification using different techniques in the dog. *Anim Reprod Sci.* 2018;192:179-84.
21. Dri-Chem immuno AUV10 - Automated Fluorescence Immunoassay Analyzer. https://www.fujifilm.eu/fileadmin/content/medical_systems/Medical_Diagnostics/FUJI_DRI-CHEM_IMMUNO_AU10V.pdf; Fujifilm Cooperation, 26-30, NISHIAZABU 2-CHOME, MINATO-KU, TOKYO 106-8620, JAPAN 2011. p. 3.
22. Holst BS, Kushnir MM, Bergquist J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for analysis of endogenous steroids in the luteal phase and early pregnancy in dogs: a pilot study. *Vet Clin Pathol.* 2015;44(4):552-8.
23. Bilbrough GaG, T. Catalyst Progesterone for in-house measurement of progesterone in plasma from bitches. 2019.
24. Berlanda J. Evaluation Report Eurolyser canine Progesterone test kit (VT0230) on solo and CUBE-VET analyzers <https://www.eurolyser.com/veterinary-diagnostics/poc-test-parameters/cprog-test/>; 2018.
25. Monino A. D. P., Beccaglia, M., Milite, G., editor Accurate determination of serum progesterone using a Fluorescence Enzyme Immunoassay in the bitch. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction 2012; Whistler, Canada: IVIS.org.
26. Idexx. Catalyst Progesterone Quick Reference Guide <https://www.idexx.com/files/catalyst-progesterone-quick-reference-guide-en.pdf>; IDEXX Laboratories, Inc. One IDEXX Drive Westbrook, Maine 04092 United States; 2019. p. 1.
27. Volkman DH. The effects of storage time and temperature and anticoagulant on laboratory measurements of canine blood progesterone concentrations. *Theriogenology.* 2006;66(6-7):1583-6.
28. Thuroczy J, Wöfling A, Tibold A, Balogh L, Janoki GA, Solti L. Effect of anticoagulants and sampling time on results of progesterone determination in canine blood samples. *Reprod Domest Anim.* 2003;38(5):386-9.
29. Inc. IL. Catalyst Dx Chemistry Analyzer Operator's Guide. Idexx Laboratories Inc.; 2020. p. 63.
30. Bergman D, Larsson A, Hansson-Hamlin H, Svensson A, Holst BS. Prevalence of interfering antibodies in dogs and cats evaluated using a species-independent assay. *Vet Clin Pathol.* 2018;47(2):205-12.
31. Bergman D, Larsson A, Hansson-Hamlin H, Strom Holst B. Investigation of interference from canine anti-mouse antibodies in hormone immunoassays. *Vet Clin Pathol.* 2019;48 Suppl 1:59-69.
32. Check JH, Ubelacker L, Lauer CC. Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;40(2):139-40.
33. Langlois F, Moramarco J, He G, Carr BR. Falsely Elevated Steroid Hormones in a Postmenopausal Woman Due to Laboratory Interference. *J Endocr Soc.* 2017;1(8):1062-6.
34. Rota A, Charles C, Starvaggi Cucuzza A, Pregel P. Diagnostic Efficacy of a Single Progesterone Determination to Assess Full-Term Pregnancy in the Bitch. *Reprod Domest Anim.* 2015;50(6):1028-31.