



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Fakultet for Veterinærmedisin
Institutt for sports- og familiedyrmedisin
Seksjon for smådyrmedisin

Fordypningsoppgave 2019, 15 stp
Fordypningsretning smådyrmedisin

Celler og bakterier i jursekret hos normale tisper i pseudodrektighet Basert på kasuistikker

Cells and bacteria in the secretion from the mammary
gland during pseudopregnancy among normal bitches
Based on case studies

Marte Holmøy Bratteberg, Ellen Nordstoga Haldorsen
og Ida Vesterbakk
Kull 2013

Veiledere Lars Moe og Vibeke Rootwelt

Innholdsfortegnelse

Forord	5
Sammendrag	5
Definisjoner og forkortelser	6
Innledning	8
Bakgrunn	9
<i>Normal brunstsyklus hos tisper</i>	9
<i>Pseudodrektighet</i>	11
<i>Kjertelanatomi</i>	13
<i>Sammensetning og dannelse av melk</i>	16
<i>Celler i jursekret hos tisper</i>	17
<i>Bakterier i jursekret hos tisper</i>	17
<i>Mammatumor hos tisper</i>	18
<i>Forekomst av mammatumor hos ulike hunderaser</i>	22
Materiale og metoder	22
<i>Materiale</i>	22
<i>Studiedesign</i>	23
<i>Studieenhet</i>	23
<i>Referansepopulasjon</i>	24
<i>Studiepopulasjon</i>	24
<i>Studieutvalg</i>	24
<i>Etablering av studieutvalget</i>	24
<i>Metoder</i>	25
<i>Laboratorieprosedyrer</i>	27
Bakteriologisk dyrkning	27
Cytologi/cellefarging	28

Farging av preparater	29
<i>Mikroskopering</i>	29
<i>Statistiske metoder</i>	31
Signifikansnivå og konfidensintervall	31
Utvalgsstørrelse og presisjon	31
Resultater	31
<i>Kasus 1</i>	31
Undersøkelse og makroskopisk utseende	32
Cytologisk analyse	32
Bakteriologisk dyrkning	34
<i>Kasus 2</i>	34
Undersøkelse og makroskopisk utseende	34
Cytologisk analyse	34
Bakteriologisk dyrkning	36
<i>Kasus 3</i>	36
Undersøkelse og makroskopisk utseende	36
Cytologisk analyse	37
Bakteriologisk dyrkning	40
<i>Kasus 4</i>	40
Undersøkelse og makroskopisk utseende	40
Cytologisk analyse	41
Bakteriologisk dyrkning	44
<i>Totalfordeling av celler hos hver enkel jurkjertel hos hvert individ</i>	44
<i>Samlet resultat fra bakteriologisk analyse</i>	45
Diskusjon	45
<i>Bakteriologi og forurensning</i>	45
<i>Cytologi</i>	47

Cytologisk undersøkelse hos de ulike hundene	48
<i>Tidspunkt for prøvetaking</i>	55
<i>Palperbare strukturer i jurkjertel</i>	55
<i>Feilkilder</i>	56
Utvalg og utvalgsstørrelse	56
Kjertler som enhet	57
Tidspunkt for prøveuttak	57
Prøveuttak og analyse	58
Tumor vs. epiteliale celler	58
Eieropplysninger	59
Konklusjon	59
Takk til bidragsytere	61
Summary	62
Referanser	64
Vedlegg	68
<i>Vedlegg 1: Infoskriv til hundeeier</i>	68
<i>Vedlegg 2: Analyseskjema cytologi</i>	69
<i>Vedlegg 3: Spørreskjema til eiere/samtykkeskjema</i>	70
<i>Vedlegg 4: Undersøkelsesskjema</i>	71
<i>Vedlegg 5: Søknad om pengestøtte til Hundekreftregisteret</i>	72

Forord

Fordypningsoppgaven omhandler et lite studert tema. Det er derfor rimelig å tenke seg at oppgaven kan bidra til mer kunnskap blant veterinærer om pseudodrektighet og eventuelt tidlig diagnostikk av mammatumores hos tisper, samt øke interessen for videre forskning. Dette har vært motiverende faktorer for valget av nettopp denne oppgaven.

Sammendrag

Tittel: Celler og bakterier i jursekret hos normale tisper i pseudodrektighet

Basert på kasuistikker

Forfattere: Marte Holmøy Bratteberg, Ellen Nordstoga Haldorsen og Ida Vesterbakk

Veiledere: Lars Moe og Vibeke Rootwelt, Institutt for sports- og familiedyrmedisin

Denne undersøkelsen omhandler celler og bakterier i jursekret hos pseudodrektige tisper. Oppgaven er en pilotstudie, innen et lite kjent fagområde. I denne pilotstudien er det våren 2019 tatt speneprøver til cytologi og bakteriologisk dyrkning av fire tisper av ulike raser. Tispene hadde mellom åtte og ti spener hver. Prøvene ble tatt på Universitetsdyresykehuset ved NMBU og dyrkningen ble gjort ved seksjon for mikrobiologi, immunologi og parasittologi ved NMBU Veterinærhøgskolen. De cytologiske preparatene ble montert etter farging med to ulike fargemetoder (Hemacolor og May-Grünwald Giemsa). Ved prøvetaking ble hundene undersøkt klinisk, inkludert undersøkelse av jur og utseende av jursekret.

Jursekretet fra de pseudodrektige tispene ble undersøkt cytologisk og sett i sammenheng med jurundersøkelse og makroskopisk utseende på sekret. Jursekret ble også sådd ut på blodagar samme dag som prøvetaking og analysert for vekst ved to ulike avlesninger. Resultatene ble

sammenlignet med den begrensede faglitteraturen som allerede eksisterer, hva gjelder cytologisk sammensetning av hundemelk

Av vesentlige funn var det 1) ikke bakterier i jursekretet fra noen av tispene til tross for at det i noen av kjertlene var store mengder betennelsesceller, og noen kjertler var hovne og hadde makroskopisk pussaktig sekret, 2) vesentlige forskjeller cytologisk, sammenlignet med hundemelk, spesielt med hensyn til epitel- og skumceller. Det ble funnet en lavere forekomst av epitelceller og en høyere forekomst av skumceller og 3) tumorceller i flere kjertler, men det ble ikke påvist noen sammenheng mellom palperbar nydannelse og tumorceller i sekret.

Resultatene i denne pilotstudien er både spennende og overraskende og gir grunnlag for videre forskning på området.

Definisjoner og forkortelser

Corpus luteum: Progesteronproduserende legeme etter den ovulerte follikkel, i ovariet (1).

Dopamin agonister: Legemidler som kjemisk ligner på dopamin og som stimulerer dopaminreseptorer i hjernen (2).

Dysplastiske: Dysplasi, vekstforstyrrelse, brukes om enten unormal utvikling eller celleforandringer (3).

Gestagen: Hormoner eller legemidler som bidrar til å opprettholde svangerskap, f.eks progesteron (4).

Gestagene hormoner: Hunnlig kjønnsormoner produsert av det gule legemet i eggstokkene

Homeostase: Organismens opprettholdelse av konstante og stabile fysikalsk-kjemiske forhold i væskemiljøet som omgir de enkelte celler, det såkalte “indre miljø” (5).

Hemacolor (HC): Vanlig fargemetode for blodutstryk (4), også kjent som diff quick.

Hyperplastiske: Hyperplasi er økt vekst i ett vev, med økt antall celler av den celletypen som normalt skal være der (4).

Karsinogenese: Opprinnelsen til eller dannelsen av kreft. Begrepet brukes også som betegnelse på den prosessen eller de mekanismene som forandrer en normal celle til en kreftcelle (6).

May Grünwald Giemsa (MGG): Vanlig fargemetode for blodutstryk (4).

Melk: Et gulhvitt sekret fra kjertler hos hunnpattedyr som er bestemt til å være avkommets første næring. Melken inneholder vanligvis alle stoffer og vitaminer som er nødvendig for avkommets livsopphold og utvikling i en begrenset periode (7).

Meiose: Prosessen hvor diploide celler blir haploide kjønnsceller (8).

Myoepitelceller: Kontraktile celler som dekker utsiden av basalmembranen i jurkjertelvevets utførselsgang. Cellene spiller en viktig rolle i transporten av melk gjennom melkegangen (9).

Oksytocin: Er et hormon som forårsaker kontraksjon av glatte muskelceller i uterus og celler som omgir alveoler i jurkjertelvev (10).

Oocyt: Hunnlig haploid kjønnselle (1).

Peripueriet: Tiden omkring fødsel (4).

Progesteron: Et steroidhormon som dannes i eggstokkene og placenta hos hunndyr, og i binyrebarken hos både hunn- og hanndyr (11).

Prolaktin: Et proteinhormon som skilles ut fra fremre del av hypofysen. Det er mest kjent for sin evne til å stimulere vekst og modning av de melkeproduserende kjertlene i jurvev (12).

Pseudodrektighet: Et klinisk fenomen hvor ikke-drektige tisper utvikler maternal atferd og fysiske tegn på drektighet (13).

Puerperiet: Tiden etter fødsel (4).

Sekret: Utskillelsesproduktet fra en kjertel (14).

Skvamøse epitelceller: Flate og tynne epitelceller som er spesialisert for rask og effektiv stoffutveksling (15).

Skumceller: Makrofager som blant annet finnes i fettavleiringer i blodåreveggen. De inntar low-density lipoproteiner og blir fylt med lipider, hvilket gir det skum-aktige utseendet (16).

Østrogen: Substanser som forårsaker østrus. Produseres i ovarier, placenta, binyrebarken og testikler (1).

Innledning

I denne studien har vi studert innholdet av celler og bakterier i jursekretet hos pseudodrektige tisper. Dette er et lite studert område. Vi har først og fremst kartlagt hva jursekretet inneholder basert på de fire tispene som er inkludert i denne studien. Deretter har vi vurdert om funnene våre kan brukes til å si noe om det foreligger en mulig assosiasjon for utvikling mammatumor. I studien har vi undersøkt sammenhengen mellom innhold og andelen av spesifikke celler og bakterier, fra sekret hos pseudodrektige tisper av raser med høy forekomst av mammatumor. Formålet med oppgaven var derfor å finne ut hva dette sekretet egentlig består av og om det er noen forskjell i sekretinnhold fra de ulike hundene som ble undersøkt. Funnene er basert på fire normale tisper, av ulike raser, der alle er av raser med høy forekomst for utvikling av mammatumor. Opprinnelig ønsket vi å studere tisper av raser med høy forekomst av mammatumor, og sammenlikne disse med en kontrollrase med lav forekomst av mammatumor. I arbeidet med vår studie viste det seg å være overraskende vanskelig å finne hunder og eiere av de valgte rasene som ville delta, som også oppfylte alle våre kriterier, og som var pseudodrektige i perioden for prøvetakning. Materialet vårt endte derfor med å være et annet enn det vi hadde planlagt. Totalt inkluderer denne studien fire kasuistikker, av rasene engelsk setter, dachs, boxer og bichon frisé. Dette er altså en kombinasjon av et litteraturstudie og kasuistikker.

Vår undersøkelse kan bli en liten del av et potensielt større forskningsprosjekt og kan derfor betegnes som et såkalt pilotstudie. Vi har begrenset oppgaven vår med antall raser og antall individer. I tillegg har vi lagt begrensninger på hva som skal undersøkes i prøvene, og hvilke prøver vi skal ta. Grunnen til at vi har bestemt oss for disse begrensningene er at dette er et lite undersøkt område hvor det først og fremst er behov for å innhente grunnleggende informasjon. I tillegg har vi en tidsramme å forholde oss til, samt begrensede ressurser.

Formålet med oppgaven var altså å kartlegge hva jursekret består av, og vurdere nytteverdien av dette innholdet i forbindelse med tidlig diagnostikk av mammatumor hos tisper.

Bakgrunn

Normal brunstsyklus hos tisper

Tisper blir vanligvis kjønnsmodne når de er mellom seks og 24 måneder gamle (17). Hunder har en østralsyklus, i likhet med andre ikke-primater. Østrus defineres som perioden tisper er mottakelig for paring. Tisper står for hannhunden i løpet av denne perioden av brunstsyklusen. Tidsintervallet fra starten av østrus til den neste starten av østrus kalles en syklus (1). Hunden er en monoøstral dyreart, det vil si at de bare har én brunst etterfulgt av en lutealfase som siden går direkte over i anøstrus (18). Den normale reproduksjonssyklusen hos tisper kan kategoriseres i fire ulike faser: proøstrus, østrus, metøstrus og anøstrus. Syklusene opptrer i intervaller på mellom fire og 18 måneder, med et gjennomsnitt på syv måneder (17).

Anøstrus er en inaktiv fase (17). Det er tiden mellom to brunstperioder. Eggstokkene er inne i en hvilefase, og hormonnivået av hovedsakelig østrogen og progesteron vil derfor være lavt gjennom hele perioden (19). Normalt vil ikke tisper være attraktiv eller mottakelig for hannhunder i denne fasen. Vulva er liten og uten flytninger (17). Den naturlige termineringen av anøstrus indueres av en økt pulserende frisetting av gonadotropin-releasing hormon (GnRH) fra hypothalamus. GnRH vil igjen føre til frislipp av follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH) fra hypofysen (17). Det er usikkert hva det er som setter i gang denne endringen, og dermed terminering av anøstrus. Endringer i daglengder, temperatur ute, røyting og andre ytre faktorer kan påvirke tidspunktet for når tisper går over fra anøstrus til proøstrus (18).

Det skjer en moderat økning av gjennomsnittskonsentrasjonen av FSH og en mild økning av konsentrasjonen av LH gjennom anøstrus. Mot slutten av anøstrus og i overgangen til proøstrus øker frisettingen av FSH som fører til follikkelvekst i ovariene og overgangen til proøstrus. Både østrogen- og progesteronkonsentrasjonen er på et lavt nivå i sen anøstrus. Anøstrus varer normalt i seks måneder, men kan variere fra en til 12 måneder (17).

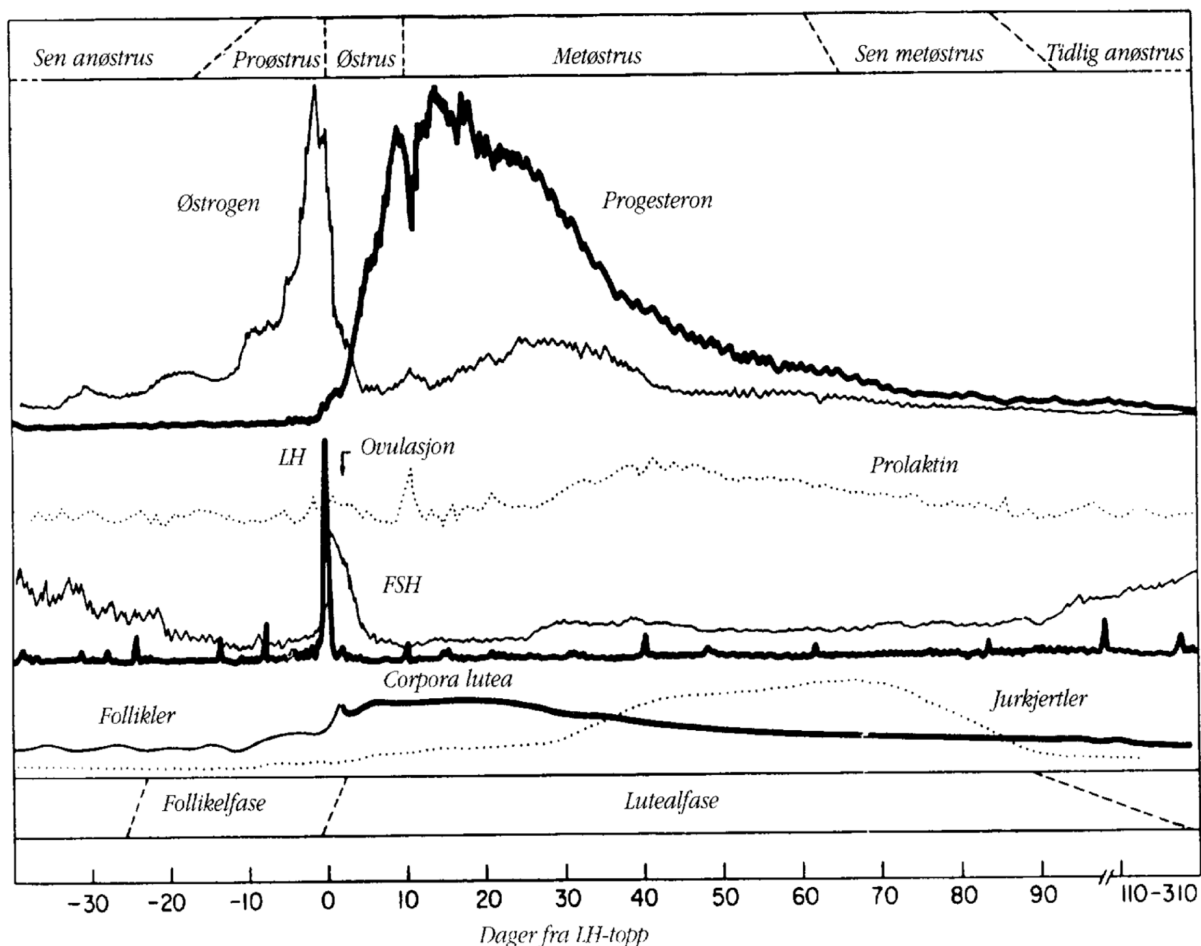
FSH nivåene er lave gjennom hele proøstrus, men stimulerer follikkelveksten i ovariene og stiger frem mot eggløsning. Det vokser frem flere follikler og det er trolig de største av disse som produserer østrogen. Det er stigningen av østrogen som fører til at tisper går over i

proøstrus. Vulvaleppene svulmer opp og det kommer blodig utflod fra vulvaåpningen. Mot slutten av proøstrus øker tispas interesse for hannhunden. Proøstrus varer gjennomsnittlig i ca 14 dager, før den går over i østrus (18). I likhet med FSH, er også LH lav gjennom det meste av proøstrus, men stiger rett før ovulasjon. Østrogen øker fra en lav basal konsentrasjon og har sin topp ved sen proøstrus, mens progesteron holder seg lav frem til LH stigningen. Follikkelfasen av syklusen sammenfaller med proøstrus og veldig tidlig østrus (17).

Østrus, tispas høybrunst, er når tispas står for hannhunden. Denne perioden varer i ca ni dager. Dette inntreer i sammenheng med frisetting av LH som endrer steroidproduksjonen i ovariene fra østrogen til progesteron (18). Østrogenkonsentrasjonen går kraftig ned etter at LH-toppen er forbi, mens progesteron øker jevnt. Dette markerer lutealfasen i syklusen (17).

Progesteronnivået i blodet begynner å stige allerede før eggøsning, på grunn av preovulatorisk luteinisering av folliklene, men stiger raskere etter eggøsning. Ovulasjonen skjer som regel over flere timer, og kommer vanligvis ca 48 timer etter den maksimale frisettingen av LH, ovulasjonen skjer altså i tidlig østrus. Oocytten ovuleres som en primær oocyt og det går ca 48-72 timer etter eggøsning før meiose 1 er fullført og egget kan befruktes. Etter meiose 1 er eggets levetid kort. Etter ovulasjon domineres kjønnsorganene av progesteron produsert i *corpus luteum*, og progesteron stiger raskt etter eggøsning (18).

Fordi hunden er en monoøstral dyreart etterfølges ikke østrus av en ny brunst dersom dyret ikke blir drektig. Lutealfasen kalles derfor metøstrus og ikke diøstrus som hos polyøstrale arter. I denne fasen produserer *corpus luteum* progesteron, både hos drektige og ikke drektige tisper. Det er ikke en signifikant forskjell i progesteronnivået hos drektige og ikke drektige tisper (18). Progesteronnivået øker og når en topp tidlig i metøstrus, før en jevn nedgang utover i denne fasen. Nivået av progesteron påvirkes også av LH skilt ut fra hypofysen og konsentrasjonen av prolaktin. Under metøstrus er østrogenkonsentrasjonen noe varierende, men generelt på et lavt nivå. Metøstrus varer vanligvis i to til tre måneder dersom tispas ikke blir drektig. Prolaktinkonsentrasjonen stiger når progesteronnivået faller, og metøstrus termineres. Prolaktinnivået stiger både hos drektige og ikke drektige tisper, men i mye større grad hos de som er drektige. Jurkjertelvevet responderer på det økte nivået av prolaktin og vevet tiltar i størrelse (17).



Figur 1. Skjematisk framstilling av hormonelle forandringer under brunst, metøstrus og tidlig anøstrus hos en ikke-drektig tisper (etter Concannon et al. 1977). Ikke innhentet tillatelse fra forlaget til å bruke figuren.

Pseudodrektighet

Pseudodrektighet er et normalt fysiologisk fenomen som oppstår hos tisper i metøstrus (20). Kjente synonymer inkluderer innbilt drektighet, pseudocyese, nervøs laktasjon, fantomdrektighet og “copycat pregnancy”. Pseudodrektighet er sannsynligvis forårsaket av fall i progesteron assosiert med slutten på lutealfasen, som igjen gir en økning i prolaktin. Prolaktin fører til laktasjon og maternal atferd rundt det tidspunktet tisperen skulle ha valpet, dersom hun faktisk var drektig (13). Pseudodrektighet simulerer altså peri- og postpuerperiet, selvom den kliniske graden av det varierer. Vanlige symptomer er vekt oppgang og jurutvikling, og mange endrer også atferd (20). Atferdsendringene er kanskje det som varierer mest mellom individer, mens de fysiologiske endringene sannsynligvis er ganske like hos alle tisper i metøstrus. Atferdsendringer kan være av maternal karakter, som å adoptere

gjenstander som simulerer valper eller grave i liggeplasser, eller de kan være mer generaliserte som nedstemthet og dårlig appetitt.

Tilstanden kan vedvare over lengre tid dersom jur blir tømt (av eier, annen hunds valper, kattunger eller tisper selv) og dersom miljøfaktorer er tilstede. Miljøfaktorer kan være leker, sko, bamser og andre ting som kan simulere valper.

Pseudodrektighet er ikke assosiert med noen reproduktive abnormaliteter, inkludert pyometra og infertilitet. Symptomer på pseudodrektighet indikerer også at det har vært en eggøsning og at hypothalamus-hypofyse-ovarie akselen er intakt. Hvorfor noen tisper utvikler mer kliniske tegn enn andre og hvorfor graden av kliniske tegn kan variere fra sykklus til sykklus, er lite studert.

Pseudodrektighet kan inndeles i den kliniske tilstanden hvor symptomer er tydelig tilstede og den mer fysiologiske tilstanden, uten særlig påvirkning av atferd. Alle intakte tisper blir altså pseudodrekte, men i mer eller mindre klinisk grad. Pseudodrektighet kan også utvikles som et resultat av kastrering dersom inngrepet ble foretatt mens tispene var i metøstrus (21).

Klinisk pseudodrektighet karakteriseres av maternal atferd som redebygging, adoptering av objekter eller andre dyr, samt jurutvikling og melkeproduksjon. I tillegg kan tispene bli rastløse, irritable, få økt bukromfang, anorexi og oppkast. De kliniske tegnene er selvbegrensede og forsvinner vanligvis etter 2-3 uker. Behandling bør vanligvis ikke være nødvendig. Hvis uttalte kliniske tegn varer i mer enn 2-3 uker kan det være indikasjon for at tispene blir undersøkt for hypothyroidisme (13). Noen steder i litteraturen anbefales det også å redusere fôrmengde, samt å øke aktivitetsnivået (13), mens det andre steder står at å kortsiktig fjerne eller redusere fôrinntak ikke har noen fordeler ved behandling av klinisk pseudodrektighet (22). Å avlede tispene fra maternal atferd, er derimot beskrevet flere steder som nyttig. Medisinsk behandling, som dopaminagonister kan også være aktuelt for å redusere laktasjon (22). For tisper som plages mye av dette kan ovariohysterektomi være aktuelt, dette må da skje i anøstrus (20).

Kjertelanatomi

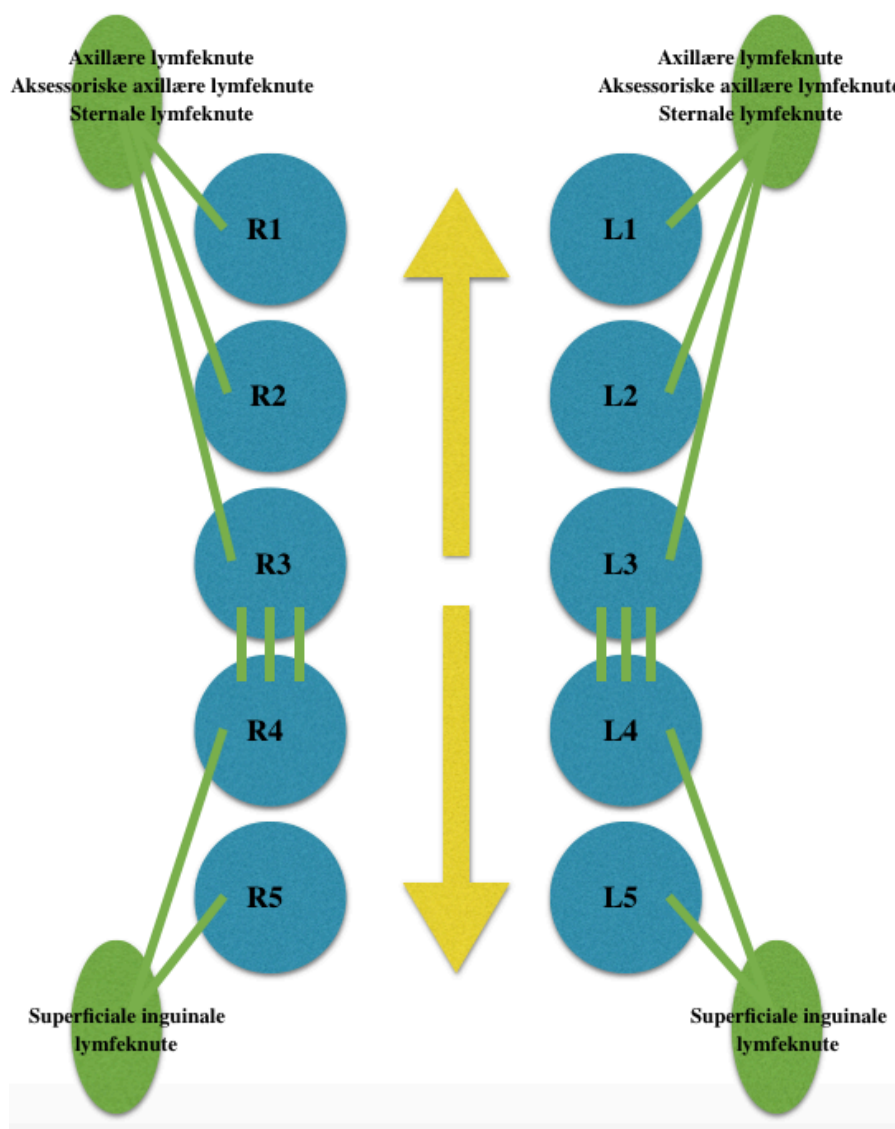
Antall spener hos hund varierer mellom åtte og ti spener. I enkelte tilfeller kan tispene ha opptil 12 spener totalt. Antall kjertelkomplekser på hver side av midtlinjen varierer altså mellom fire og fem, noen ganger seks. Store raser har vanligvis 10 spener, mens mindre raser kan ha åtte. Ved hunder som har 10 spener kan disse inndeles i to par med thorakale spener, to par med abdominale og ett par med inguinale. De abdominale og thorakale kan igjen deles opp i kranial abdominal, kranial thorakal osv. Den kanskje mest brukte inndelingen er likevel L1-L5 og R1-R5 hvor man teller kranialt til kaudalt på høyre og venstre side.

På hver enkelt spene er det mellom åtte og 20 små åpninger for sekresjon. Disse er fordelt uregelmessig på tuppen av spenen. Hver av disse åpningene representerer en inngangsport for agens. Denne anatomiske oppbygningen gjelder også for kvinner.

Det kraniale torakale speneparet (L1 og R1) forsynes av blod fra to sternale grener av den interne torakale arterien. Det kaudale torakale speneparet (L1 og R2) forsynes av små grener av den mediastinale arterien som også anastomoserer med sternale grener til L1 og R1. De resterende L3-L5 og R3-R5 forsynes av femorale arterier (23).

Lymfedrenasje fra R1-R3 og L1-L3 dreneres kranialt til den axillære, aksessoriske axillære og sternale lymfeknuten. L3 og R3 kan også hos noen hunder dreneres kaudalt. Både L4-L5 og R4-R5 dreneres av den superficiale inguinale lymfeknute (24). Lymfedrenasjen hos hund er illustrert i Figur 2.

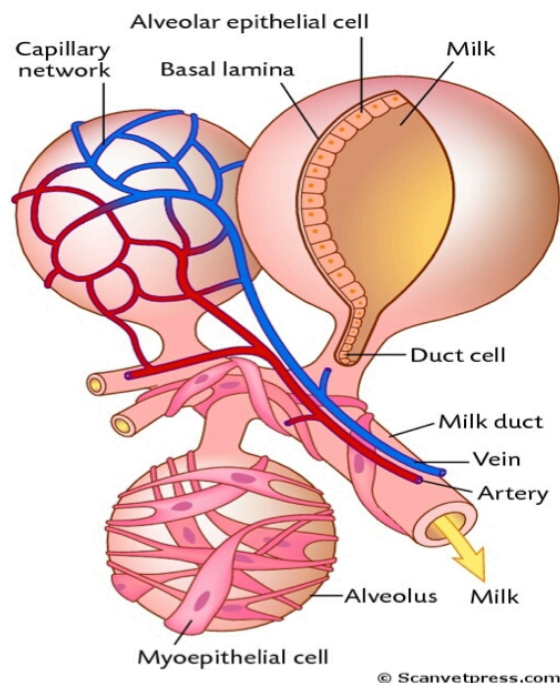
Melk produseres i kjertler som er dannet fra hudepitel mot slutten av den embryologiske utviklingen. Hule, sirkulære strukturer er det funksjonelle elementet i den lakterende kjertelen, kalt alveoler. Melk dannes i epitel som danner overflaten i lumen av alveolene. Alveolelumen har forbindelse med små ekskretoriske kanaler som transporterer melken inn i større kanaler. Disse kanalene ender så til slutt i spenetuppen på hudoverflaten. Alveolene og kanalene er omringet av et nettverk med kontraktile myoepitelceller (9).



Figur 2. Lymfedrenasje hos hund

Ved fødsel er juret dårlig utviklet, og forskjellen mellom hunnkjønn og hannkjønn er relativt liten. Videre utvikling av jurtev skjer i puberteten. Dette kalles den primære jurutviklingen. Den sekundære jurutviklingen skjer når dyret blir drektig. Den primære jurutviklingen stimuleres i hovedsak av østrogen, men også progesteron. Ved sekundær jurutvikling stimuleres veksten i større grad av progesteron, og prolaktin øker utover i drektigheten. Prolaktin er nødvendig for fullstendig jurutvikling (9).

Det er i hovedsak to spesielle forhold hos hund når det gjelder jurutvikling. Det første er at sekundær jurutvikling forekommer uansett, pseudodrektig eller drektig. Det andre, er at hund har en spesielt stor sekundær jurutvikling sammenlignet med andre arter. En tisper utenfor syklus har ikke særlig mer jur enn en hannhund, men om man ser på mennesker (og flere andre arter) har kvinner bryster, også utenom laktasjon og syklus. Når laktasjonen eller pseudodrektigheten er ferdig tilbakedannes store deler av kjertelvevet, nesten helt tilbake til nivå ved pubertet (25).



Figur 3. Organisering av det sekretoriske apparatet i jurkjertel (etter Sjaastad, Sand, Hove. 2010). Ikke innhentet tillatelse fra forlaget til å bruke illustrasjonen.

Jurutvikling og tilbakedannelse av jurvev er en energikrevende prosess. For å forstå hvorfor intakte tisper unødvendig bruker energi på dette flere ganger i året, må man tilbake til evolusjonen. Hund (*Canis Familiaris*) ble domestisert fra ulv (*Canis Lupus*) for mer enn 30000 år siden i ulike steder i verden. Avl inn i raser, har til sammenligning, kun pågått i et par hundre år. Hund regnes i dag som en underart av ulven. Ulvene levde i familiegrupper bestående av et monogamt par, med ett eller flere kull med avkom. Valpene ble i familien til de ble voksne og startet sin egen familiegruppe. Mor i familiegruppen var den eneste som fikk pare seg og få valper. Disse ble båret fram og født av henne, men selve oppdragelsen, stellet og ammingen av valpene ble gjort like mye av andre tisper i flokken, som var pseudodrektige. På denne måten kunne ulvetispa raskt komme seg ut på jakt for å skaffe mat til flokken, mens andre medlemmer tok seg av valpene. Hund og ulv er i dag ganske forskjellige på mange måter, men dette er altså en av egenskapene som fortsatt eksisterer, i større og mindre grad, hos hund (26).

Sammensetning og dannelse av melk

Hundens sammensetning av melk endrer seg gjennom laktasjonen (23). Som tabell 1 viser, er fettandelen i hundemelk vesentlig høyere enn hos ku og kvinne.

Tabell 1. Sammensetningen av melk i midtlaktasjon hos tisper, ku og kvinne.

Dyreart	% Tørrstoff	% Fett	% Protein	% Karbohydrat	% Aske
Tisper	22,5	9,5	7,5	3,8	1,1
Ku	12,4	3,7	3,2	4,6	0,7
Kvinne	12,4	4,1	0,8	6,8	0,2

Drektige tisper vil utvikle tydelig jurkjertelvev innen dag 45 av drektigheten. Sekresjon av melk starter normalt ved fødsel (27). Prolaktin skiller ut av hypofysens forlapp og stimulerer vekst og modning av kjertelvev. Det påvirker også produksjonen av ulike komponenter i melken. Antall prolaktinproduserende celler i hypofysen øker ved drektighet. Utskillelsen skjer i pulser og reguleres hovedsakelig av dopamin fra hypothalamus. Dopamin hemmer både frigjøring og dannelse av prolaktin, det er altså fravær av dopamin som gir prolaktin syntese og utskillelse. Prolaktin bindes til reseptorer hos målceller, i blant annet jurkjertelvev hvor det starter og vedlikeholder melkeproduksjon (12).

Like før fødsel skiller det ut en puls med prolaktin, før utskillelsen synker igjen i et par dager. Etter dette vedlikeholdes prolaktinutskillelse ved amming (27).

Oksytocin skiller ut fra hypofysens baklapp og har effekter som uteruskontraksjoner og nedgivning av melk. Tisper skiller ut oksytocin ved fødsel og ved stimulering av spener fra valper. Stimulering av oksytocinreseptorer gir sammentrekning av muskelvev, både i uterus og i jurkjertelvev. Under drektighet hemmes oksytocin av progesteron som gjør uterus lite følsom for oksytocin (10).

Celler i jursekret hos tisper

Det finnes få studier som har undersøkt hva hundemelken under laktasjon består av på cellenivå. I en studie fra 2018 ble det undersøkt forekomst av mastitt hos 89 tisper i laktasjon, basert på klinisk undersøkelse og cytologi. I denne studien ble det konkludert med at sekret fra klinisk friske jurkjertler inneholdt somatiske celler, mye celledetritus, mange skvamøse epitelceller og få nøytrofile granulocytter, makrofager, erytrocytter og skumceller (28).

Bakterier i jursekret hos tisper

Hos lakterende tisper er det normalt moderat forekomst av bakterier i melk (25), uten at dette er ensbetydende med mastitt. Forekomsten av bakterier i jursekret fra pseudodrektige tisper er ikke undersøkt.

Ved mastitt hos tisper er stafylokokker og streptokokker de mest vanlige bakteriene å isolere fra tisper. I noen tilfeller kan coliforme bakterier (*E.coli*) også forekomme. Kilden til bakteriene kan være kutan, eksogen eller hematogen. Symptomer på mastitt er rødme, hevelse, smerte, varme og nedsatt funksjon. Den viktigste behandlingen av mastitt er hyppig tømming av jur (13).

Hos kvinner er årsaken til mastitt tilstoppede melkeganger eller infeksjon med agens. I Norge ammer ca 60000 kvinner hvert år. Rundt 10% av ammende kvinner utvikler mastitt (29). I en studie som inkluderte 2 577 565 kvinner, så man på sammenhengen mellom mastitt og mammatumor. Konklusjonen var at det er en mildt økt risiko for utvikling av mammatumor for kvinner som også tidligere har vært diagnostisert med mastitt, sammenlignet med dem som ikke har vært det (30). Siden den anatomiske oppbyggingen av tispers jur og kvinners bryster er lik, kan det tenkes at mastitt hos hund også kan disponere for økt forekomst av mammatumor. Dette er dog ikke blitt undersøkt hos hund tidligere.

Mammatumor hos tisper

Det finnes ulike mammatumores hos hund. Mammatumores kan være maligne eller benigne. Tumorvevet oppstår som oftest i det epiteliale kjertelvevet, men kan også ha et ikke-epitelialt opphav (31). Kjertelvevet består av tre distinkte vevstyper; epitelialt, myoepitelialt og mesenchymalt kjertelvev. Mammatumores kan ha opphav fra en eller flere av disse vevstypene og klassifiseres oftest deretter. I tillegg tas det hensyn til malignitetsgrad (32). I 1974, kom World Health Organization (WHO) med den første klassifiseringen av tumores hos husdyr, som også inkluderte tumores og dysplasi av jurkjertelvevet (33). Denne klassifiseringen baserte seg på deskriptiv histologisk morfologi av mammatumor. Siden den tid er det blitt foreslått en rekke ulike klassifiseringer. I dag er det klassifiseringen fra Goldschmidt et al. 2011 (33) som er den mest oppdaterte og anerkjente klassifiseringen av mammatumor hos hund. Tumorvev oppstår ved forstyrrelser i den cellulære homeostasen. Dette er forstyrrelser i form av hyperplastiske, dysplastiske eller regenerative forandringer (34). Mekanismene og prosessen bak omdannelsen av en normal celle til en kreftcelle, den såkalte karsinogenesen er fortsatt ikke fullstendig forstått (6). Det er likevel kjent at gener spiller en avgjørende rolle i karsinogenesen. Det er i stor grad enighet om at kreft er en genetisk sykdom (35). Genmutasjoner og kromosomforandringer kan være arvelige, men forskning på området viser også at epigenetiske og miljøfaktorer spiller en vesentlig rolle for utviklingen av mange kreftformer (35).

Mammatumor har vært den nest vanligste krefttypen som diagnostiseres hos norske hunder (tisper og hannhunder), og utgjorde 30% av alle registrerte svulster hos tisper og hannhunder i tidsperioden 1990-1998 som ble utført av det norske hundekreftregisteret (36). I følge hundekreftregisteret utgjorde mammatumor nesten 50% av alle svulster som ble registrert hos norske tisper (36).

Tabell 2. Klassifisering av mammatumor fra Goldschmidt et al. 2011

Maligne	Benigne
1. Simpelt karsinom: <ul style="list-style-type: none"> • Tubopapillære karsinom • Tubulær karsinom adenokarsinom • Solid karsinom • Anaplastisk karsinom 	1. Adenom: <ul style="list-style-type: none"> • Simpelt adenom • Intraductalt papillært adenom • Komplekst adenom • Basaloid adenom
2. Karsinom in situ	2. Fibroadenom
3. Komplekst karsinom	3. Benign blandingstumor
4. Spesielle typer karsinom: <ul style="list-style-type: none"> • Spindelcelle karsinom • Skvamøs cellekarsinom • Mucinøs karsinom • Lipidrikt karsinom • Inflammatorisk karsinom 	4. Ductal papillom
5. Karsinom som oppstår fra blandingstumor	5. Myoepiteliom
6. Karsinosarkom	6. Mamma hyperplasi og dysplasi: <ul style="list-style-type: none"> • Ductal hyperplasi • Lobulær hyperplasi • Cyster • Duct ektasi • Fokal fibrose • Gynekomasti
7. Sarkom: <ul style="list-style-type: none"> • Fibrosarkom • Osteosarkom • Andre sarkom 	
8. Komedokarsinom	

Hundekrefregisteret tok også for seg forekomsten av jursvulster hos ulike hunderaser. Registeret bekreftet at det er en klar sammenheng mellom hunderase og forekomsten av mammatumorer. Det er derfor sannsynligvis en tydelig genetisk komponent i forbindelse med utviklingen av mammatumor hos hund. Det er rimelig sannsynlig at det er de samme tallene som også gjelder i dag.

Miljøpåvirkninger som for eksempel administrering av gestagene hormoner og østrogen til tisper, har også vist seg å øke risikoen for utviklingen av mammatumor (37). Normalt jurvev har reseptorer for progesteron, østrogen, epidermal vekstfaktor og prolaktin. Det er antatt at mange mammatumores er hormonavhengige og at disse hormonene spiller en avgjørende rolle i karsinogenesen i jurvevet. Progesteroninduserte mammatumores har for eksempel mekanismen til å kunne oppregulere produksjonen av veksthormon (GH) i jurkjertelen. Veksthormon stimulerer til vekst i jurvevet i tillegg til å ha en indirekte påvirkning av insulinlignende vekstfaktor (IGF), noe som kan tenkes å vedlikeholde og akselerere tumorutviklingen (38). En studie fra 2012 viser derimot at det ikke er noen sikre bevis for hormoninduserte mammatumores (39). Den beskyttende effekten av ovariohysterektomi (OHE) støttes likevel av at insidensen av mammatumor er betydelig lavere i andre land, der rutinemessig ovariohysterektomi gjennomføres før tispene er kjønnsmodne (40). Ovariohysterektomi av tisper i ung alder vil derfor redusere risikoen for å utvikle jursvulst. Ovariohysterektomi etter at tispene er fylt to og et halvt år vil trolig ikke ha signifikant beskyttende effekt mot utviklingen av mammatumor. En undersøkelse i 2015 viser at tisper med middels grad av maligne mammatumores som er østrogenreseptor positive, eller med økt serumnivå av E2 (østradiol) synes å representere en undergruppe av hunder med mamma karsinom som kan ha nytte av ovariohysterektomi (41).

Forekomsten av maligne mammatumores er høyere i Norge enn det som beskrives i internasjonal litteratur (36). Denne ulikheten i malignitetsforekomst forklares trolig av ulike vurderinger og kriterier for malignitet, derav krav om funn av metastaser, vurderingen av lokale og histologiske forandringer (36). Maligne jursvulster sees i større grad hos eldre tisper enn hos yngre tisper og forekomsten av mammatumores hos tisper under fem år er lav (32, 42). Det er også en tydelig sammenheng mellom størrelse på tumor og malignitetsgrad (32). De to kaudale kjertlene affiseres hyppigst, sammenlignet med de tre kraniale kjertlene (43).

Alder er derfor i kombinasjon med genetiske- og hormonelle faktorer avgjørende faktorer ved utviklingen mammatumores.

Den høye forekomsten av mammatumores hos intakte tisper utgjør et signifikant klinisk problem i norsk smådyrpraksis. Diagnostikken av mammatumores av norske tisper baserer seg i hovedsak i dag kun på nøye palpasjon av det makroskopiske tumorvevet.

Malignitetsvurdering preoperativt gjøres oftest gjennom vurdering av den kliniske statusen til dyret, tumorstørrelse, thoraxrøntgen, samt vurdering av regionale lymfeknuter for å se etter metastasering. Mammatumores klassifiseres ofte klinisk gjennom det såkalt TNM-klassifikasjonssystemet (tumor, node, metastasis-klassifikasjonssystemet). Dette er et klassifikasjonssystem som tar for seg den primære tumor størrelsen, regional lymfeknute status og fjernmetastaser. Prognosen for mammatumores baserer seg også på TNM-klassifikasjonssystemet, i tillegg til OHE-status til dyret og den histopatologiske klassifisering av tumor. Histologisk og cytologisk vurdering av tumorvev gjøres i de fleste tilfellene etter reseksjon av tumor. Denne diagnostiske tilnærmingen baserer seg derfor kun på påvisning av tilstedeværelse av makroskopisk mammatumor og ikke en profylaktisk- eller tidlig diagnostisk tilnærming (44).

Det er mange likhetstrekk mellom mammatumor hos tisper og brystkreft hos kvinner. Flere studier har også vist at det er teoretisk mulig å benytte seg av mange av de samme biomarkørene som brukes i humanmedisin også i veterinærmedisin til tidlig diagnostikk av mammatumor hos tisper (45). Biomarkører er oftest proteiner som kan måles i blod eller annet vev som for eksempel tumorvev. Denne diagnostiske tilnærmingen kan legge til rette for tidlig diagnostikk og dermed også muligheten for en bedre prognose og muligens et større behandlingsalternativ for de tispene som er rammet av denne sykdommen (45). En lignende diagnostisk tilnærming kan tenkes å kunne benyttes gjennom andre biologiske og cytologiske områder i veterinærmedisinen. Denne pilotundersøkelsen tar for seg det cytologiske, bakteriologiske og makroskopiske innholdet av sekret fra pseudodrektige tisper fra raser med en ulik predisposisjon for mammatumor.

Forekomst av mammatumor hos ulike hunderaser

Hundekreftregisteret som ble opprettet i 1990 samlet i løpet av en åtte års periode inn 14401 histologisk verifiserte nydannelser hos hund, fra fylkene Akershus, Oslo, Troms og Finnmark. Materialet stammet fra 162 raser, samt blandingshunder. Ut ifra dette materialet kom det klart frem en rasemessig disposisjon, både når det gjaldt kreft overordnet og spesifikke typer av kreft.

Hundekreftregisteret har undersøkt den relative risikoen (RR) for blant annet svulster i juret hos 33 ulike raser. De utvalgte rasene har alle over 200 registreringer i Norsk Kennel Klubb årlig. En RR på 100 er per definisjon gjennomsnittsverdien av RR innenfor den enkelte svulstkategori. Av raser med høy relativ risiko for å utvikle mammatumor ligger boxer på topp, med en RR på 283. Deretter kommer engelsk cocker spaniel med en RR på 214, puddel (ikke stor) med RR på 211 og dachshund med en RR på 194. Av de rasene med lavest RR finner vi finsk støver, sankt bernhardshund, drever og norsk elghund, alle med en RR på under 20.

Hvis man ser på det totale antall svulstdiagnoser og relativ forekomst (%) for svulster i juret hos de samme hunderasene ligger papillon på topp med 64,1%. Deretter kommer dachshund med 58,0%, engelsk springer spaniel med 49,5% og puddel (ikke stor) med 48,3%. Nederst på denne listen har vi rasene berner sennhund (5,5%), flat coated retriever (11,7%), riesenschnauzer (13,3%) og collie langhåret (13,8%) (36).

Materiale og metoder

Materiale

I denne studien var målet å undersøke jursekret hos pseudodrektige tisper innen raser med høy risiko for utvikling av mammatumor. Vi har tatt utgangspunkt i Hundekreftregisterets oversikt over relativ risiko, samt relativ forekomst, hos de ulike rasene. I tillegg ønsket vi også å ha med raser det tilsynelatende skulle være enkelt å få tak i, med tanke på popularitet og at gjennomsnittlig levealder var forenlig med ønsket om å ha med tisper over åtte år i

studien. De tre utvalgte rasene som vi ønsket å ha med i studien ble derfor boxer med en RR på 283 og relativ forekomst på 21,0%, dachshund med en RR på 194 og en relativ forekomst på 58,0%, samt engelsk springer spaniel med en relativ forekomst på 49,6%. RR for engelsk springer spaniel er ikke opplyst i hundekreftregisteret.

Av ulike årsaker ble ikke alle disse rasene inkludert i studien. Rasene som ble studert var; dachs, boxer, engelsk setter og bichon frisé. Engelsk setter har ifølge artikkelen fra Hundekreftregisteret en RR for å utvikle mammatumor på 154, samt en relativ forekomst på 27,6%. Bichon frisé har en RR på 136, samt en relativ forekomst av mammatumor på 42,3%. Alle hundene som er inkludert i denne studien ligger med andre ord over landsgjennomsnittet som har en RR på 100 for prevalens av mammatumor.

Studiedesign

Studien var i all hovedsak et observasjonsstudium og et tverrsnittstudie, men med fokus på den deskriptive delen. Vi valgte derfor å presentere våre funn som fire korte kasustikker. Oppgaven tar for seg raser med høy risiko for å utvikle mammatumor. Vi ønsket i utgangspunktet å ha med en kontrollrase med lav forekomst av mammatumor, men dette lot seg ikke gjennomføre. Hundene som ble studert var pseudodrektige tisper over fire år.

Det ble gjort et tverrsnittstudie, blant de tilgjengelige hundene, ut i fra kriteriene som var satt. Studien har i hovedsak en stor deskriptiv del, der innholdet i jursekretet fra pseudodrektige tisper er av fokus. Vårt materiale var ikke stort nok til å kunne trekke noen entydig eller statistisk sikker konklusjon. Målet var å kunne se noen tendenser, uten å gjøre formelle T-tester og kjikvadratanalyser.

Studieenhet

Studieenheten i undersøkelsen er hver enkelt jurkjertel. Det er utfordringer med dette, da studieenhetene skal være uavhengige. Det ble derfor også tatt i bruk hver hund som enhet i tillegg, og underveis i undersøkelsen er avhengigheten vurdert.

Referansepopulasjon

Referansepopulasjonen er norske tisper av rasene dachs, boxer, bichon frisé og engelsk setter.

Studiepopulasjon

Studiepopulasjonen er den populasjonen som er begrenset av våre og veilederes eierkontakter.

Derfor er dette et bekvemmelighetsutvalg. Studiepopulasjonen oppfyller visse kriterier;

inklusionskriterier:

- Pseudodrektige tisper
- Tisper av rasene; dachs, boxer, bichon frisé og engelsk setter
- Over fire år
- Tilgjengelige i prøvetakningsperioden
- Geografisk tilgjengelig, dvs. Østlandet

Disse kriteriene har blitt endret underveis i studien. Som tidligere nevnt har vi måttet gå bort i fra kun de tre opprinnelig tenkte rasene. Alderen som først ble satt var tisper over åtte år, dette var vi også nødt til å endre for å få hunder med i studien. Tisper som oppfylte inklusionskriteriene, men som av ulike årsaker ikke var mulig å få sekret fra, ble regnet som studiens eneste eksklusjonskriterium.

Studieutvalg

Fire hunder var tilgjengelige og villige til å bidra til denne studien. Målet var å ha med 12 hunder i vår studie. Da det var svært utfordrende å finne hunder og eiere som ville delta og som passet kriteriene endte vi med et studieutvalg på fire hunder.

Etablering av studieutvalget

Studieutvalget ble etablert i første omgang gjennom våre og veilederes personlige kontakter.

Vi tok i andre omgang i bruk journalsystemet ved NMBU universitetsdyresykehuset og raseklubber gjennom sosiale medier som Facebook.

Det ble tatt i bruk et stratifisert utvalg i forhold til rase som utvelgelsesmetode, men et bekvemmelighetsutvalg i forhold til inklusjonskriteriene for studien.

Metoder

Arbeidet med studien ble delt inn i fem faser. Første fase av arbeidet dreide seg om å innhente tisper som kunne utgjøre studieutvalget. Her tok vi kontakt med eiere av raser inkludert i studien, som vi og våre veiledere kjente på forhånd. Vi lyktes ikke med å få tak i nok hunder gjennom denne strategien og tok derfor i bruk sosiale medier for å få tak i flere hunder. Her kontaktet vi raseklubber. Gjennom journalsystemet ved NMBU universitetsdyresykehuset fikk vi kontakt med en hund.

Grunnet begrenset tid gjorde vi uttak av prøver fra tisper samtidig som vi fortsatt var på utkikk etter flere hunder som kunne delta i studien. Uttak av prøvene ble gjort i tidsrommet januar 2019 til mars 2019. Tispene var en til to måneder etter endt løpetid ved uttakstidspunkt. Alle uttakene ble gjort ved NMBU smådyrsklinikken. Alle tispene kom inn ved forskjellige tidspunkter og kun ved en anledning. Det ble dermed tatt ut prøver til både bakteriologisk dyrkning og cytologisk analyse samtidig.

Samme person utførte uttaket av jursekret på en og samme hund, mens en annen person utførte den cytologiske- og bakteriologiske prosedyren. Den tredje personen utførte de administrative oppgavene i forbindelse med uttaket. Disse arbeidsprosedyrene ble rulert på for hver hund. Farging og inkubering av prøver ble gjort i fellesskap.

Etter endt prøveuttaksperiode, ble den cytologiske analysen gjennomført. Deretter ble alle data samlet inn fra analysen, samt resultatene fra bakteriologisk dyrkning sammenfattet. Resultatene fra studiet ble gjennomgått og arbeidet med fremstillingen av studiet ble gjennomført.

Prosedyre

Uttak av speneprøver

For uttak av speneprøver ble det benyttet labfrakk eller klinikktøy, samt hansker.

Hendene ble vasket og spritet av før prøveuttaket. Følgende prosedyre for uttak av speneprøver ble benyttet:

1. Klipp: Ved hjelp av liten barbermaskin fjernes pels rundt samtlige spener.
2. Vask alle spener med egnet såpe (Hibiscrub).
3. Alle spenetupper desinfiseres med 70% etanol.
4. Vask og desinfiser hender med etanol 70%. Ta på nye hansker.
5. Den enkelte spenetupp det skal tas prøve av desinfiseres på nytt rett før prøveuttak.
6. Melk ut jursekret, den første dråpen sekret tørkes vekk med kompress og kastes.
7. Jursekret melkes ut på nytt (helst fra alle speneåpninger samtidig). Sekretet høstes ved at dråpene som henger på spenetuppen suges opp med en mikroliter-pipette, med steril pipettetupp. Denne prosedyren illustreres i Figur 5.
8. Pipettetupp og kompress til desinfeksjon, byttes mellom hver spene.



Figur 4. Bildet illustrerer hvordan pelsen er klippet bort rundt samtlige spener. Vask med Hibiscrub utføres før desinfeksjon med etanol 70%.



Figur 5. Innhenting av jursekret til utsæd på blodagar for bakteriologisk dyrkning. Jursekretet melkes ut til en dråpe som henger på spenetuppen. Denne dråpen høstes direkte ved hjelp av en pipette.

Laboratorieprosedyrer

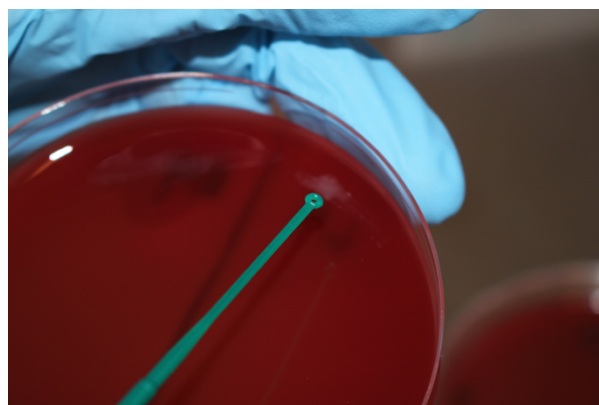
Bakteriologisk dyrkning

Før uttaket av speneprøvene for cytologisk undersøkelse ble gjennomført, ble det tatt ut sekret for å lage utsæd til bakteriologisk dyrkning. Det ble også her tatt i bruk labfrakk eller klinikktoy. Hendene ble vasket og desinfisert med etanol 70%, og det ble tatt i bruk hansker før selve prøvene ble tatt ut. Følgende prosedyre for utsæd av sekret til bakteriologisk dyrkning ble benyttet:

1. Fra hver tise ble det benyttet fem skåler med blodagar. Hver skål ble delt i to ved å tegne en strek på undersiden av skålen, og hver halvdel ble merket med spenennummer og h/v (høyre/venstre).
2. Uttak av speneprøver ble utført på samme måte som beskrevet under "Andre prosedyrer, uttak av speneprøver".
3. En dråpe av sekret ble plassert på blodagaren.
4. Dråpen ble sådd ut ved hjelp av plastutsæder nedover den ene halv siden av blodagaren.
5. Prosedyren ble gjentatt for prøver fra alle spenene.
6. Skålene med blodagar ble flyttet til inkubator, der de ble lagt med blodagaren opp (opp ned).
7. Inkubert på 37 grader Celsius, aerobt, i 24 timer.



Figur 6. Jursekretet overføres direkte til blodagar ved hjelp av mikropipette.



Figur 7. Utsæd av jursekret på blodagar. Skålen med blodagar er på undersiden delt i to ved en tegnet strek.

Cytologi/cellefarging

Etter uttak av prøver til bakteriologisk dyrkning, ble det tatt ut sekretprøver til cytologisk analyse. Følgende prosedyre for dette ble benyttet:

1. Objektglassene ble merket før prøveuttaket startet. Glassene ble merket med navn på dyret, hvilken jurkjertel prøven var hentet fra og dato for uttaket.
2. Melket sekret fra en og en spene, forsøkte å få sekret fra flere speneåpninger ved samme uttaket.
3. Sekretet ble dryppet direkte på et objektglass. Mens sekretet fortsatt var adherent til spenetuppen ble objektglasset ført mot spenen og dråpene direkte overført til objektglasset.
4. Enden av et nytt objektglass ble dyppet ned i det oppsamlede sekretet.
5. Sekretet ble strøket ut på nytt objektglass, i motsatt retning av når man lager blodutstryk.
6. Prøvene ble tørket og deretter farget så fort som mulig, maksimalt innen 20 timer.



Figur 8. Utstryk ble laget direkte på merket objektglass, som så ble tørket. Bildet viser utstryk på objektglass fra prøvetaking av en hund.

Farging av preparater

Objektglassene ble merket med hvilken fargemetode som ble benyttet. Vi tok i bruk to ulike fargemetoder; May Grünwald Giemsa (MGG) og Hemacolor (HC). Vi fikk også preparater montert for evig oppbevaring og lagring.

Prosedyre for MGG-farging:

1. Fiksering: Metanol i fem minutter.
2. May-Grünwald fem minutter.
3. Giemsa 15 minutter.
4. Skyll preparatet over vasken med Sørensens buffer.
5. Sørensens buffer i fem minutter (950 ml destillert vann: 50 ml Sørensens buffer).

Prosedyre for Hemacolor-farging (HC):

1. Fiksering: Metanol i 5 minutter.
2. Rød væske, dyppes 15 ganger.
3. Lilla væske, dyppes 30 ganger.
4. Skyll med bufferløsning pH 7,2.
5. Legg i buffer 2 x 10 sekunder.
6. Legg på cellevatt og tørk av baksiden.
7. La preparatet lufttørke.

Prosedyre for montering av preparatet etter farging:

1. Benytt hansker.
2. Legg i klar/gjennomsiktig væske (xylol), for å rense objektglasset.
3. Legg på Histokit (hvit tube).
4. Legg på dekkglass.
5. Trykk dekkglasset ned mot objektglasset med en q-tips for å fjerne evt luftbobler under dekkglasset.

Mikroskopering

Følgende prosedyre for mikroskopering ble benyttet etter montering av preparatene:

1. En dråpe vann ble lagt på ferdig montert preparat.
2. Dekkglass ble så lagt på objektglasset.
3. Etter montering ble mikroskopering utført fra lupe 40x10 ganger, deretter 60x10 ganger og ved 100x10 ganger forstørrelse der det ble benyttet olje.

Alle preparatene ble analysert i mikroskop i fellesskap ved hjelp av et mikroskop der flere personer kan se samtidig.

Kvantifisering av tilstedeværelse av de ulike celletypene i hvert enkelt preparat ble kategorisert i fire ulike kategorier. De aktuelle celletypene som ble undersøkt var skumceller, nøytrofile granulocytter, lymfocytter, erytrocytter, epiteliale celler, tumorceller og andre celler. De fire kategoriene for mengden av en celletypes tilstedeværelse var som følger:

0: Ingen eller svært få av den aktuelle celletypen i preparatet

1: Et fåtall av den aktuelle celletypen tilstede i preparatet.

2: Moderate mengder av den aktuelle celletypen tilstede i preparatet.

3: Store mengder av den aktuelle celletypen tilstede i preparatet.

I tillegg til de ulike cellene ble preparatene også undersøkt for tilstedeværelse av protein, fett og bakterier. Dette ble inndelt etter mengde, på samme måte som de ulike celletypene. Protein ble definert som homogent bakgrunnsmateriale, som ikke hadde typiske cellekarakteristika. Fett ble definert som fettvakuoler i preparatene.

Før cytologisk analyse av våre egne preparater, har vi ved flere anledninger hatt gjennomgang av andre lignende preparater sammen med veileder Lars Moe. De fire kategoriene for mengden av en celletypes tilstedeværelse i denne studien er en subjektiv vurdering, men den er basert på tidligere nevnte gjennomgang med veileder. Cytologisk analyse ble analysert fortløpende og etter uttaksperioden var ferdig.

Statistiske metoder

Signifikansnivå og konfidensintervall

Valgt signifikansnivå (α) var 5% i statistiske tester. Konfidensnivået for konstruksjon av konfidensintervall var 95%. Slike tester ble ikke benyttet i denne studien, da resultatene ble presentert som fire kasuistikker.

Utvalgsstørrelse og presisjon

I denne studien har vi brukt hver enkelt spene som studieenhet. Av de fire hundene som er med i studien hadde tre av de ti spener, mens en hund hadde åtte spener. Hos en av hundene med ti spener var det ikke mulig å få ut jursekret fra to av spenene. Utvalgsstørrelsen ble dermed som følger: $10 + 10 + 8 + 8 = 36$ spener.

Enhetene er ikke uavhengige. Dette tas høyde for ved vurderingen av analyseresultatene.

Resultater

Kasus 1

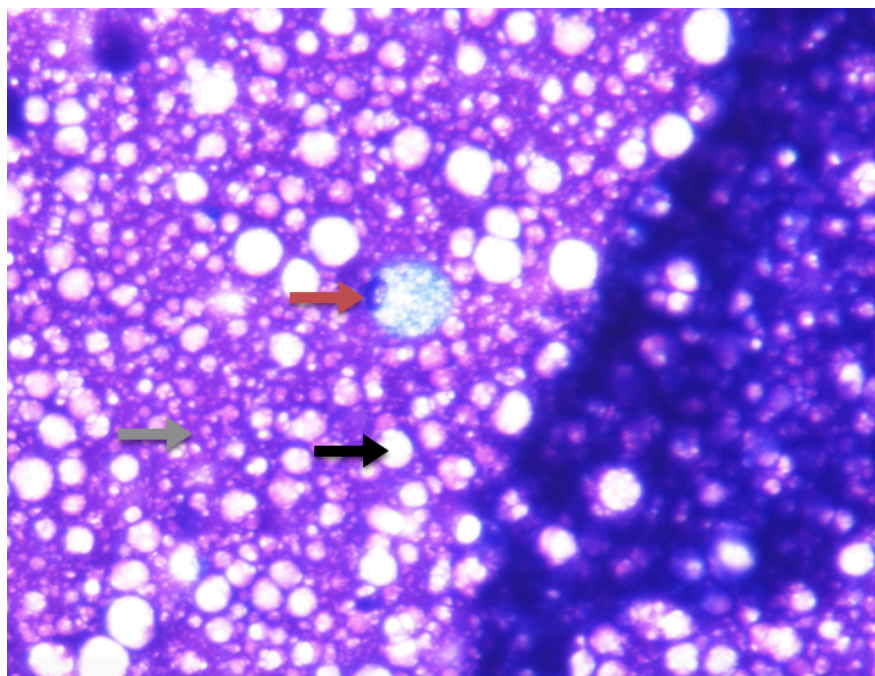
Rase	Dachs
Alder (fødselsdato)	9 år (20.03.2010)
Antall løpetider per år	2
Antall uker siden avsluttet løpetid	10
Plaget med pseudodrektighet	Nei
Antall spener	8
Har eller har hatt mammatumor	Ja

Undersøkelse og makroskopisk utseende

Denne tisper hadde i de fleste jurkjertler aktivt kjertelvev, med unntak av R1 og R2 der det var lite aktivt vev. Det ble ved undersøkelse funnet flere små harde strukturer i flere av kjertlene, som potensielt kan være tumorvev. I L2 var det flere harde knudrete strukturer, i L3 en hard struktur på størrelse med en knappenål dypt i kjertelen i tillegg til en mykere hevelse. I L4 var det også en hard struktur, på størrelse med et riskorn. Kranialt for spenen til R2 var det et område på ca 0,5 cm i diameter med sirkulært arrvev, etter en tidligere fjernet nydannelse.

Jursekretet var gulhvitt fra samtlige spener. I L1 og L2 var sekretet seigt, mens i de resterende kjertlene var det tyntflytende sekret.

Eier opplyste om at tisper har blitt diagnostisert med mammatumor. Denne tumoren var ved undersøkelsestidspunktet kirurgisk fjernet med lumpektomi.

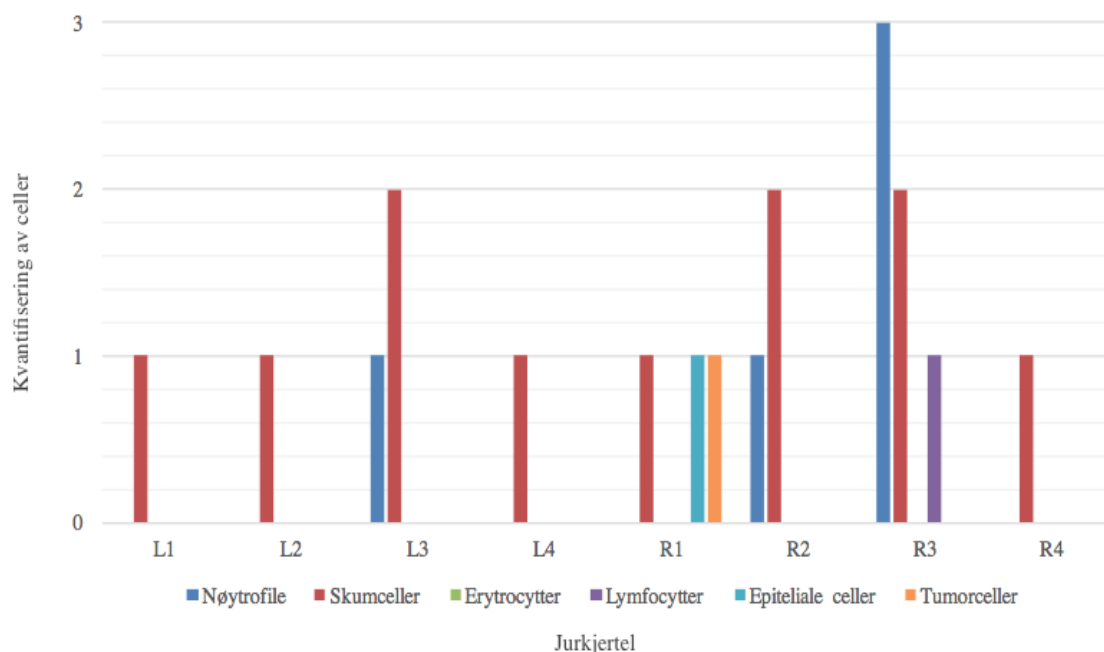


Figur 9. Rikelig innhold av fettvakuoler (svart pil), protein (grå pil) og enkelte skumceller (rød pil) fra R1 hos kasus 1. Preparatet var farget med HC.

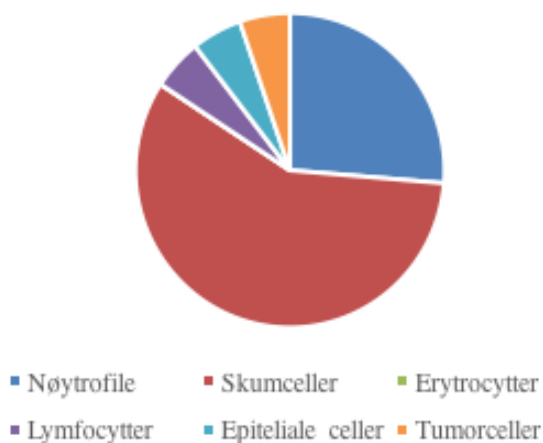
Cytologisk analyse

Hos denne hunden var det mye protein og fett til stede i samtlige kjertler. Det ble gradert til 3 på både fett og protein i alle kjertler. Preparatene var generelt cellefattige, med unntak av R3 som inneholdt store mengder nøytrofile granulocytter.

Tilstedeværelse av celler i jursekretet, og fordelingen av disse er fremstilt i Figurene 10 og 11.



Figur 10. Dverg dachstipse. Fordeling av ulike celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i de ulike jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, R1, R2, R3 og R4, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L4 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen og kranialt for L4. R1-R4 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispå).



Figur 11. Dverg dachstipse. Gjennomsnittlig fordeling av celler oppgitt i prosent (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i jursekret fra totalt alle jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, R1, R2, R3 og R4, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L4 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. R1-R4 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispå).

Bakteriologisk dyrkning

Det var ingen vekst ved første bakteriologisk analyse. Andre avlesning ble ikke gjort.

Kasus 2

Rase	Boxer
Alder (fødselsdato)	5,5 år (17.04.2013)
Antall løpetider per år	2
Antall uker siden avsluttet løpetid	10
Plaget med pseudodrektighet	Ja
Antall spener	10
Har eller har hatt mammatumor	Nei



Figur 12. Denne tispå hadde stor variasjon i makroskopisk utseende av spener.

Undersøkelse og makroskopisk utseende

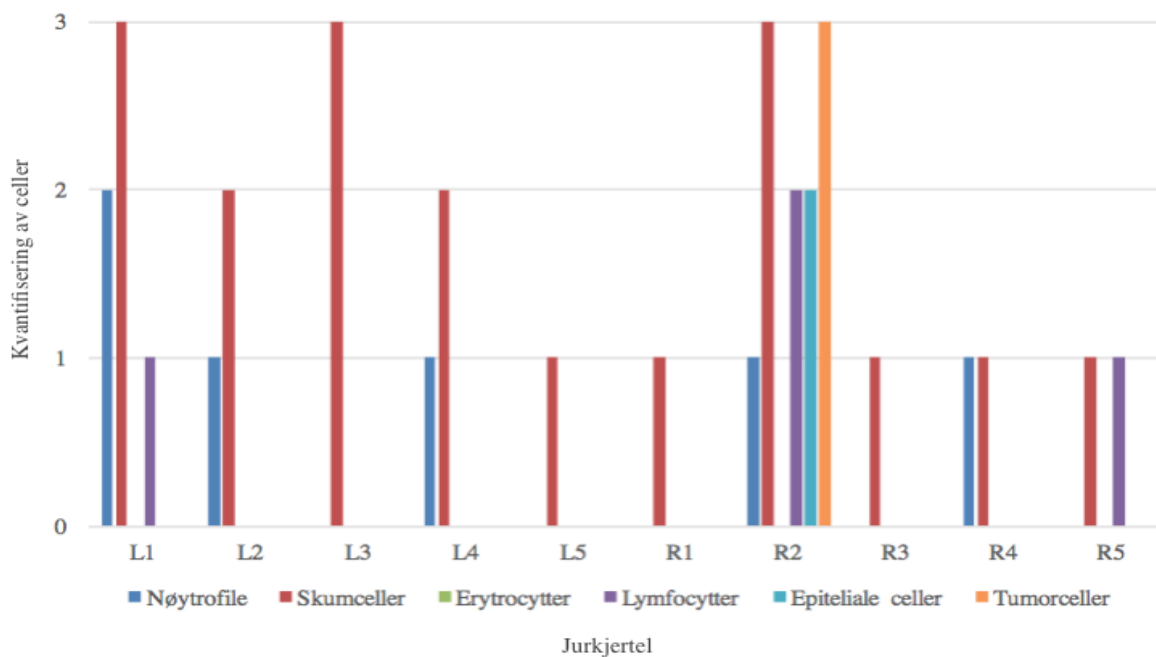
Denne hunden hadde stort sett aktivt vev i samtlige kjertel, men noen mer og mindre aktive. R1, R2 og R5 var mer fyldige enn øvrige kjertler, mens R4 hadde lite aktivt vev og en liten spene. Det ble ved undersøkelse funnet en mulig nydannelse i tilknytning til spenen på R3.

Jursekretet var gulhvitt fra samtlige kjertler. Konsistensen på sekretet var fra de fleste tyntflytende, men fra L2 var det også trådtrekkende. L5 hadde et seigt og trådtrekkende sekret.

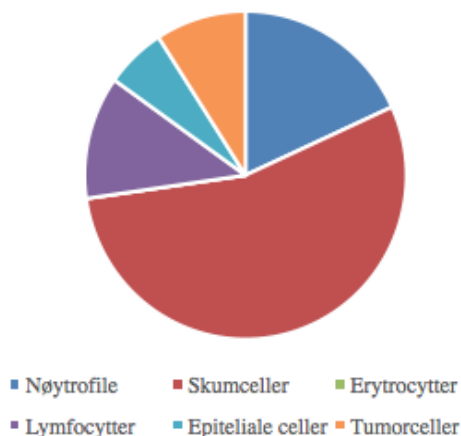
Cytologisk analyse

Denne hunden hadde noe varierende grad av tilstedeværelse av fett og protein i jursekretet. Det var generelt mer protein enn fett, der de fleste kjertlene fikk 2 på protein. Det var kun tre kjertler som fikk 2 på fett, mens de resterende kjertlene ikke hadde fett tilstede i sekretet. Det varierte om preparatene var cellerike eller cellefattige.

Tilstedeværelse av celler i jursekretet, og fordelingen av disse er fremstilt i Figurene 13 og 14.



Figur 13. Boxertispe. Fordeling av ulike celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i de ulike jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispa).



Figur 14. Boxertispe. Gjennomsnittlig fordeling av celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i jursekret fra totalt alle jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon bare på side av midtlinjen hos tispa).

Bakteriologisk dyrkning

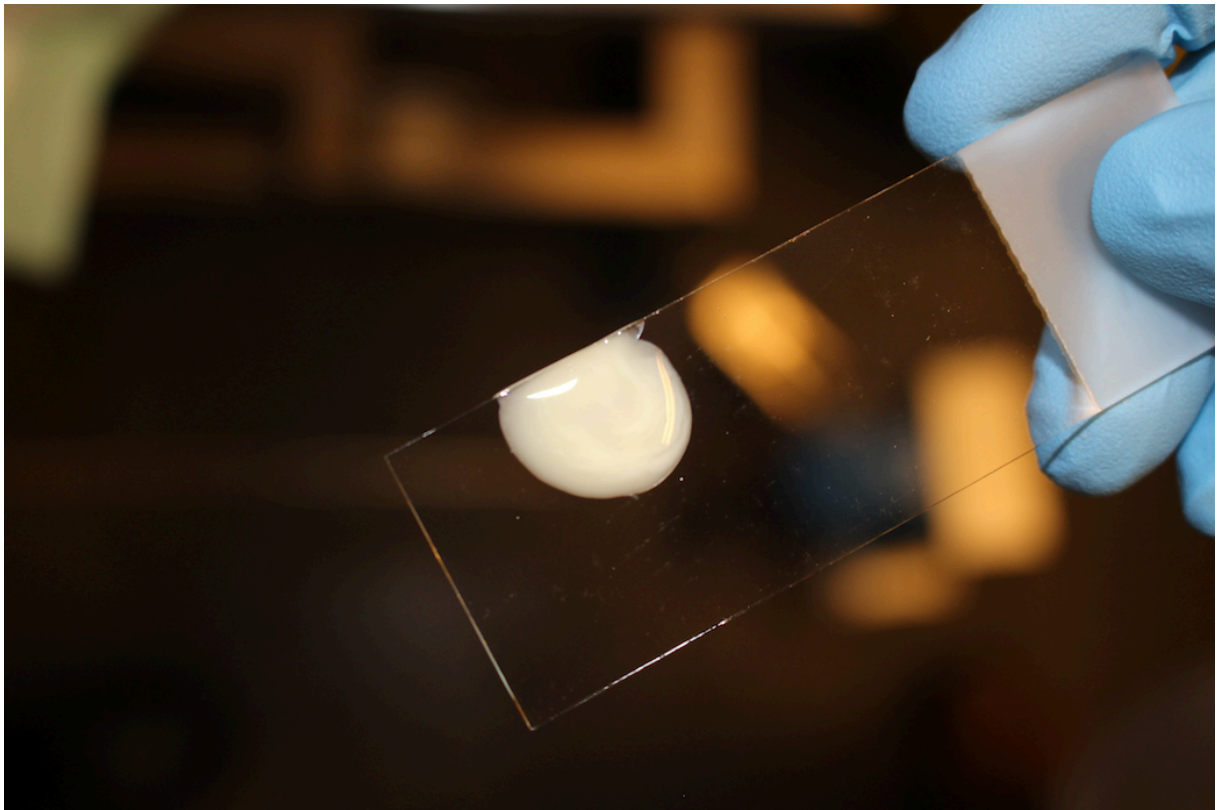
Ingen av blodagarskålene ble lest av for bakteriologisk analyse for denne hunden på grunn av en misforståelse.

Kasus 3

Rase	Engelsk setter
Alder (fødselsdato)	4,5 år (12.05.2014)
Antall løpetider per år	1,5
Antall uker siden avsluttet løpetid	10,5
Plaget med pseudodrektighet	Ja
Antall spener	10
Har eller har hatt mammatumor	Nei

Undersøkelse og makroskopisk utseende

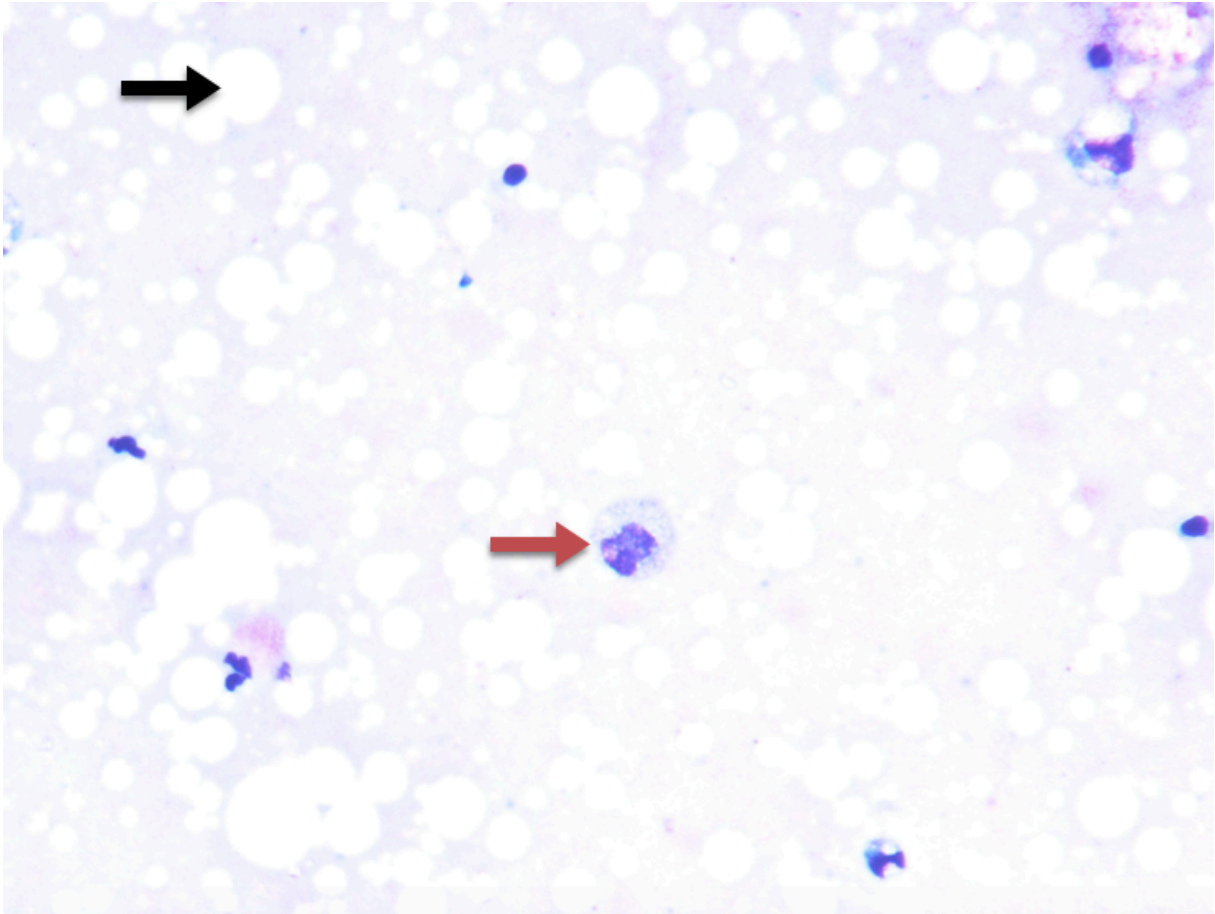
Denne hunden hadde varierende grad av aktivt kjertelvev. Liten spene med inaktivt vev på L1, økende grad av kjertelvev bakover i juret. R1 og R2 hadde små spener med lite vev. Juret generelt, ser normalt ut for syklus med unntak av mild hevelse i huden kaudalt for L5. Denne hunden hadde tidligere fjernet en mastcelletumor mellom L4 og L5. Sekretet fra L1, L2 og L3 er hvitgult og tyntflytende. De andre kjertlene hadde hvit farge på sekretet, også dette tyntflytende og blankt. R1 hadde noe seigere konsistens.



Figur 15. Jursekret oppsamlet fra engelsk settertispe. Denne hunden hadde gulhvitt sekret av fargen som vist på bildet, i samtlige jurkjertler.

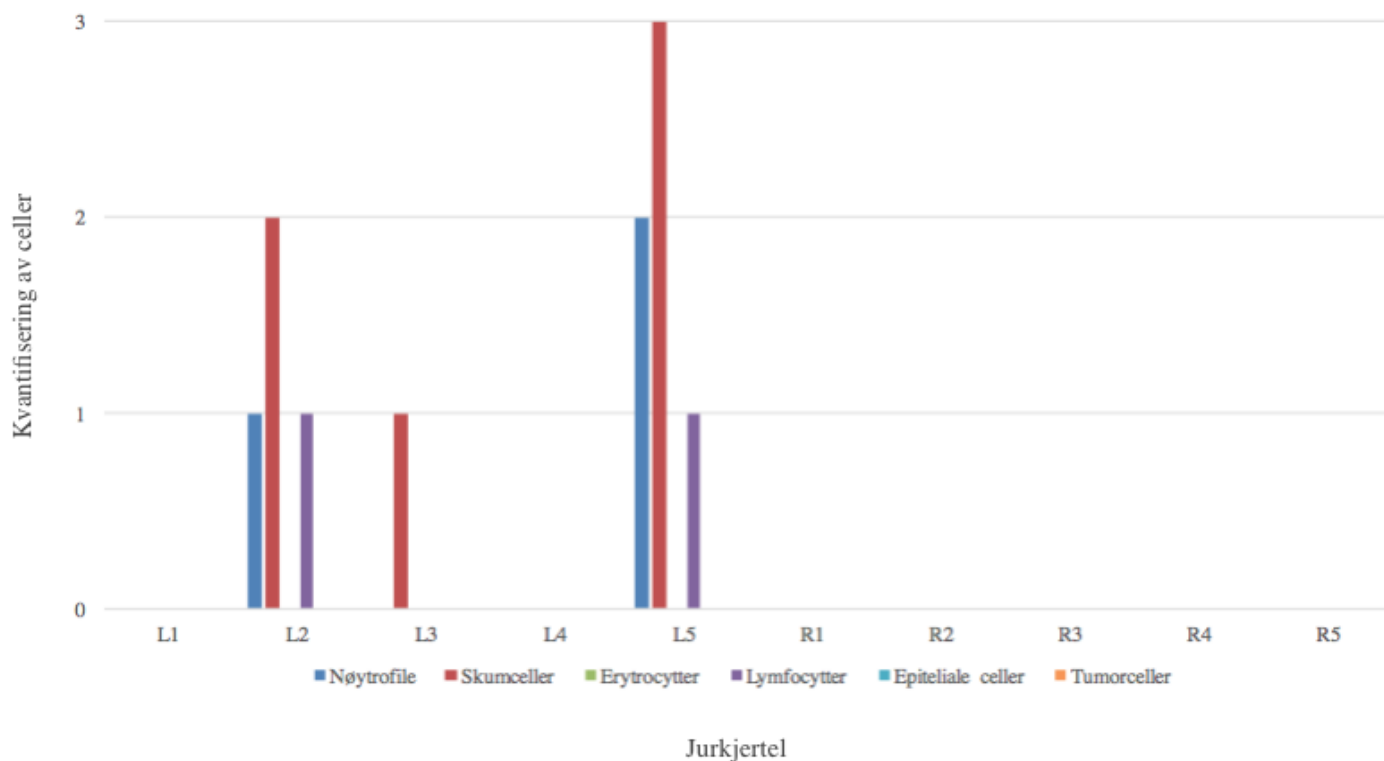
Cytologisk analyse

Hos denne hunden var to av preparatene helt uten fett og protein, mens de resterende kjertlene hadde mye. Disse kjertlene fikk 3 på både fett og protein. Generelt hos denne hunden var preparatene preget av å være cellefattige.

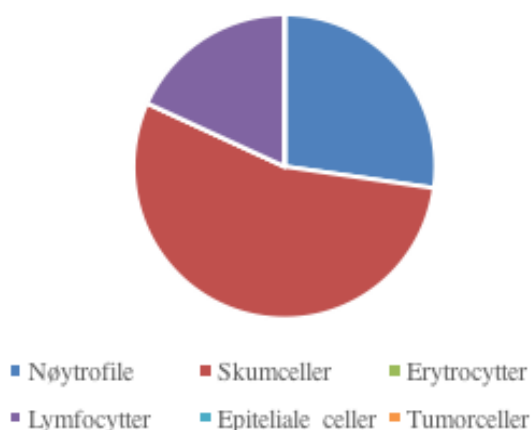


Figur 16. Preparat fra L5 hos kasus 3 illustrerer et generelt cellefattig preparat, men jursekretet fra denne kjertelen var den mest cellerike hos denne tispa. Skumcelle (rød pil). Fettvakuole (svart pil). Preparatet var farget med MGG.

Tilstedeværelse av celler i jursekretet, og fordelingen av disse, er fremstilt i Figur 17 og 18.



Figur 17. Engelsk settertispe. Fordeling av ulike celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i de ulike jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispå.



Figur 18. Engelsk settertispe. Gjennomsnittlig fordeling av celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i jursekret fra totalt alle jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispå).

Bakteriologisk dyrkning

Det var ingen vekst på noen av blodagarskålene ved første avlesning etter inkubering i et døgn. Skålene ble vurdert igjen etter inkubering i 10 dager. Da var det forurensing på fem av blodskålene: L2 var forurenset med *Bacillus*, R1 og R5 var forurenset med *Micrococcus*, mens R2 og R4 var forurenset med *Bacillus* og en *Stafylokokk*. Grunnen til at dette ble ansett som forurensing var at koloniene som var tilstede var utenfor området på blodagaren der prøvematerialet ble påført.

Kasus 4

Rase	Bichon frisé
Alder (fødselsdato)	10 år (25.06.2008)
Antall løpetider per år	2-3
Antall uker siden avsluttet løpetid	8
Plaget med pseudodrektighet	Ja
Antall spener	10
Har eller har hatt mammatumor	Nei



Figur 19. Makroskopisk utseende av juret før prøvetaking.

Undersøkelse og makroskopisk utseende

Denne hunden hadde aktivt kjertelvev i samtlige jurkjertler. L1 var noe mindre prominente enn de øvrige kjertlene, mens R5 var mer prominente. L2 hadde en stor, hoven og fast kjertel, som ble målt til 4x11mm. L5 hadde dobbelspene, mens R2 hadde en unormalt tydelig spenekanal.

Alt jursekretet var tyntflytende, bortsett fra jursekretet fra L3 som var tyktflytende og L4 som var tykt og pussaktig. Fargen på jursekretet skilte seg fra de ulike kjertlene. L1 hadde en brunlig og gråhvit farge. R2 og R4 var også brunlig i fargen, mens L3 og R5 var av en lysere brunfarge. L2 hadde en hvitgul farge, mens R1 var beigevit i fargen. L5 hadde en hvit farge

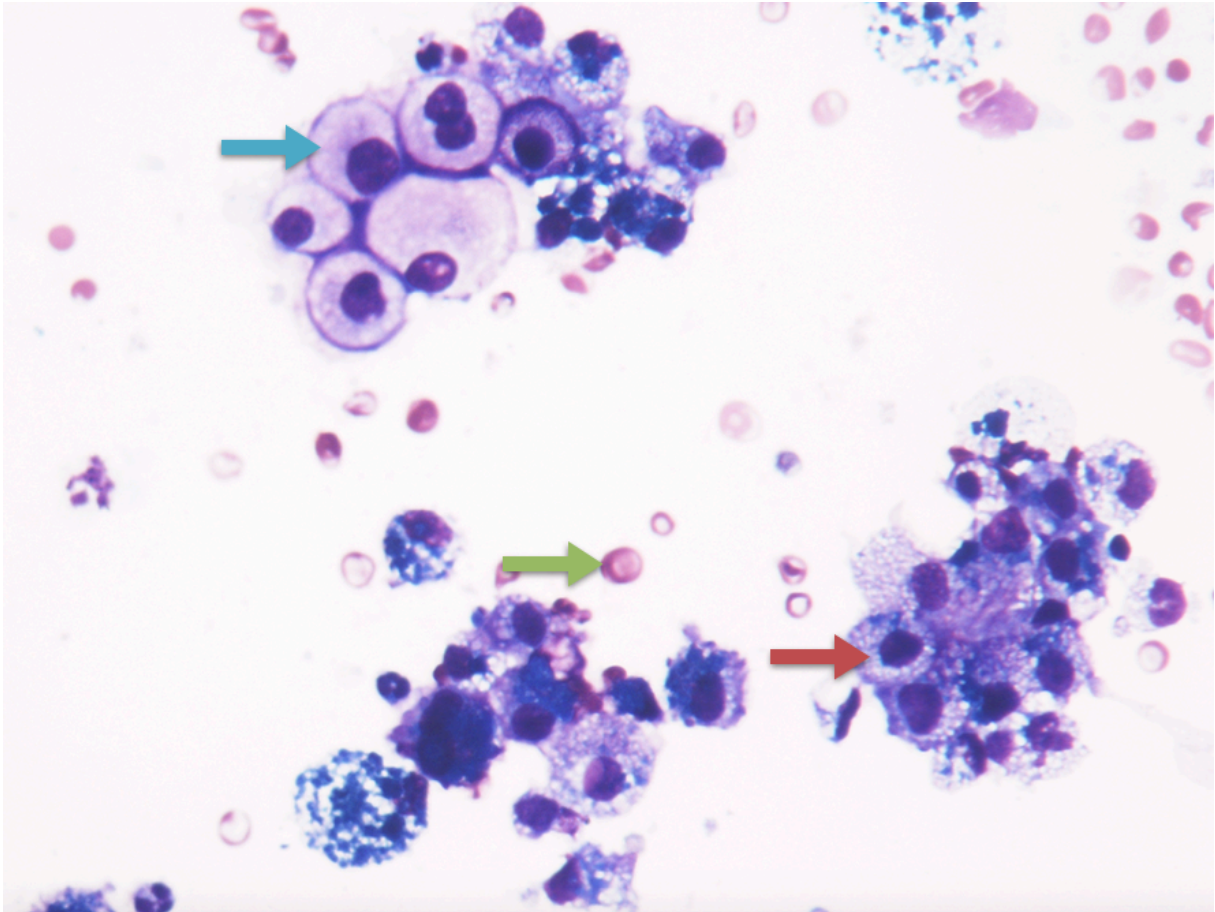
på jursekretet, men her kom det også blod fra spenen. Blodig farge ble også observert fra L4 og R3.



Figur 20. Blodig jursekret. Denne tispa hadde blodig jursekret i flere av spenene.

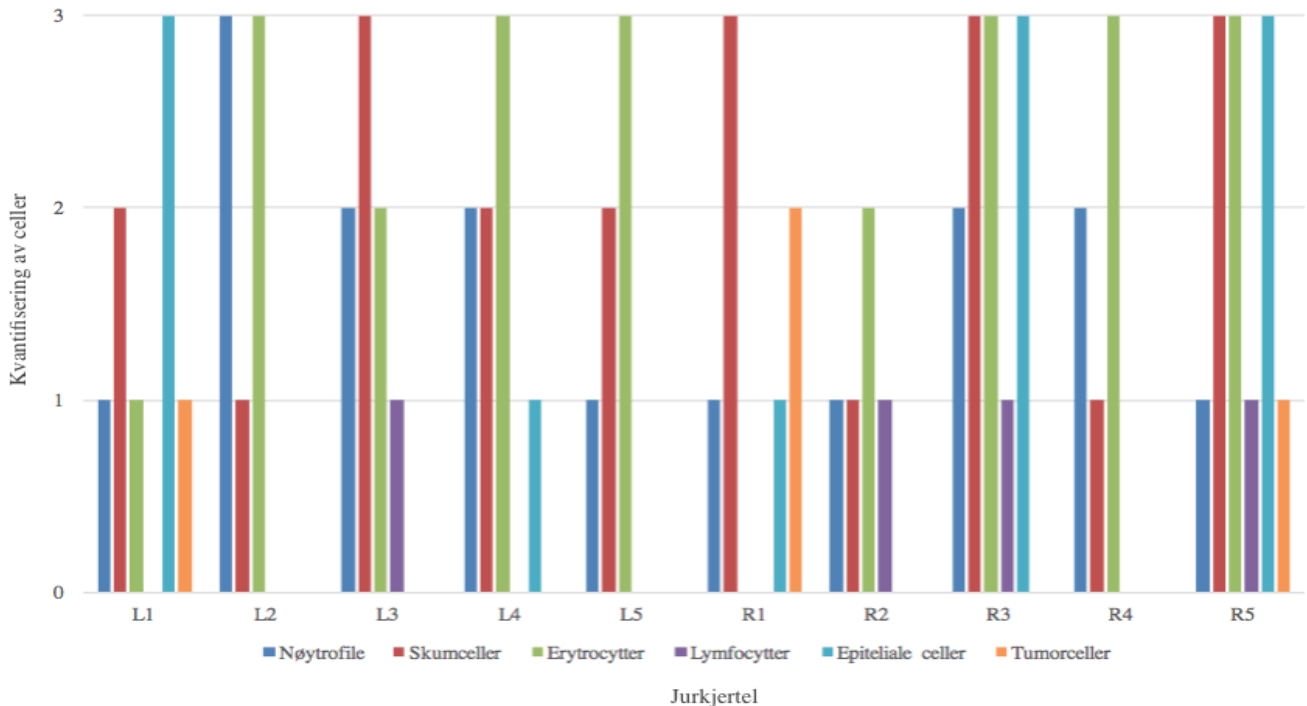
Cytologisk analyse

Hos denne hunden var det veldig varierende grad av tilstedeværelse av protein i sekretet fra de ulike jurkjertlene. Tilstedeværelse av protein varierte fra ingenting, til 3. Halvparten av kjertlene hadde protein tilstede, mens den andre halvparten ikke hadde det. Kun en kjertel hadde 3 på protein. Det var kun fett tilstede i sekretet fra en kjertel, denne kjertelen hadde 2 på fett. Preparatene laget fra jursekretet til denne hunden var mer cellerike enn de var cellefattige, og gjennomgående noe mer cellerike enn preparatene fra de resterende hundene som ble undersøkt. Det ble funnet tumorceller i tre av kjertlene og epiteliale celler i fem av kjertlene hos denne hunden.

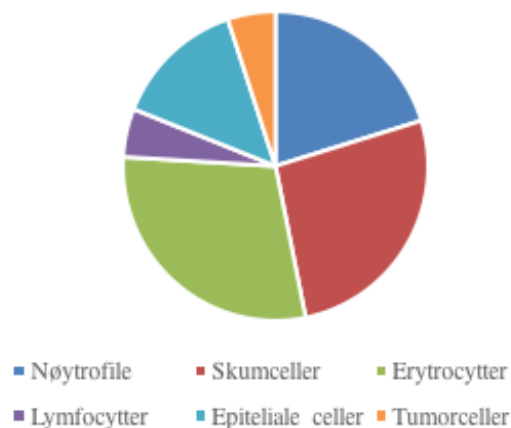


Figur 21. Cellerikt preparat fra R3 hos kasus 4. Cellene ble tolket som henholdsvis epitelceller (blå pil), erythrocytt (grønn pil) og skumcelle (rød pil). Preparatet var farget med HC.

Tilstedeværelse av celler i jursekretet, og fordelingen av disse, er fremstilt i Figurene 22 og 23.



Figur 22. Bichon frisétispe. Fordeling av ulike celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i de ulike jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon på høyre side av midtlinjen hos tispas)



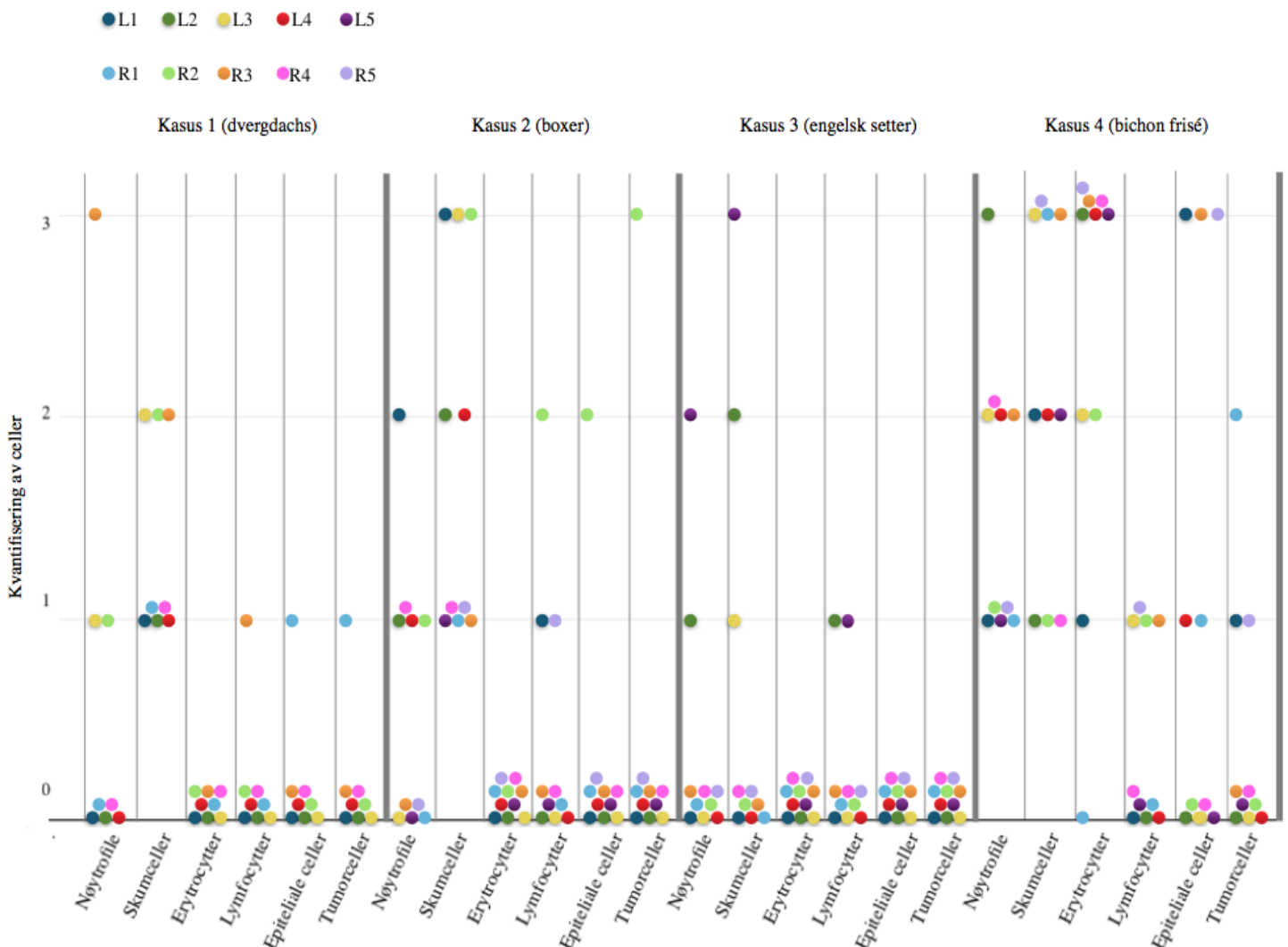
Figur 23. Bichon frisétispe. Gjennomsnittlig fordeling av celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epiteliale celler og tumorceller) i jursekret fra totalt alle jurkjertlene (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5, der L1 er venstre kraniale jurkjertel og L5 er venstre kaudale jurkjertel. L2 ligger kaudalt for L1 og L3 ligger kaudalt for L2 igjen. L4 ligger kaudalt for L3 og kranialt for L5. R1-R5 har tilsvarende anatomisk lokalisasjon bare på høyre side av midtlinjen hos tispas).

Bakteriologisk dyrkning

Ved første analyse var fem av skålene forurenset. L2, R1, R2 og R5 var forurenset med *Micrococcus*, mens L1 var forurenset med både *Micrococcus* og *Bacillus*. På de øvrige skålene var det ingen vekst. Grunnen til at dette ble ansett som forurensning var at koloniene som var tilstede, var utenfor området på blodagaren der prøvematerialet ble påført.

Ved andre analyse var det i tillegg til forurensning ved første analyse dukket opp en koloni med Stafylokokker på skålen fra L1 og L4.

Totalfordeling av celler hos hver enkel jurkjertel hos hvert individ



Figur 24. Fordeling av celler (nøytrofile, skumceller, erytrocytter, lymfocytter, epitelliale celler og tumorceller) i hver jurkjertel (L1, L2, L3, L4, L5, R1, R2, R3, R4 og R5). Hver prikk representerer en jurkjertel, og viser fordelingen i forhold til celletype og mengde celler hos hver enkelt hund.

Figur 24 illustrerer at det var mye skumceller i jurkjertelsekretet hos samtlige hunder. En tisper (kasus 4) hadde generelt mer cellerikt jursekret enn de andre tispene. Figuren viser ingen tydelig sammenheng mellom jurkjertel og celletype eller celletype og rase (kasus).

Samlet resultat fra bakteriologisk analyse

Dessverre ble noen av prøvene borte, grunnet en intern misforståelse ved bakteriologisk laboratorium. Dette gjaldt prøver fra kasus 2, samt andre avlesning av kasus 1. Det ble likevel lagt til grunn i denne undersøkelsen, at det ikke var noen vekst i disse prøvene. Dette ettersom det ikke ble funnet noen bakterier i noen av de andre avleste prøvene, samt at det ikke ble funnet bakterier i noen av cytologipreparatene.

Diskusjon

Resultatene fra denne pilotstudien viser interessante funn til tross for et begrenset studieutvalg. Det er mulig å se noen trender i studieutvalget, samt å beskrive hva jursekret inneholder hos de fire individene som er inkludert i denne studien.

Hovedfunnene i denne undersøkelsen var at det ikke ble funnet bakterier i noen av prøvene som ble analysert. Dette er et overraskende funn, da det hos tisper i laktasjon er bakterier tilstede normalt. Det ble heller ikke funnet noen sammenheng mellom palperbar nydannelse i jur og tumorceller i jursekret.

Bakteriologi og forurensning

Prøver fra samtlige jurkjertler ble sådd ut på blodagar og inkubert for å undersøke eventuell tilstedeværelse av bakterier i jursekretet. Brystmelk har potente infeksjonshemmende egenskaper som hindrer vekst av mikrober (46). Dette er en mekanisme som trolig også er tilstede hos hund. I utgangspunktet regnet vi ikke med å få stor forekomst av bakterier i jursekretet hos de undersøkte tispene.

Det vokste ikke frem bakterier som stammet fra jursekretet til noen av hundene, men hos en relativ høy andel av skålene vokste det frem bakterier skålene var forurenset med. Dette var helt klart forurensning, da koloniene vokste på et annet område av blodagaren enn der selve jursekretet var påført. Tendensen var også at det var færre skåler som var forurenset ved første avlesning, etter ett døgns inkubasjon, enn ved andre avlesning etter 10 dager. Både flere skåler var forurenset og av ulike genus med bakterier etter andre avlesning.

Metoden som er brukt for å innhente prøver av jursekretet er standardisert, der hygiene er en viktig og stor del av prøveuttaket. Likevel var det tre genus av bakterier som gikk igjen som forurensning. Det ble sett nærmere på disse bakteriene, og hvor de normalt befinner seg.

Genus *Bacillus* er grampositive sporedannende bakterier. Fordi bakteriene er sporedannende er denne slekten meget motstandsdyktige mot varme, lys, inntørking og desinfeksjonsmidler. Slekten *Bacillus* inneholder mange arter (47). Dette er en vanlig miljøbakterie, som ofte blir isolert i laboratorier som forurensing. Bakteriene vokser vanligvis både aerobt og anaerobt (48).

Micrococcus er et genus bakterier i familien *Micrococcaceae*, som er vidt distribuert i naturen. Dette er gram-positive kokker. *Micrococcus* er vanligvis ikke patogene bakterier. De finnes normalt i menneskekroppen og kan være essensielle for å opprettholde en normal balanse av mikrofloraen på huden. Noen arter finnes i støv i luften, i marint farvann, og på hud eller i hudkjertler hos vertebrater. Flere arter finnes også i kumelk (49).

Stafylokokker er runde, grampositive bakterier. Dette er hardføre bakterier som kan leve både aerobt og anaerobt, formere seg ved temperaturer på 10-45 grader og tåler inntørking. Stafylokokker er svært utbredt på kroppen til både dyr og mennesker, og finnes også i miljøet. Smitte mellom mennesker overføres oftest via uvaskede hender, men luftsmitte kan også forekomme (50). Stafylokokkene hører til menneskers og dyrs normalflora på hud og slimhinner og regnes som opportunistiske patogene mikrober (51).

Staphylococcus aureus er en av de viktigste stafylokokkene og en vanlig årsak til bakterielle infeksjoner hos mennesker og hos mange dyr. *Staphylococcus pseudintermedius* likner på *S. aureus*, men er vanligere hos dyr og sjelden hos menneske. *S. pseudintermedius* er ofte en del

av normalfloraen, spesielt hos hund, men den kan også gi infeksjoner. Meticillinresistente *S. pseudintermedius* (MRSP) ofte vanskeligere å behandle enn meticillinsensitive varianter (51).

Bakteriene våre prøver var forurenset med kan altså stamme fra både miljøet, oss mennesker og hundene selv. Det ble ikke differensiert hvilken art av de ulike genusene som var tilstede som forurensning. Dersom man hadde kommet frem til hvilken art av bakteriene det var snakk om, hadde man lettere kunnet si noe om hvor disse bakteriene stammet fra. Ut ifra dette kunne man gjennomgått prosedyren for prøvetakning for å om mulig optimalisere denne for å unngå slik forurensning.

Cytologi

I hundemelk studert tidligere er det funnet at melk hos friske tisper cytologisk består av mye celledbris, mye epitelceller og få nøytrofile, erytrocytter og skumceller (28).

Resultatene fra jursekretet undersøkt i denne studien samsvarer dårlig med dette, spesielt med hensyn til epitel- og skumceller. Av celler ble det funnet mest skumceller hos samtlige hunder, med unntak av den ene hvor det var noe mer erytrocytter. Dette indikerer at skumceller kan være normalt i sekret fra pseudodrektige tisper, men mindre normalt i vanlig hundemelk hos lakterende tisper. En forklaring på dette kan være at juret hos en pseudodrektig tisper vanligvis ikke blir tømt jevnlig. Hos tisper i vanlig laktasjon akkumuleres det makrofager og nøytrofile i juret ettersom det tømmes sjeldnere under avvenning av valper. Skumceller er en type makrofager som fagocytterer lipider, som det er mye av i melk. Lipidene er det som gir skumcellene det karakteristiske skumaktige utseendet. I sekretet til pseudodrektige tisper ser det også ut til å være mye fett, som kan forklare at det også er mye skumceller. Det er derfor rimelig å tro at jursekret fra pseudodrektig tisper best kan sammenlignes med hundemelk i siste del av laktasjonen, og at det høye antall skumceller er tilstede som en del av termineringen av sekresjonen.

Epitelceller fantes i syv kjertler av totalt 36, hvorav fem av disse var hos samme hund. At det ble funnet såpass mye mindre her enn i studien av hundemelk, kan muligens forklares av den hyppige utskiftningen av epitel gjennom laktasjonen hos lakterende tisper (9). En teori er at tumorcellene som er tilstede i jursekretet går inn i apoptose sammen med tilbakedannelse av resten av kjertelen ved endt sekresjon (25). Hvis dette er tilfellet kan man ved en metøstrus ha

tumorceller i sekretet fra en kjertel, men tumorcellene trenger ikke nødvendigvis å være tilstede i den samme kjertelen ved neste metøstrus.

Celledebris, i form av protein og fett ble det funnet gjennomgående mye av i prøvene. Nøytrofile granulocytter og erytrocytter var mye mer varierende i både tilstedeværelse og mengde, noe som gjør at det er vanskeligere å sammenligne disse typene celler med hundemelk.

Dersom det stemmer at det er så stor forskjell cytologisk på hundemelk og jursekret fra pseudodrektige tisper kan det også tenkes at det er andre forskjeller, for eksempel med tanke på næringsinnhold. Dette har ikke blitt undersøkt i denne oppgaven, men kan være nyttig å se nærmere på i fremtiden. Det er en kjensgjerning at pseudodrektige tisper brukes som ammer hos oppdrettere med mange valper. Dette er kanskje spesielt vanlig i Norge, der en stor andel av tispene er intakte.

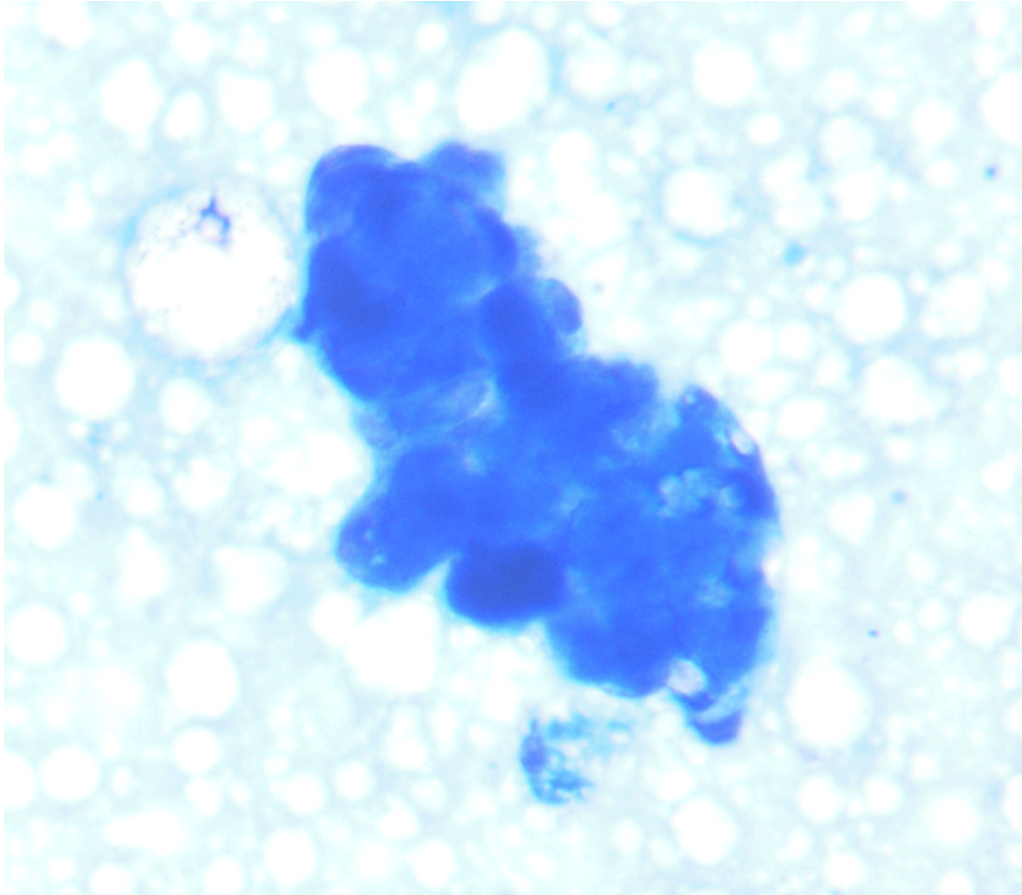
Cytologisk undersøkelse hos de ulike hundene

Skumceller ble funnet i større eller mindre grad i alle kjertlene hos tre av hundene. Hos kasus 3 (engelsk setter) var det skumceller i kun tre av kjertlene, men dette var også de eneste kjertlene det ble funnet celler i. Hos de fire hundene var det ingen av preparatene som inneholdt celler, som ikke også inneholdt skumceller. Generelle trekk er derfor at der det er celler i jursekretet, er det mye skumceller.

Når det gjelder tumorceller ble disse utelukkende funnet i samme preparater hvor det også fantes epitelceller. Epitelceller er i denne undersøkelsen også de cellene som lettest kan forveksles med tumorceller, da både nøytrofile, erytrocytter og skumceller er karakteristiske i utseendet. Mer om differensieringen av epitel- og tumorceller diskuteres nærmere under ”feilkilder”.

Dvergdauchs

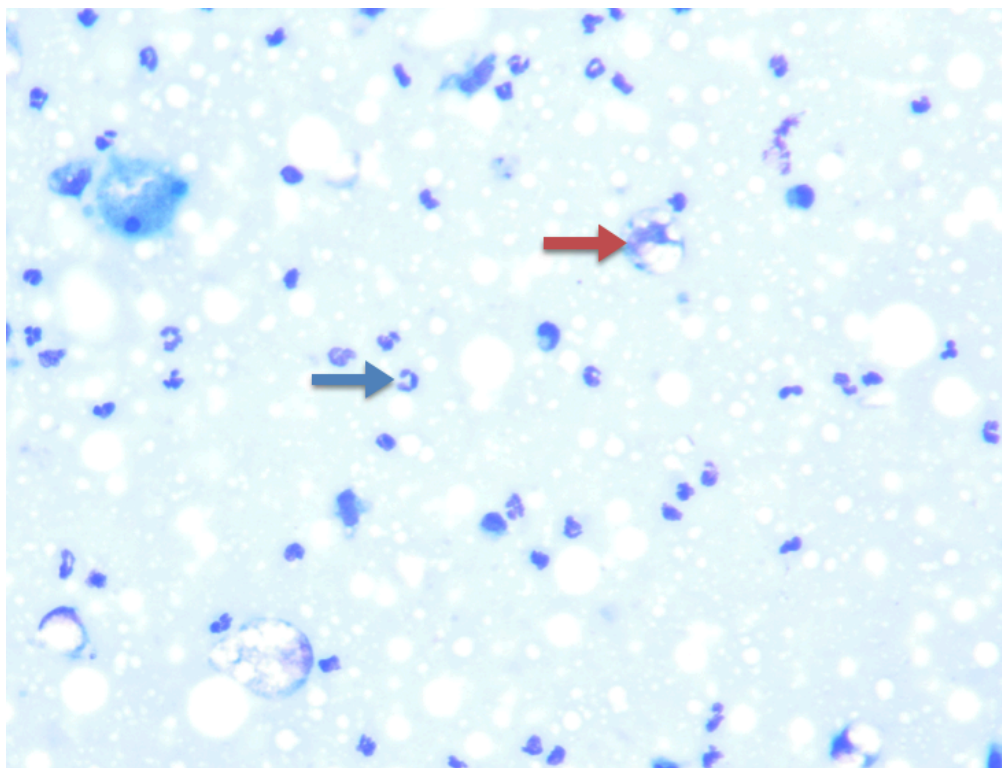
Kasus 1 var en ni år gammel dvergdauchs med i gjennomsnitt to løpetider hvert år. Dachs har en RR på 194 for utvikling av mammatumor. Denne tispa hadde tidligere blitt diagnostisert med mammatumor, som var kirurgisk fjernet ved lumpektomi.



Figur 25. Tumorceller organisert i en celleansamling fra R1 hos kasus 1. Preparatet var farget med MGG.

Cytologisk var det skumceller i alle kjertlene, nøytrofile i to av kjertlene og epiteliale- og tumorceller i en av kjertlene. I kjertelen (R1) med epitel- og tumorceller ble det ikke påvist noen palpatoriske forandringer, mens det i L2 og L3 hvor det var påvist palperbare nydannelser var det ikke noe epitel eller tumorceller cytologisk. Det er derfor ikke noe grunnlag for en påvisbar sammenheng mellom palperbar nydannelse og tumorceller cytologisk hos denne hunden. Kjertelvevet var noe knudrete flere steder og det var vanskelig å avgjøre hva som kunne være nydannelser og hva som kun var kjertelvev. Det så ikke ut til å være noen tydelig assosiasjon mellom makroskopisk utseende på sekretet og cytologi på

denne hunden, inkludert i R3 som inneholdt store mengder nøytrofile granulocytter. Når cellebildet er dominert av nøytrofile granulocytter hadde det vært naturlig å forvente at sekretet skulle være mer tyktflytende og pussaktig. Dette var altså ikke tilfellet, da sekretet i R3 var tyntflytende og gulhvitt, på lik linje med de resterende kjertlene.

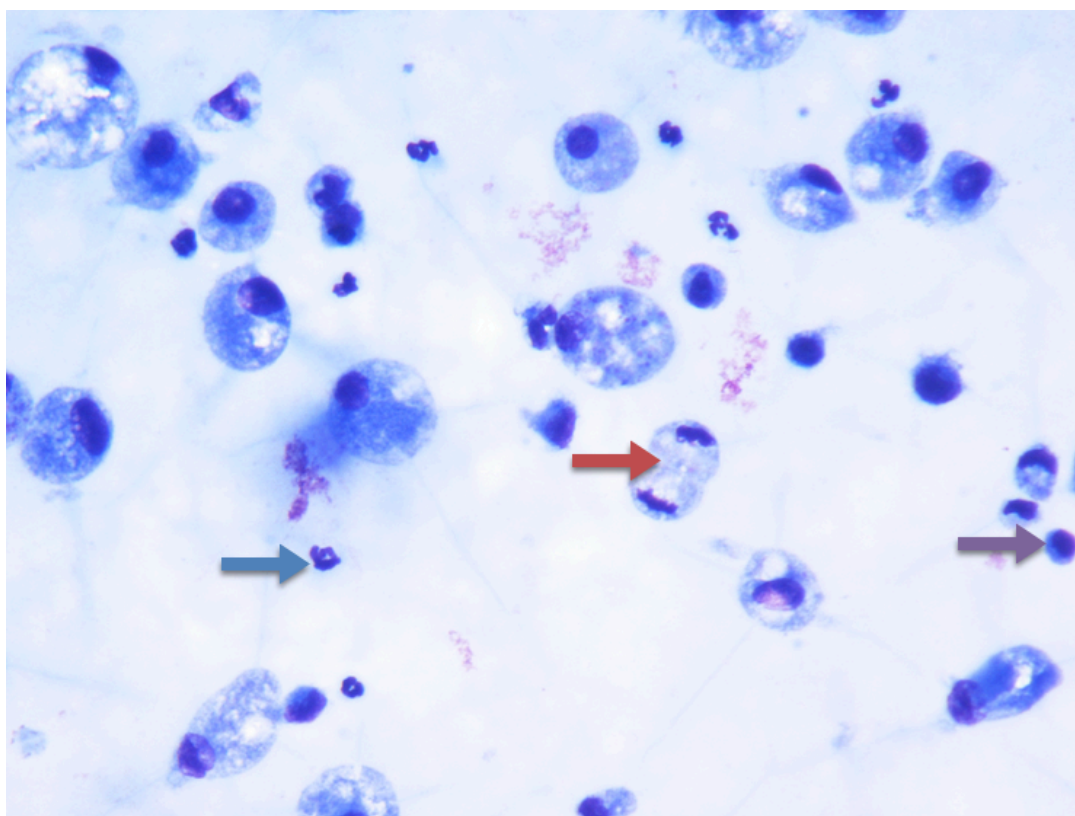


Figur 26. Rikelig forekomst av nøytrofile granulocytter (blå pil) og enkelte skumceller (rød pil) i R3 hos kasus 1. Preparatet var farget med MGG.

Boxer

Kasus 2 var en boxer på fem og et halvt år med i gjennomsnitt to løpetider hvert år. Boxer har en RR på 283 for utvikling av mammatumor og denne hunden hadde ikke vært diagnostisert med mammatumor tidligere. Kjertlene var delvis fyldige og delvis lite aktive. Det ble funnet en nydannelse i området for R3 ved palpasjon, men cytologien på denne var cellefattig med unntak av noen få skumceller. I R2 ble det funnet moderate mengder lymfocytter, epitelceller og tumorceller. Det makroskopiske utseende på sekretet var likt i alle kjertler. Heller ikke hos denne hunden var det assosiasjon mellom palperbar nydannelse og tumorceller cytologisk, ei heller mellom sekret og cytologi. Boxer er den av rasene som har høyest RR for utvikling av mammatumor og det var derfor noe overraskende at det var lite funn hos denne sammenlignet med de andre rasene. Likevel er dette kun resultater fra en enkelt tispe. En mulig forklaring

kan være at dette var den eneste hunden som tidligere hadde gjennomgått en laktasjon, som kan ha ført til mer utskifting av celler i denne hundens kjertler. Humant har det vist seg å være en forebyggende effekt av laktasjon, for utvikling av brystkreft (52). Både en mulig forebyggende effekt av den gjennomgåtte laktasjonen, og hundens relativt unge alder, kan ha betydning på hvorfor denne boxeren ikke hadde større forekomst av tumores og tumorceller i sekretet. Det er selvfølgelig også en mulighet at dette er helt normale funn i jursekret fra en fem og et halvt år gammel pseudodrektig boxer.



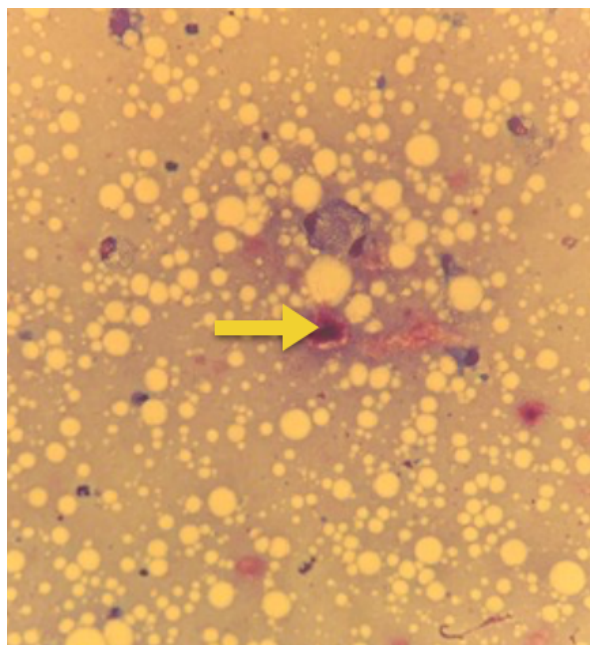
Figur 27. Eksempel på et pleomorft preparat fra L1 hos kasus 2. Mitosefigur av skumceller (rød pil). Nøytrofil granulocyt (blå pil). Lymfocyt (lilla pil). Preparatet var farget med MGG.

Engelsk setter

Kasus 3 var en engelsk setter på fire og et halvt år med i gjennomsnitt en og en halv løpetider hvert år. Hun var den yngste hunden som var med i undersøkelsen og hadde ikke tidligere vært diagnostisert med mammatumor. Engelsk setter er også rasen av de fire hundene med lavest RR for utvikling av mammatumor med en RR på 154. Hun hadde tidligere fjernet en

mastcelletumor mellom L4 og L5, og hadde multiple nydannelser ellers på kroppen. Ved undersøkelse av juret ble det ikke funnet noen nydannelser, men en mild hevelse i huden kaudalt for L5. Preparatene var generelt cellefattige med lite funn sammenlignet med de andre hundene. Men denne hunden var den som hadde størst tilstedeværelse av både fett og protein, i samtlige kjertler. Av de fire hundene som er undersøkt er det denne hunden sitt sekret som likner mest på melk.

Det ble kun påvist celler i tre av kjertlene, noe som var overraskende med tanke på at denne hunden var noe lenger ut i syklus enn de andre hundene. Den unge alderen til denne tispå, kan også ha være av betydning for få antall celler i den cytologiske analysen. I L5 var det moderate mengder rosa granula som minner om mastcellegranula, men mastceller kunne ikke med sikkerhet påvises i hverken dette preparatet eller fra noen av de andre kjertlene. L5 var også den eneste kjertelen som hadde moderate mengder med celler. Det kan tenkes at granula i L5 stammer fra mastcelletumor kaudalt for L5.



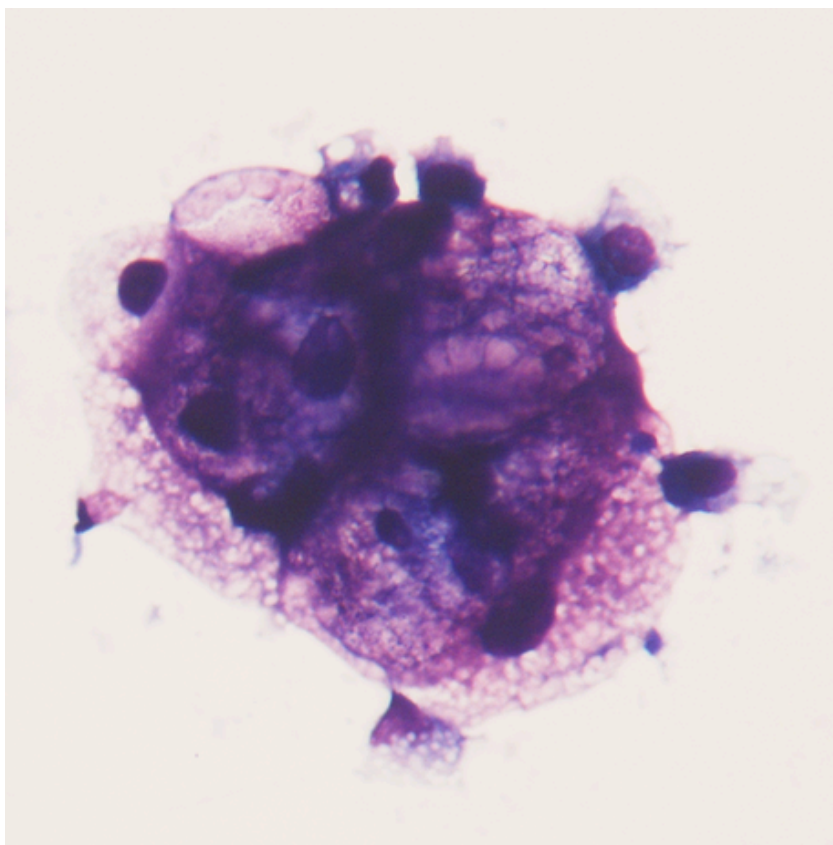
Figur 28. Potensielt mastcellegranula (gul pil) i L5 hos kasus 3. Preparatet var farget med HC.

Bichon frisé

Kasus 4 var en bichon frisé på 10 år med gjennomsnittlig to til tre løpetider hvert år. Bichon frisé har en RR på 136 for utvikling av mammatumor. Dette var en hund som var mye plaget med pseudodrektighet, men hadde ikke tidligere blitt diagnostisert med mammatumor. Hos denne hunden var det mye funn både makro- og mikroskopisk. Det var aktivt vev i alle jurkjertler og L2 var spesielt stor og hoven. Sekretet fra denne kjertelen var ganske normalt, med en hvit og gul farge, mens det i L4 var blodig og pussaktig sekret. Sekretet hadde generelt mye brun og gul farge fra alle kjertlene, med unntak av R1 som var hvitere i fargen. Dette ble gjenspeilet i cytologipreparatene hvor alle kjertler bortsett fra R1 hadde moderat til høy forekomst av erythrocytter. Her ble det altså sett en sammenheng mellom brunlig sekret og erythrocytter. I R1, som var den eneste kjertelen uten erythrocytter, var det både epiteliale celler

og tumorceller. Epitelceller ble også funnet i fire andre kjertler, hvor det i to av disse også var tumorceller. I L4, hvor sekretet var pussaktig makroskopisk var det moderate mengder nøytrofile granulocytter, men det var en høyere forekomst av nøytrofile i L2, som kun var gulhvitt makroskopisk. Det var altså ingen sammenheng mellom kjertel som synes å være betent og antall nøytrofile granulocytter, eller motsatt. Det er derfor grunn til å tro at hevelsen som var tilstede ved L2 ikke var i sammenheng med kjertelvevet. En annen årsak kan være at jursekretpøven ikke var representativ for alle kjertelenhetene. Dersom hevelsen stammet fra en kjertelenhet kan for eksempel en tilstoppet spenekanal ha gjort at prøven ikke er representativ for denne enheten, og derav ikke kjertelen som helhet.

Jurepitel i lumen i den sekretoriske kjertel er forbundet av tette tight-junctions som vanligvis hindrer lekkasje av laktose og melkeprotein fra alveolelumen til ekstracellulærvæsken. Dersom epitelet er skadet, pga manglende tømning, mastitt eller skade, vil forbindelsene bli ødelagt og melkekomponenter kan lekke inn i blodbanen (9).



Figur 29. Tumorceller organisert som en celleansamling i L1 fra kasus 4. Preparatet var farget med HC.

Hos pseudodrektige tisper er det i de fleste tilfeller manglende tømning av juret som igjen kan føre til skadet epitel i kjertelen. Dermed kan det også være en mulighet for at blodkomponenter lekker inn i kjertellumen, som kan være en forklarende faktor for den høye forekomsten av erythrocytter i kasus 4 sine preparater.



Figur 30. Erythrocytter dominerer i preparatet fra L5 hos kasus 4. Preparatet var farget med HC.

Sammenfatning av de fire kasus

Når man ser på de fire hundene totalt er det åpenbare forskjeller mellom individene, men likevel overraskende ulikhet fra kjertel til kjertel på samme individ. Selv om det ikke er noen kommunikasjon mellom hver enkelt jurkjertel (9) er det likevel interessant at en og samme hund kan ha moderat til høy forekomst av blodceller i alle kjertler bortsett fra en. Det er også stor variasjon i tilstedeværelse av epitel i de ulike kjertlene hos samme hund.

Noe overraskende er det også at det var ingen sammenheng mellom palperbare nydannelser og funn av tumorceller cytologisk, hos samtlige hunder. Tumorceller ble kun funnet i kjertler

der det også ble funnet epitelceller, men det ble også funnet epitelceller i kjertler man ikke fant tumorceller.

Tidspunkt for prøvetaking

Prøvene ble tatt på noe ulikt tidspunkt etter endt løpetid, hos de fire hundene i studien. Tre av hundene var ca 10 uker etter endt løpetid, mens den siste var ca åtte og en halv uke etter endt løpetid. Når i syklus hundene er kan trolig ha betydning for sammensetningen av sekretet og tilstedeværelse av de ulike cellene man finner i jursekretet.

De tre hundene det ble tatt prøver av ca 10 uker etter endt løpetid hadde varierende mengder av fett og protein tilstede i sekretet ved cytologisk undersøkelse, men generelt mer enn tispa som var åtte og en halv uke etter endt løpetid. Hos to av hundene som var 10 uker etter endt løpetid var det svært mye fett og protein tilstede, men generelt lite andre celler. Dette er motsatt i forhold til tispa som var åtte og en halv uke etter endt løpetid, som generelt hadde mer celler og mindre fett og protein i sitt jursekret. Den hunden som var kortest ut i metøstrus hadde blod i alle kjertler bortsett fra en. Samme hund hadde høyest forekomst av epitel og tumorceller sammenlignet med de andre, og kun fett i en kjertel. Dette kunne tenkes å ha sammenheng med tidspunkt for prøvetaking, men stemmer ikke overens med det man ser hos tisper i ordentlig laktasjon. Hos lakterende tisper er det mye fett og protein i melken i starten av diegivningsperioden, mens det skjer en akkumulering av nøytrofile granulocytter og makrofager i kjertelen mot slutten av laktasjonen da valpene avvenes (9).

Optimalt burde alle hundene vært nøyaktig på samme tidspunkt i metøstrus når prøvene ble tatt. Det hadde også vært interessant å ta flere prøver fra de samme hundene gjennom laktasjonen for å se hvordan cellebildet og tilstedeværelsen av fett og protein eventuelt forandret seg fra tidlig til sent i sekresjonen.

Palperbare strukturer i jurkjertel

Under en laktasjon eller ved jursekresjon hos pseudodrektige tisper er kjertelvevet aktivt. I denne perioden kan det være utfordrende å skille mellom hva som er aktivt kjertelvev og hva

som kan være potensielle små nydannelser. I tillegg kan man ha tilstoppede melkekanaler, tydelige spenekanaler, melkekoagler og liknende som ikke normalt er tilstede i inaktive kjertler. Dette kan være utfordrende å differensiere fra små nydannelser. Med andre ord, er det generelt ikke optimalt å undersøke om en hund har mammatumores når tisper er i metøstrus. Det ble derfor vurdert å ta videre prøver av de palperbare potensielle nydannelsene, som for eksempel finnålsapirat (FNA). Dette kunne gitt oss nærmere svar i forhold til om det var mammatumores eller ikke. Dette ble ikke inkludert i denne studien.

Av hundene i denne studien ble det funnet potensielle nydannelser i flere kjertler, men det ble som nevnt tidligere ikke funnet tumorceller cytologisk i de samme kjertlene. De potensielle nydannelsene kan ha vært strukturer forbundet med metøstrus som nevnt over. Det kan likevel ikke utelukkes at de palperbare strukturerne i kjertlene var nydannelser, men at man likevel ikke fant tumorceller i jursekretet.

Feilkilder

I denne studien er det potensielt mange feilkilder. I det følgende vil de mest relevante og kritiske punktene i denne oppgaven gjennomgås og i hvilken grad det er feilkilder som kan ha påvirket resultatene våre.

Utvalg og utvalgsstørrelse

Ved planleggingen av dette studiet ønsket vi å se på hunder med økt fare for å utvikle mammatumor, og vi valgte oss ut tre ulike raser. I tillegg ønsket vi en kontrollrase, med lav forekomst av mammatumor. Planen var å ha minimum tre hunder av de totalt fire ulike rasene. På denne måten kunne man til en viss grad sammenlikne de ulike rasene med hverandre, men også opp mot de andre rasene - med henholdsvis høy og lav risiko. Vi ønsket også undersøke tisper som var i en relativt høy alder, der sannsynligheten for at de har eller kom til å utvikle mammatumor i nær framtid var stor. Alderen ble satt til tisper over åtte år.

Hundene vi har med i studien er alle av raser som ligger over landsgjennomsnittet for å utvikle mammatumor. I og med at vi kun har en hund av hver rase gjør at det ville vært feil å

si noe om den enkelte rasen som helhet. Hadde vi hatt med minimum tre hunder av hver rase, som vi planla, kunne man i større grad sagt noe om trendene innad i den enkelte rasen. Det ville likevel fort oppstått store feilkilder hvis man trakk konklusjoner ut av et så lite studieutvalg.

Kjertler som enhet

I denne studien har vi valgt å bruke hver enkelt kjertel som studieenhet. Dette er et opphav til feilkilder, da kjertlene som tilhører samme individ ikke er uavhengige enheter. Vi har likevel valgt kjertel som studieenhet for å ha et størst mulig materiale, da avhengigheten ikke har fullt så stor betydning for et deskriptivt studie. I studien har vi sett at det er store likheter ved sekretet hos en og samme hund, i de ulike kjertlene. Det er også store forskjeller mellom kjertlene som tilhører hver enkelt hund.

Det ble i studien tatt høyde for at man ikke kan trekke noen konklusjoner når hver enkelt kjertel er en studieenhet, men studieutvalget ble brukt til å se trender.

Tidspunkt for prøveuttak

Som tidligere nevnt, har trolig tidspunktet for prøveuttak i metøstrus, hatt noe å si for jursekretets sammensetning. Da dette er et lite undersøkt område hadde det vært optimalt å ta speneprøver fra den samme tispas på flere tidspunkt gjennom den samme jursekresjonen. Dette ville gitt informasjon om sammensetningen av sekretet endrer seg gjennom syklusen. Dersom cellesammensetningen i jursekretet endres, burde alle tispene i studien optimalt vært på samme sted i metøstrus ved prøvetakning.

I denne undersøkelsen skilte den ene hunden som var tidlig i metøstrus seg ut, i form av å ha et mer cellerikt jursekret enn de andre tispene. Det er ikke mulig å si om det økte celletallet hos denne tispas skyldes at hun var tidligere i metøstrus, eller om det var tilfeldige funn. Dette ettersom det kun ble tatt prøver en gang, og av en hund, på dette tidspunktet i metøstrus.

Prøveuttak og analyse

Prosedyrene for prøveuttak er standardiserte, og lette å følge. En feilkilde her er at det er ulike personer som har utført de ulike delene av prosedyren hos de ulike hundene. Selv om prosedyren er nøye beskrevet kan det være individuelle forskjeller av hvordan prøvetakingen er utført.

Vurderingen av alle cytologiske preparater har vi gjort sammen. Alle tre har sett på samtlige preparater, samtidig. Alle preparatene ble først undersøkt på lav forstørrelse for å få et totalinntrykk. Deretter har ulike områder, som var representative for det aktuelle utstryket, blitt undersøkt på høyere forstørrelse. Områder med celleansamlinger av potensiell interesse har vært undersøkt på høy forstørrelse. Vi har sett på trender i utstryket, hvilke celler som dominerer cellebildet og ratioen i forhold til andre celler tilstede i preparatet. For å standardisere denne analysen kunne man valgt å telle antallet av de ulike cellene per synsfelt, og hatt som standard at man så på et gitt antall synsfelt på de bestemte forstørrelsene. Det ble ikke gjort i denne studien, og gir derfor opphavet til større feilkilde enn om analysemetoden hadde vært mer standardisert. Det at vi har analysert alle preparater sammen kan også gi opphav til feilkilde, da vi kan ha påvirket hverandre.

Ved analyse av de cytologiske preparatene ble hver av celletypene, samt fett og protein, gitt en verdi fra null til tre. Null gjenspeilet at det var ingen, eller svært få, mens tre betydde at det var svært mye. Dette tallsystemet var kartlagt på forhånd. Ved analyse av preparatene hadde man med fordel kunne hatt en større skala å bruke for mer nøyaktig å kunne si noe om antallet celler tilstede i jursekretet hos de ulike hundene.

Tumor vs. epiteliale celler

Det som ble vurdert som epiteliale celler var celler som lå inntil hverandre i områder av preparatene, uten unormale morfologiske forandringer. Cellene som ble vurdert til tumorceller var celler som lå i "clustere" med maligne trekk som vakuoler, flere kjerner, mye kromatin og et "tredimensjonalt" utseende. Det er likevel en mulighet for at klumper av epitelceller ble tolket som tumorceller eller motsatt. For å minske risikoen for denne feilkilden, ble det tatt bilder av celleclustre som var vanskelige å tolke. Disse bildene ble vist og diskutert med

veileder. I tillegg er det selvfølgelig også en mulighet for at det fantes tumorceller i sekretet fra kjertler som ikke kom med i prøven som ble tatt.

Eieropplysninger

Ved utregning av hvor lang tid det er siden avsluttet løpetid har vi beregnet oss på informasjon fra eiere. Det er en kjensgjerning at det er lettere å huske når en løpetid starter, enn når den avsluttes. Det er med andre ord en potensiell feilkilde i forhold til hvor i sekresjonen de pseudodrektige tispene faktisk er.

Alle eiere fylte ut et spørreskjema før prøvetakningen fant sted. På dette spørreskjemaet ble det blant annet spurt om hunden har eller tidligere har hatt mammatumor. Det var to av tispene i denne studien som hadde fjernet tumorer, som var lokalisert i eller i nærhet til juret. Det var noe uklart for disse eierne om tumoren som var fjernet hadde opphav fra selve jurkjertelen, eller annet omkringliggende vev.

Konklusjon

Basert på undersøkelsene gjort i denne studien, er det ikke mulig å finne noen sammenheng mellom innhold i jursekret og forekomsten av mammatumor. Dette vurdert på grunnlag av at det både ble funnet palperbare nydannelser og tumorceller, men aldri i samme kjertel. Målet med denne oppgaven var heller ikke å fatte noen endelig konklusjon om assosiasjonen mellom celler i jursekretet og mammatumor. Dette på bakgrunn av at det på forhånd var kjent at studien var en pilotstudie, samt at undersøkelsens varighet var over en kort tidsperiode. Studien gir likevel et godt grunnlag for videre forskning på området. Et potensielt fremtidig forskningsprosjekt er å inkludere flere pseudodrektige tisper av raser med høy forekomst av mammatumor, samt inkludere et bestemt antall pseudodrektige tisper av en rase med lav forekomst, som kontrollrase. Det er også hensiktsmessig å følge disse tispene over en lengre tidsperiode med flere prøvetakinger underveis. På denne måten kan man sammenligne forekomsten av ulike celler i jursekretet fra ulike tidsperioder og i ulike stadier i syklusen, samt vurdere om eventuelle tumorceller i jursekret har en sammenheng med senere palperbare mammatumores.

Jursekretet fra tispene inkludert i denne studien hadde ingen forekomst av bakterier. Dette skiller seg fra bakterieforekomsten i hundemelk, og er derfor et vesentlig funn. At det forekommer bakterier i melk hos lakterende tisper er vist i utenlandske studier. Melk hos lakterende tisper blir også forsket på i Norge, der det også har vært funn av bakterier i melken, disse dataene er dog ikke publisert enda (25).

Innholdet i jursekret fra pseudodrektige tisper synes å kunne inneholde protein, fett, skumceller, nøytrofile granulocytter, lymfocytter, epitelceller, erytrocytter og tumorceller basert på våre undersøkelser. Denne studien forteller oss at jursekretet fra pseudodrektige tisper er dominert av hovedsakelig fett og protein, samt store mengder skumceller. Jursekretet har varierende mengder nøytrofile granulocytter og mindre mengder epitelceller, erytrocytter og lymfocytter. Basert på våre analyser, er jursekret fra pseudodrektige tisper forskjellig fra vanlig hundemelk hos lakterende tisper.

Skumceller var tilstede i alle kjertler hvor det fantes celler og tumorceller ble ikke observert i kjertler hvor det ikke var epitelceller.

Studien har bidratt til utarbeidelse av gode prosedyrer for prøvetaking og undersøkelse. Prosedyren har vært vellykket med tanke på kvaliteten på cytologipreparatene, men mindre god med hensyn på resultatene fra den bakteriologiske dyrkningen. Likevel var det tydelig hva som var forurensing på dyrkningsprøvene i denne studien. Vi anser derfor ikke dette til å ha påvirket våre resultater.

Ettersom resultatene kun er basert på undersøkelser fra fire tisper er det ikke mulig å konkludere med at de gir et entydig bilde gjeldende for alle tisper i pseudodrektighet. Det er likevel trolig en viss generaliserbarhet for den norske tisperpopulasjonen, siden studien har tatt utgangspunkt i jursekretprøver fra tisper av fire forskjellige raser og aldre.

Denne studien gir altså ikke noe grunnlag for assosiasjon mellom innhold i jursekret og mammatumor, men beskriver hva jursekret hos pseudodrektige tisper består av basert på de fire individene inkludert i undersøkelsen.

Takk til bidragsyttere

En stor takk til professor Lars Moe og førsteamanuensis Vibeke Rootwelt ved NMBU som har veiledet oss gjennom hele utarbeidelsen av denne oppgaven.

Takk til hundeeiere og deres hunder som har stilt opp for undersøkelse og prøvetaking.

Takk til professor Henning Sørum og hans kollegaer ved bakteriologisk laboratorium ved NMBU for dyrkning og analyse av prøver.

Takk til stipendiat Sabina Sobic for hjelp og veiledning underveis, både i form av utstyr og sin kunnskap på området.

Takk til avdelingsingeniør Kaia Elizabeth Hunter, ved Institutt for sports- og familiedyrmedisin, for farging og montering av preparatene våre.

Summary

Title: Cells and bacteria in the secretion from the mammary gland during pseudopregnancy among normal bitches.

Based on case studies

Authors: Marte Holmøy Bratteberg, Ellen Nordstoga Haldorsen og Ida Vesterbakk

Supervisors: Lars Moe og Vibeke Rootwelt, Institutt for sports- og familiedyrmedisin

This pilot study evaluates the cells and bacteria in milk of pseudopregnant bitches. Samples were obtained from mammary glands for cytology and bacterial cultivation from four bitches of different breeds, during the spring of 2019. Each bitch had between eight to ten teats. The sampling was done at the Small Animal Clinic at NMBU (Norwegian University of Life Sciences) and the bacterial cultivation was analyzed in the Section of microbiology, immunology and parasitology at NMBU. The cytology samples were mounted after staining at the Small Animal Clinic at NMBU, using two different colouring methods (Hemacolor and May-Grünwald Giemsa). A full clinical examination including a thorough examination of the udder were performed on each dog at the day of the sample collection.

The results from the cytology was considered together with the findings from the examination of udder and macroscopic appearance of the milk. Milk was sampled for bacterial cultivation using blood agar, and was analyzed for growth at two different occasions. The results were compared with the limited available literature on the subject of dog milk cytology.

Findings of relevance were 1) no bacterial growth was detected in any of the glands. Despite moderate amounts of inflammatory cells in many of the glands, several of them had abnormal swelling and puss on the macroscopic evaluation, 2) the cytology results showed significant differences between normal dog milk shown by earlier studies, and milk from pseudopregnant bitches, especially regarding epithelial- and foamy cells. A higher amount of foamy cells and a lower amount of epithelial cells were found in the milk from pseudopregnant bitches, compared to findings in dog milk and 3) tumor cells were found in several of the glands, but there was no correlation between palpable growths in the udder and tumor cells on cytology.

The results in this pilot study is both exiting and surprising, and creates a foundation for future research on the subject.

Referanser

1. Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2nd ed. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. 683-730 p.
2. Brørs O, Dietrichs E. Dopaminagonister. In: leksikon Sm, editor. Store medisinske leksikon2009.
3. Roald B. Dysplasi. In: leksikon Sm, editor. Store medisinske leksikon2009.
4. Grønstøl H. Veterinærmedisinsk ordbok. Oslo: Samlaget; 2004.
5. Store medisinske leksikon. 2009. Homeostase.
6. Klepp O. Karsinogenese. In: leksikon Sm, editor. Store medisinske leksikon2009.
7. Svihus B. Melk. Store norske leksikon2009.
8. Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2nd ed. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. 47-71 p.
9. Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2nd ed. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. 735-59 p.
10. Berg JP. Oksytosin. In: leksikon Sm, editor. Store medisinske leksikon2009.
11. 2009. Progesteron.
12. Halse JoB, Jens Petter. Prolaktin. In: leksikon Sm, editor. Store medisinske leksikon2009.
13. Nelson RW, Couto CG. Small animal internal medicine. 5th ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier; 2014. 915-44 p.
14. Berg JP. Sekret. In: leksikon Sm, editor. 2009.
15. Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2nd ed. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. 79-102 p.
16. Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Physiology of domestic animals. 2nd ed. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press; 2010. 355-422 p.
17. Nelson RW, Couto CG. Small animal internal medicine. 5th ed. ed. St. Louis, Mo: Mosby Elsevier; 2014. 897-915 p.
18. Farstad W. Reproduksjon hos rovdyr. Oslo: Institutt for produksjonsdyrmedisin; 2007.
19. Indrebø A. Genetikk, avl og oppdrett. 3. utg. ed. Oslo: Norsk kennel klub; 2005.
20. Thangamani A, Srinivas M, Anusha K. Canine Pseudopregnancy: A Review. Research & Reviews: Journal of Veterinary Science and Technology. 2018;7(1).

21. Root AL, Parkin TD, Hutchison P, Warnes C, Yam PS. Canine pseudopregnancy: an evaluation of prevalence and current treatment protocols in the UK. *BMC veterinary research*. 2018;14(1).
22. Côté E. *Clinical veterinary advisor : dogs and cats*. 2nd ed. ed. St. Louis, Mo: Elsevier/Mosby; 2011.
23. Hurley WL. *Comparative Lactation - Cats and Dogs* 2009 31.03.2019. Available from: <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Lactation/catsdogs.html>.
24. Singh B, Dyce KM, Wensing CJG, Sack WO. *Dyce, Sack, and Wensing's textbook of veterinary anatomy*. 5th ed. ed. St. Louis: Elsevier; 2017.
25. Moe L, Sibicic S. Personlig meddelelse. 2019.
26. Asa CS, Valdespino C. Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. *American Zoologist*. 1998;38(1).
27. Concannon PW, Hon DA. *Physiology and Clinical Parameters of Pregnancy in Dogs*. 2002.
28. Vasiu IeA. Usefulness of cytological evaluation of milk in diagnosing mastitis in bitches. *Med Weter*. 2018;74(10):640-5.
29. universitetssykehus O. *Brystbetennelse - Mastitt*. Oslo universitetssykehus; 2016.
30. Lambe M, Johansson AL, Altman D, Eloranta S. Mastitis and the risk of breast cancer. *Epidemiology*. 2009.
31. Polton G. Mammary tumours in dogs. *Irish Vet J*. 2009;62(1).
32. Sorenmo K, Kristiansen V, Cofone M, Shofer F, Breen AM, Langeland M, et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and comparative oncology*. 2009;7(3).
33. Goldschmidt M, Peña L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Veterinary pathology*. 2011;48(1).
34. Baba AI CC. *Comparative oncology*. Academy TphotR, editor. Bucuresti 2007.
35. Klug WS. *Essentials of genetics*. 8th ed. ed. Boston: Pearson; 2013. 324 p.
36. Arnesen K, Glatte E, Moe L, Gamlem H, Grondalen J, Nordstoga K. Hundekreftregisteret i Norge 1990-1998. Rapport om prosjektet Kreft hos hund. *Norsk veterinærtidsskrift*. 2000;112(3).

37. Støvring M, Moe L, Glattre E. A population-based case-control study of canine mammary tumours and clinical use of medroxyprogesterone acetate. *Apmis*. 1997;105(7-12).
38. Selman PJ, Mol J, Rutteman GR, van Garderen E, Rijnberk A. Progestin-induced growth hormone excess in the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology*. 1994;134(1).
39. Beauvais W, Cardwell J, Brodbelt D. The effect of neutering on the risk of mammary tumours in dogs—a systematic review. *Journal of Small Animal Practice*. 2012;53(6).
40. Dobson J, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood J. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice*. 2002;43(6):240-6.
41. Kristiansen V, Pena L, Diez Cordova L, Illera J, Skjerve E, Breen A, et al. Effect of ovariectomy at the time of tumor removal in dogs with mammary carcinomas: a randomized controlled trial. *Journal of veterinary internal medicine*. 2016;30(1).
42. Schneider R. Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*. 1970;26(2).
43. Kutzler M. Overview of Mammary Tumors. *MSD Veterinary Manual*. Oregon State University.
44. Gundim LF, De Araujo CP, Blanca WT, Guimarães EC, Medeiros AA. Clinical staging in bitches with mammary tumors: Influence of type and histological grade. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2016;80(4).
45. Kaszak I, Ruszczak A, Kanafa S, Kacprzak K, Król M, Jurka P. Current biomarkers of canine mammary tumors. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2018;60(1).
46. Medela. Sikkerhet og infeksjonskontroll for brystmelk ved nyfødt intensiv avdeling. 2016.
47. Tønjum T. Baciller. *Store medisinske leksikon*2009.
48. Granum PE. Matforgiftning : næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksikasjoner. 3. utg. ed. Kristiansand: Høyskoleforl.; 2007.
49. Britannica TEoE. Micrococcus. *Encyclopaedia Britannica*2017.
50. Tønjum T. Stafylokokker. *Stor medisinske leksikon*2009.
51. Veterinærinstituttet. Meticillinresistente stafylokokker15.02.2019. Available from: <https://www.vetinst.no/sykdom-og-agens/methicillinresistens-mrsa-mrsp>.

52. Unar-Munguía M, Torres-Mejía G, Colchero MA, Gonzalez de Cosio T. Breastfeeding mode and risk of breast cancer: a dose–response meta-analysis. *Journal of Human Lactation*. 2017;33(2).

Vedlegg

Vedlegg 1: Infoskriv til hundeeier



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for sports- og familiedyrmedisin

Oslo 13. november 2018

JURHELSE HOS TISPE PILOTUNDERSØKELSE OM INNBILT DREKTIGHET

Vi er veterinærstudenter ved NMBU Veterinærhøgskolen som holder på med et forskningsprosjekt under avslutningen av studiet. Veiledere er professor Lars Moe og Vibeke Rootwelt.

Det pågår et større forskningsprosjekt om jurhelse hos tisper, og vi gjennomfører en mindre undersøkelse av voksne tisper (7 år eller eldre) fra 4 raser i perioden hvor de er innbilt drektige. Alle tisper får i varierende grad tegn på innbilt svangerskap ca 2 måneder etter endt løpetid. Enkelte viser tydelig atferdsendring. Alle tisper produserer melkelignende sekret fra jurkjertlene sine i denne perioden. Vi ønsker å undersøke tisper som er 8 år eller eldre fra 4 raser i denne metode- og pilotundersøkelsen: boxer, springer spaniel, Shetland sheepdog og dachs. Tispa kan godt bidra selv om hun har hatt valper eller har hatt jursykdommer tidligere. Mennesker og hunder har samme type melkekjertler og "spener" med mange åpninger på hver. Vi ønsker å belyse om våre funn kan bidra i tidlig diagnostikk av jursvulst hos tispe, og om de kan brukes for å forstå utviklingen av brystkreft hos kvinner.

Målet er å utvikle metoder for å studere bestanddeler i sekretet, å beskrive cellene som finnes og å undersøke om det finnes bakterier i det melkelignende sekretet. Vi ønsker å undersøke om slike bestanddeler kan brukes til å si noe om risiko for utvikling av jursvulst. Dette er et viktig arbeid, som din hund kanskje kan bidra med!

Hva vi gjør med hunden din

Ta ut melkesekret (noen dråper) fra hver av spenene til din tispe. Det krever ingen bedøvelse og er ikke smertefullt. Sekretprøvene vil bli benyttet til å dyrke bakterier og må tas ut sterilt med hansker. Før selve prøvetakingen, vil vi derfor klippe litt pels rundt hver spene, og desinfisere med 70% sprit. Sekretprøver vil bli farget og analysert i mikroskop og dyrkning for bakteriologi vil bli foretatt etter standardiserte metoder.

Undersøkelsen gjøres ved Institutt for sports- og familiedyrmedisin i Oslo, men i enkelte tilfelle kan vi også ta prøvene hjemme hos eieren. Bakteriprøvene må såes ut i laboratoriet i løpet av kort tid og vi kan derfor ikke reise langt fra Universitetet.

Data vil bli lagret med passordbeskyttelse på våre datamaskiner og andre får ikke adgang til data. Resultatene vil være anonymisert slik at den enkelte eier og hund ikke kan identifiseres.

Hvis du ønsker det vil din hund få en gratis helsesjekk som takk for hjelpen. Vi kan også bistå med enkle undersøkelser og behandlinger, som f.eks. kloklipp, ormebehandling for utenlandsreise og vaksinasjon, mot dekning av selvkost for medisiner.

Dersom du har spørsmål så ta kontakt via e-post eller på telefon når som helst med en av oss.

Vi håper at du vil hjelpe oss til å bedre jurhelsen hos tispe og setter stor pris på ditt bidrag!

Med vennlig hilsen


Marte Bratteberg


Lars Moe


Ida Vesterbakk


Ellen Haldorsen


Vibeke Rootwelt

Vedlegg 2: Analyteskjema cytologi

Analyteskjema Cytologi

Navn hund:

ID hund:

Rase:

Uttaksdato:

Analysedato:

Kommentar til hunden /sekretet:

KJERTEL ID	Bakgrunn	Nøytrofile	Skumceller	Bakterier	Erytrocytter	Lymfocytter	Epiteliale celler	Tumorceller	Kommentarer
L1									
L2									
L3									
L4									
L5									
R1									
R2									
R3									
R4									
R5									

Vedlegg 3: Spørreskjema til eiere/samtykkeskjema

Samtykke og spørreskjema for pilotstudie om pseudodrektighet og mammatumor ved NMBU Veterinærhøgskolen

Kontaktinformasjon eier:

Navn:

Telefonnummer:

Epost:

Adresse:

Spørsmål om din hund:

Navn	
Rase	
Alder	
Er din hund plaget med innbilt svangerskap?	
Dato for avsluttet løpetid	
Dato for start av løpetid	
Ant løpetider pr år	
Har eller er din hund blitt diagnostisert med jursvulst tidligere?	
Har søsken/mor vært diagnostisert med jursvulst deg bekjent?	
Har hunden din tidligere hatt jurbetennelse/mastitt? Hvis ja: Var det i forbindelse med drektighet/diing eller var det utenom drektighet?	

Du som eier har når som helst mulighet til å trekke deg med din hund fra studien uten at det fører til sanksjoner.

Samtykke:

Jeg samtykker med dette i at det kan tas speneprøver av min hund til bruk i dette studie.

Sted/Dato:

Signatur:

.....

.....

Vedlegg 4: Undersøkesskjema

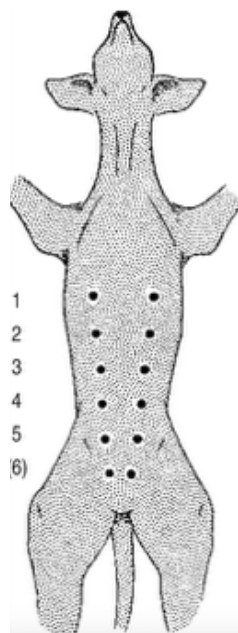
Undersøkesskjema

Navn eier:
 Navn hund:
 Fødselsdato hund:
 Race:
 Dato prøveuttak:
 Mammatumor ja/nei:

Klippet

Vasket

Spritet



Kjertelnummer	HØYRE		VENSTRE	
	Sekret (makroskopisk)	Kjertel (makroskopisk)	Sekret (makroskopisk)	Kjertel (makroskopisk)
1				
2				
3				
4				
5				
6				

Vedlegg 5: Søknad om pengestøtte til Hundekreftregisteret

Søknad om støtte til forskning på pseudodrektighet og mammatumor hos tise

Prosjektansvarlig institusjon:

Seksjon for smådyrsykdommer ved Institutt for sports- og familiedyrmedisin

Administrativt ansvarlige:

Ellen Nordstoga Haldorsen, Marte Holmøy Bratteberg, Ida Vesterbakk

Prosjektleder:

Lars Moe, medveileder Vibeke Rootwelt

Prosjekttittel:

Pseudodrektighet og mammatumor

Undertittel:

Celler i jursekret under pseudodrektighet hos voksne til eldre tisper av raser med høy forekomst av mammatumor

Prosjektets hovedmål og delmål

Hovedmålet med denne pilotstudien er å kartlegge innholdet av celler og evt bakterier i sekret fra pseudodrektige tisper og se om det er noen tegn til assosiasjon med disse resultatene og utviklingen/forekomsten av mammatumor. Det er tidligere gjort lite undersøkelser på området, noe som gjør at mye av arbeidet vil være deskriptivt.

- Delmål 1: Beskrive sekret - deskriptivt
- Delmål 2: Sammenligne funn fra høy- og lavrisikoraser - assosiasjon

Prosjektsammendrag

Mammatumor er et stort og vanlig problem hos norske tisper. 50% av tumorer hos tisper er mammatumorer og 50% av disse er maligne. Spredning til andre organer, fortrinnsvis lunge er en vanlig komplikasjon hvis ubehandlet. Per nå finnes det ingen tidlig diagnostikk for sykdommen, før man faktisk kan palpere frem en potensiell ondartet nydannelse i juret. Tidligere er det lite studert hva sekret fra pseudodrektige tisper består av. Vi vil først og fremst finne ut hva sekretet inneholder, deretter vurdere om funnene våre kan brukes til å si noe om assosiasjonen for utvikling mammatumor.

I studien skal vi se på sammenhengen mellom innhold og andelen av spesifikke celler og bakterier fra sekret hos pseudodrektige tisper av raser med høy forekomst av mammatumor og pseudodrektige tisper av raser med lav forekomst av mammatumor. Formålet med oppgaven er derfor å finne ut hva pseudodrektig sekret egentlig består av og om det er noen forskjell i sekretinnhold fra de ulike gruppene som skal undersøkes.

Vår oppgave blir en del av et større prosjekt og blir et slags pilotstudie. Vi har begrenset oppgaven vår med antall raser og antall individer. I tillegg har vi lagt begrensninger på hva som skal undersøkes i prøvene, og hvilke prøver vi skal ta. Grunnen til at vi har bestemt oss for disse begrensningene er at dette er et lite undersøkt område hvor det først og fremst er behov for å innhente grunnleggende informasjon. I tillegg har vi en tidsramme å forholde oss til, samt begrensede ressurser.

Plan for gjennomføring

Studien skal gjennomføres iløpet av 2019.

- Skaffe hunder til kontrollgruppe og høyrisikogruppe
- Kjøpe inn nødvendig utstyr/farger
- Opplæring og oppstart laboratoriearbeid
- Prøvetaking og analyse av prøver
- Vurdere analyseresultater
- Sammenlikne resultater mellom kontrollgruppe og høyrisikogruppe, samt evt forskjeller på raser
- Evaluere funn, fargemetoder og eventuelle feilkilder
- Skrive oppgaven ferdig, med en litteraturløst om mammatumor og pseudodrektighet og presentasjon av våre funn i pilotstudien

Samarbeid med andre institusjoner

I forbindelse med studiet samarbeider institutt for sports- og familiedyrmedisin med seksjon for mikrobiologi, immunologi og parasittologi ved NMBU Veterinærhøgskolen.

Dyrkning av prøver	120 prøver vil koste ca 30 000kr
Cytologi	Vi trenger 5 objektglass til hver prøve, både for å utføre selve utstryket og til forskjellige typer farging av preparatet. Anslått ca 5000 kr for farging, montering og objektglass til alle prøver.
Evt urinprøver	Hvis vi har nok ressurser ønsker vi også å ta urinprøver av hundene. Dette har vi anslått at vil koste ca 100kr/prøve totalt i underkant av 2000kr.
Evt immunhistokjemi	Hvis nok ressurser ønsker vi å kjøre immunhistokjemi. Dette koster ca 14000 kr
Andre kostnader	Sannsynligvis må vi reise ut til noen av hundene. Hvis vi må reise ut til 4 av

	hundene, og kjøre 50km hver vei anslår vi dette til å koste ca 1800 kr. (4kr/km).
Sum	52800 kr

Formidling

Målet er at studien skal ende opp i en publikasjon i løpet av 1 år. For eksempel i norsk veterinærtidsskrift. Oppgaven blir også presentert på NMBU Adamstuen i 2019.

Faglige kvalifikasjoner

Marte Holmøy Bratteberg, sisteårs veterinærstudent
Ellen Nordstoga Haldorsen, sisteårs veterinærstudent
Ida Vesterbakk, sisteårs veterinærstudent



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no