

Påverkan av prostaglandin & hCG på dubbelovulation och tvillingdräktighet hos ston

- En retrospektiv studie av journaler förda vid Flyinge vet. klinik

Annelie Hellström

**Handledare: Anne-Marie Dahlin
Inst. för Kliniska Vetenskaper**

**Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet**

**Examensarbete 2005:67
ISSN 1652-8697
Uppsala 2005**

| | |
|---|-----------|
| Innehållsförteckning | |
| SAMMANFATTNING | 3 |
| INLEDNING | 4 |
| Reproduktionsfysiologi..... | 4 |
| Brunstcykeln..... | 5 |
| Follikelvågor | 5 |
| Multipla ovulationer | 5 |
| Hormonmönster under brunstcykeln | 6 |
| Dräktighet | 7 |
| Befruktning | 7 |
| Diagnostik | 7 |
| Tvillingdräktighet..... | 8 |
| Uppkomst och frekvens | 8 |
| Embryoreduktion..... | 8 |
| Induktion av brunst och ovulation..... | 9 |
| Prostaglandin (PGF 2α) | 9 |
| Humant chorionic gonadotropin (hCG)..... | 10 |
| MATERIAL OCH METOD | 11 |
| Undersökningar samt inseminations – och behandlingsrutiner vid Flyinge..... | 12 |
| Undersökningar | 12 |
| Inseminationsrutiner | 12 |
| Behandlingsrutiner..... | 12 |
| Statistiska metoder | 13 |
| RESULTAT | 14 |
| Beskrivning av materialet | 14 |
| Åldersfördelning ston | 14 |
| Reproduktionsstatus..... | 14 |
| Antal brunster fram till dräktighet..... | 15 |
| Fördelning mellan de olika spermatyperna..... | 15 |
| Behandlingsfrekvens ston | 16 |
| Behandlingsfrekvens brunster | 16 |
| Åldersfördelning behandlade brunster..... | 17 |
| Säsongsvariation behandlade brunster..... | 18 |
| Dubbelovulationer | 19 |
| Frekvens dubbelovulationer | 19 |
| Ärftlighet..... | 19 |
| Åldersfördelning..... | 20 |
| Samband reproduktionsstatus/frekvens dubbelovulationer | 20 |
| Säsongsvariation..... | 21 |
| Behandlingsfrekvens brunster | 21 |
| Samband behandling/dubbelovulation..... | 22 |
| Tvillingdräktigheter..... | 23 |
| Frekvens | 23 |
| Samband behandling/tvillingdräktighet..... | 23 |
| Samband spermatyp/tvillingdräktighet | 23 |
| DISKUSSION | 24 |
| Ålder | 24 |
| Reproduktionsstatus..... | 24 |
| Säsongsvariation..... | 25 |
| Prostaglandin F 2α | 25 |

| | |
|--|-----------|
| Humant chorion gonadotropin (hCG)..... | 26 |
| Tvillingfrekvens | 27 |
| Slutsats | 27 |
| Referenser..... | 28 |

SAMMANFATTNING

Tvillingdräktighet anses ha en negativ effekt på reproduktionen hos sto på grund av den höga risken för abort eller vid fullföljd dräktighet, neonatal död. Incidensen av tvillingdräktigheter beror på ett flertal faktorer och varierar mellan olika raser. Till de faktorer som kan påverka risken för tvillingdräktighet hör behandling med prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) och dess analoger, för att korta av lutealfasen och inducera brunst, samt behandling med humant chorion gonadotropin (hCG) som används för att inducera ovulation eller en kombination av dessa båda behandlingar (24). Under de senaste åren har användningen av dessa båda preparat ökat på svenska stuterier.

Denna studie bygger på en sammanställning av journaldata från ston undersökta och inseminerade vid Flyinge under åren 2002 och 2003. Syftet med studien var att undersöka om behandling med prostaglandin och/eller hCG, ökade risken för multipla ovulationer och därmed risken för tvillingdräktighet. De insamlade uppgifterna från journalerna har även använts för att studera andra eventuella faktorer som kan påverka förekomsten av multipla ovulationer, såsom ålder, reproduktionsstatus samt tidpunkt på säsong.

Resultaten i denna studie visade att förutom ålder och reproduktionsstatus, så bidrar induktion av östrus genom administration av PGF_{2α} under lutealfasen, samt induktion av ovulation med hjälp av hCG eller induktion av ovulation med hCG på en PGF_{2α}-inducerad brunst, till en ökad risk för dubbelovulation och därmed tvillingdräktighet.

Detta ger att veterinärer bör vara ytterst noggranna vid den tidiga dräktighetsundersökningen för att tidigt kunna upptäcka tvillingar och vidta lämplig åtgärd för att uppnå bästa möjliga överlevnad av ett foster efter reduktion av den ena fosterblåsan.

INLEDNING

I Sverige introducerades artificiell inseminering på häst i mitten på 70-talet. Ett mindre antal ston inseminerades med färsk sperma på olika stuterier för varmlodiga travare under detta årtionde. Kyld och fryst sperma började användas i Sverige från mitten av 80-talet, och antalet inseminerade ston nådde en topp i slutet på 80-talet. Under 90-talet har andelen inseminerade ston fortsatt att öka samtidigt som totalantalet betäckta ston har minskat. Hos halvbloden har övergången från naturlig betäckning till artificiell insemination varit något fördröjd i förhållande till de varmlodiga travarna. Siffror från 1994 visar att cirka 85% av travarna och 51 % av de svenska halvbloden vid denna tid inseminerades artificiellt (1). Idag insemineras även större andelen av halvbloden, ca 85 %. Det har även inom hästsemin under 90-talet skett en övergång från användning av färsk till kyld sperma. Framför allt ses denna övergång hos halvbloden, medan det till travarna fortfarande till största delen används färsk sperma. Hos halvbloden ökade exempelvis andelen inseminationer med kyld sperma från 3 % år 1990 till 58% år 2002 (24 % färsk sperma 2002). På travarsidan ökade den kylda sperman från 28% 1996 till 36% 2002 (50% färsk sperma 2002). Fryst sperma har endast använts i liten utsträckning, ca 3 % 2002 hos halvbloden, och 7 % hos travarna 2002.

Artificiell insemination med färsk, kyld eller fryst sperma, har en mängd fördelar i jämförelse med naturlig betäckning, förutsatt att det utförs korrekt. Insemination innebär i jämförelse med naturlig betäckning en mindre risk för spridning av veneriska sjukdomar, samt en minskad skaderisk av både stoet och hingsten. Avelsarbetet gynnas då sperma från en och samma hingst med högt avelsvärde kan användas till många fler ston än vad som är fallet vid naturlig betäckning. Med fryst sperma förenklas dessutom användandet av hingstar från andra länder.

Reproduktionsfysiologi

Stoet är säsongsmässigt polyöstral vilket innebär att hon har sin reproduktionsaktiva period under sommarhalvåret, den ovulatoriska perioden. Under våren fungerar en ökad mängd dagsljus, via receptorer i ögats retina, som signal till epifysen att i sin tur, via minskad produktion av melatonin, stimulera stoets hypothalamus att frisätta mer av GnRH. GnRH (gonadotropin-releasing hormone) stimulerar hypofysen att frisätta FSH och LH. FSH (follikelstimulerande hormon) stimulerar utvecklingen av folliklarna och LH (luteiniserande hormon) behövs för folliklarnas slutliga mognad, samt för att en follikel skall kunna ovulera.

Den anöstrala eller även kallad anovulatoriska perioden under den mörka delen av året, följs av en övergångsperiod före den ovulatoriska perioden. Här i Norden börjar de flesta ston att visa brunstsymptom i februari/mars. De tidiga brunsterna är oftast längre än de som kommer senare i april-juni (2) och ovulation sker inte i normal frekvens. Under hösten återkommer en liknande övergångsperiod med follikelaktivitet men utan ovulationer, före stoet åter går in ett inaktivt äggstocksstadium.

Brunstcykeln

Brunstcykelns längd är, under den ovulatoriska perioden, cirka 3 veckor. Längden på östrus, d.v.s. när stoet visar brunstsymptom, är i medel 6.5 dagar, med en normal variation på 3 – 8 dagar (3). Ponnyers brunst varar i regel två dagar längre än den hos stora hästar. Längden på brunsten verkar vara relativt konstant hos ett och samma sto, dock ses säsongsmässig variation. Som exempel har brunsterna visat sig vara längre tidig vår och bli kortare mot sommaren, för att då stabiliseras. Mot hösten blir de succesivt längre igen enligt Ginther (1992). Samma författare har visat att den första ovulatoriska brunsten varar längre om den börjar innan den 15:e april. Detta tyder på att mängden dagsljus påverkar längden hos den första ovulatoriska brunsten mer än det faktum att den är först. Normala längden på diöstrus, lutealfas, är 14,9 dagar med en normalvariation på 14-16 dagar (3).

Follikelvågor

Under brunstcykeln, d.v.s. under den ovulatoriska perioden, växer folliklarna till i vågor och ston kan ha en eller två follikelvågor. I dessa vågor växer flera folliklar till synkront för att i mitten av vågen delas upp i dominanta eller underordnade. Denna uppdelning sker cirka sju dagar före den dominanta follikeln ovulerar eller, om anovulatorisk, innan den dominanta follikeln når maximal storlek (3). Den follikelvåg som utvecklas före och under brunst kallas den primära follikelvågen, och den som kommer tidigt i brunstcykeln kallas den sekundära och uppstår i sen östrus eller tidig diöstrus. Den dominanta follikeln i denna våg kan ovulera ett fertilt ägg trots att stoet är under progesteronpåverkan, vilket anses vara unikt för stoet (3). Stoet visar dock inga brunstsymptom och cervix är hård och sluten. Dessa diöstrusovulationer ger upphov till en gulkropp, som ofta ger förlängd diöstrus. En annan följd av diöstrusovulationer är, om stoet inseminerats eller betäckts med sperma av god kvalitet vid den tidigare brunsten, att dess ägg befruktas och en tvillingdräktighet uppstår.

Multipla ovulationer

När selektionen av en dominant follikel sker i mitten av brunstcykeln, händer det ibland att två folliklar växer vidare och ovulerar, och i sällsynta fall kan fler än två folliklar ovulera (3). Dessa multipla ovulationer kan ske samma dag, synkront, eller med en eller fler dagar emellan, asynkront. Det är ingen skillnad mellan synkrona och asynkrona dubbelovulationer vad gäller risken för tvillingdräktighet (4). Den andra ovulationen kan även äga rum några dagar efter det att stoet har slutat visa brunstsymptom, som en diöstrusovulation. Då krävs att stoet inseminerats med sperma av god kvalitet för att även det senare ägget skall befruktas (se ovan).

Hormonmönster under brunstcykeln

Växande, dominanta folliklar utsöndrar hormonet östrogen vilket ger förändringarna i beteendet hos stoet, samt påverkan på de tubulära könsorganen, uterus, cervix och vagina. Östrogenkoncentrationen i blodet börjar öka 6 till 8 dagar innan ovulation, för att nå en peak 2 dagar innan ovulation och sedan minska (3).

De stigande östrogennivåerna ger en negativ feedback vilket stimulerar frisättning av LH från den främre hypofysloben. Den cirkulerande koncentrationen av LH i blodet är låg mitt i diöstrus, och börjar öka några dagar före östrus för att nå maximum 1 eller 2 dagar efter ovulation och sedan minska över 4 till 6 dagar (3).

Koncentrationen FSH står i motsatt relation till den hos LH, förutom att nivån i blodet av båda gonadotropinerna ökar i några dagar under övergångsperioden som infaller vår och höst.

Efter ovulationen bildas en gulkropp i äggstocken ur resterna av den follikel som just ovulerat. Progesteronkoncentrationen i blodet börjar öka cirka 12 timmar efter ovulation och når höga nivåer dag 5 till 7 in i diöstrus. Om stoet blivit dräktigt står de höga progesteronvärdena kvar efter diöstrus, i annat fall börjar de sjunka dag 13 eller 14 (3 dagar före östrus), då gulkroppen bryts ned av det luteolyserande prostaglandinet som produceras i livmodern. Om luteolys sker så kommer stoet i brunst igen och halten progesteron i blodet sjunker till en mycket låg nivå. Denna plötsliga sänkning av progesteronhalten stimulerar den främre hypofysloben att utsöndra FSH som stimulerar follikeltillväxt och en ny follikelvåg påbörjas (Ginther 1992).

Dräktighet

Befruktning

Ägget är befruktningsdugligt under cirka 8 – 12 timmar efter ovulationen. Överlevnadstiden hos spermerna varierar mellan olika hingstar samt beror på hur sperman hanteras och behandlas efter samling. De färska spermerna överlever i stoets livmoder i cirka 48 timmar eller mer. Kyld och fryst sperma har kortare överlevnadstid än den färska. Fryst sperma skall exempelvis insemineras så nära ovulation som möjligt (+/- 6 h).

I Sverige har man bestämt att inseminationsdosen skall innehålla 500 miljoner progressivt motila spermatozoer, i det fall sperman används färsk, dvs insemineras inom ett par timmar efter samling. Om sperman kyls och transporteras till ett annat stuteri inom Sverige, så skall den innehålla 1000 miljoner motila spermatozoer. Vid ideala förhållanden skall det räcka med 100 miljoner motila spermatozoer utan att det påverkar chansen för stoet att bli dräktigt.

Befruktning sker i äggladaren. Det befruktade ägget utvecklas i äggladaren till ett embryo som anländer till livmodern sex till sju dagar efter ägglossningen. I början är embryot väldigt rörligt och åker runt i hela livmodern, mellan de båda hornen och i corpusdelen. Detta pågår fram till ca dag 15 då en fixering sker genom en samverkan mellan ökad tonus i livmodern, en förtjockning av endometriet samt en snabb tillväxt av embryot. Fixeringen sker oftast i den kaudala delen av ett av hornen, nära bifurkationen.

Diagnostik

Förr användes framförallt rektalpalpation av livmodern för att fastställa en dräktighet. Idag används ultraljudet flitigt inom dräktighetsdiagnostiken. Ultraljudets viktigaste funktion är att på ett tidigt stadium fastställa dräktighet och hjälpa till vid den tidiga bedömningen av om det rör sig om en tvillingdräktighet eller inte. Det är större risk att missa en dräktighet om ultraljudsundersökningen utförs innan embryot är fixerat men å andra sidan lättare att åtgärda en tvillingdräktighet. Tvillingdräktighet hos ston är negativt på grund av den höga risken för abort eller neonatal död vid fullföljd dräktighet.

Tvillingdräktighet

Uppkomst och frekvens

Uppkomsten av tvillingar beror på flera faktorer och frekvensen tvillingdräktigheter har rapporterats variera mellan närmare 0 till 16 % (5). Det är allmänt känt att hästens tvillingar är, i princip utan undantag, ett resultat av multipla ovulationer (3). Endast ett par hästtvillingar har dokumenterats komma från en ensam ovulation och polyovulära folliklar har aldrig beskrivits hos häst (6).

Kontrollerade ultraljudsstudier har visat att ägg från multipla ovulationer är lika fertila som ägg från ensamma ovulationer (7). Därför löper ston med multipla ovulationer en stor risk att få fler än ett ägg befruktat och därmed en stor risk för tvillingdräktighet (8). Här spelar dock hingstens spermakvalitet in då vissa hingstar ger fler tvillingdräktigheter. En studie av Klemetsdal och Johnson, 1989 (9) visade att hingsten är en viktig källa till variationen i fölfrekvensen.

Ras har visat sig vara en faktor som påverkar antalet multipla ovulationer och de är mycket vanligare hos stora hästar än hos ponnyer (3). Fullblodsston och en viss typ av kallblodsston har högst andel multipla ovulationer, medan quarterston och arabston har en intermediär incidens. Hos fullblodsston har andelen tvillingdräktigheter rapporterats variera mellan 4 och 13 % (3,6,10,11).

Det har rapporterats att äldre ston visat sig löpa en större risk för tvillingar jämfört med yngre ston (10,13), men effekten av ålder vad gäller multipla ovulationer behöver studeras ytterligare. Ginther (1992) har dessutom visat på en kraftig tendens till upprepning av multipla ovulationer hos vissa individer och inom vissa familjelinjer vilket pekar på en genetisk predisposition (14).

Studier är även gjorda på huruvida stoets reproduktionsstatus påverkar andelen multipla ovulationer. Ginter (1992) rapporterade färre tvillingar hos lakterande ston (8,8 %) jämfört med maiden ston (15,3 %) eller gallston (14 %). Även Perkins och Grimmet visade i en studie (11) att lakterande ston uppvisade påtagligt färre multipla ovulationer jämfört med icke lakterande ston.

Embryoreduktion

Om veterinären på den tidiga dräktighetsundersökningen upptäcker en tvillingdräktighet finns det olika behandlingsalternativ. I en stor del av fallen resorberas den ena fosterblåsan naturligt. Om det ej skett en naturlig resorption kan veterinären klämma sönder den ena fosterblåsan via rektum, genom att pressa den mot bäckenkanten med proben eller krossa den mellan fingrarna. Detta görs helst innan dag 26 i dräktigheten och allra senast dag 30. Vid manipulationen frisätts prostaglandin från livmodern och enligt en studie (15) ökar denna mängd om reduceringen sker efter fixering. Samma studie kom fram till att, trots att frisättningen av prostaglandin vid varsam manuell reduktion av den ena fosterblåsan inte kan undvikas, så blir inte frisättningen så hög att total eller ens partiell luteolys sker. De visade att ruptur av en fixerad eller mobil fosterblåsa, mellan dag 12 och 30 i dräktigheten, är en effektiv teknik för att reducera en tvillingdräktighet. I studien undersöktes även om exogent tillfört progesteron och prostaglandinhämmare (flunixin meglumine) kunde vara till hjälp för att öka

chansen till överlevnad för den kvarvarande fosterblåsan. Det visade sig att flunixin meglumine påtagligt reducerade prostaglandinnivåerna, men att det inte behövdes för att undvika luteolys. Om manipulationen varit extra påfrestande vid något tillfälle, kan dock hämmare av prostaglandin öka chanserna till överlevnad för den fosterblåsa som är kvar.

Att krossa fosterblåsan tidigt kan vara en fördel för att undvika att de vid fixeringen hamnar tätt intill varandra i samma horn, vilket försvårar eller i värsta fall omöjliggör en reduktion av enbart det ena fostret. Nackdelen med att klämma fosterblåsan tidigt är att den kan vara för liten och glida undan trycket. Det krävs skicklighet hos veterinären för att upptäcka och reducera dessa tidiga tvillingdräktigheter.

I det fall ingen naturlig resorption skett och manuell reduktion misslyckats, t.ex. då fosterblåsorna legat för tätt intill varandra, återstår för att avbryta tvillingdräktigheten, abort av båda fosterblåsorna med hjälp av prostaglandin. Denna injektion (1 x 10mg) måste ges innan dag 35 för att stoet skall komma i brunst inom lämplig tid för ombetäckning. Ges behandlingen senare än dag 35 kommer stoet brunst tidigast efter 2 - 3 månader.

Induktion av brunst och ovulation

Prostaglandin (PGF_{2α})

Den stora variationen i brunstens längd samt svårigheten att förutsäga tidpunkt för ovulation har lett till metoder för att påverka brunstcykelns längd samt för att påskynda ovulationen, dvs för att effektivisera avelsarbetet. Den vanligaste metoden för att kontrollera brunstcykelns längd är användandet av luteolytiska ämnen som kortar av lutealfasen. Administration av prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) eller dess analoger i gulkroppsfasen är effektivt för att inducera brunst inom 2-7 dagar efter en ensam injektion så tillvida att stoet inte har en refraktär gulkropp (yngre än 5 dagar).

Vilken tid ett sto kommer i brunst efter PG behandling är beroende av storleken på folliklarna i äggstockarna vid behandlingstillfället (4). Ett sto som vid behandlingstillfället har en follikel > 40mm uppvisar en stor variation av tiden fram till ovulation. Cirka 2/3 av dem ovulerar omkring 5 dagar efter behandling, medan det hos den sista tredjedelen sker en regression av den stora follikeln, varpå den ersätts av en liten som ovulerar omkring 9 dagar efter behandling. I undantagsfall ovulerar en stor follikel inom 1-3 dagar, utan att stoet visar brunst, eller visar brunstsymptom endast under en kort period. Ston som har en follikel < 35mm verkar ha ett stabilare intervall fram till ovulation, vilken sker omkring 7 dagar efter behandling.

Jöchle et al. (17) rapporterade att en injektion med en PGF_{2α} analog, inom några få minuter resulterade i en kraftig höjning av LH och FSH i blodet. Den selektion av en dominant follikel som sker hos stoet cirka sju dagar innan ovulation, är enligt Ginther et.al. (18) beroende av låga koncentrationer FSH. Detta innebär i så fall att PGF_{2α}, förutom att inducera brunst, stör den kontroll som FSH har över follikelvågorna och därmed eventuellt kan orsaka tillväxt av mer än en dominant follikel, vilket i sin tur kan leda till multipla ovulationer.

Humant chorionic gonadotropin (hCG)

Human chorionic gonadotropin (hCG) är ett glykoprotein som används för att inducera ovulation. Administration av hCG hos ston med en preovulatorisk, växande follikel på minst 35 mm i diameter inducerar ovulation inom 48 timmar i ca. 80 % av fallen (19).

Upprepade behandlingar med hCG har visat sig stimulera bildandet av antikroppar riktade mot glykoproteinet, vilket minskar dess effekt. Det finns en studie där man försökt fastställa effekten hos preparatet att bilda immunitet (20). För att försöka minska det immunologiska svaret gav man dexametason samtidigt med hCG-givan, vilket inte påverkade resultatet. Man prövade även alternativ till hCG såsom GnRH, LH från svin samt naturligt gonadotropin (framställt från slaktmaterial) för att inducera ovulation. Studien visade att naturligt gonadotropin utgjorde ett bra alternativ till hCG för att inducera ovulation hos sto.

I en annan studie undersökte man förmågan hos hCG jämfört med GnRH att framkalla ovulation hos fullblodsston (21). Resultaten i denna studie visade att efter naturlig betäckning var dräktighetsprocenten hos de ston som behandlats med hCG 74 % medan de som behandlats med GnRH endast uppnådde 50 %. Dock visade sig båda dessa grupper ha ett bättre dräktighetsresultat än de obehandlade ston som ingick i kontrollgruppen, av vilka 45 % blev dräktiga.

En annan studie redovisade andra resultat (22). Man testade här effekten hos en GnRH-analog (Buserelin) att inducera ovulation hos brunstiga ponnyston. Man jämförde även här preparatet med hCG. Detta experiment visade att Buserelin var lika effektiv som hCG när det gällde att inducera ovulation inom 24-48 timmar efter administration. Skillnaden mellan de båda preparaten, vilket kan ha betydelse i praktiken, är att Buserelin gavs vid fyra tillfällen medan hCG bara gavs vid ett tillfälle.

Ytterligare ett alternativ till hCG är deslorelin acetat. I en studie jämfördes hCG (Chorulon, Intervet Inc) och deslorelin acetat (Ovuplant, Pharmacia Upjohn Co.) med avseende på tid från behandling fram till ovulation (23). Resultaten visade att ovulationsfrekvensen vid hCG-behandling inom 48 timmar var 83,3 %, inom 72 timmar 91,6 % och inom 96 timmar 100 %. Alla ston som behandlats med deslorelin acetat hade ovulerat inom 48 timmar. Tidpunkten för ovulation kunde därför med större säkerhet fastställas efter behandling med deslorelin acetat jämfört med hCG. Det finns dock negativa effekter av deslorin acetat rapporterade. Johnson et al 2002 (24), visade att hos ston som behandlats med deslorin acetat förlängdes brunstcykeln jämfört med kontrollston. Samma studie visade att vissa ston kom in i ett inaktivt äggstocksstadium efter behandling.

MATERIAL OCH METOD

Underlaget till denna studie bestod av journaler förda vid Flyinge veterinärklinik under åren 2002 och 2003 över ston som undersökts gynekologiskt och inseminerats. Totalt fanns journaler på 382 ston år 2002, samt 351 ston år 2003. Från stournalerna insamlades följande uppgifter:

- Identitet
- Ålder
- Ras
- Föl vid sidan eller inte
- Hingst
- Brunst eller inte, samt vilken i ordningen
- Behandling
 - PG
 - hCG
 - PG och hCG
- Ovulation
 - utebliven ovulation
 - singelovulation
 - dubbelovulation
- Dräktighet
 - dräktig
 - icke dräktig
 - tvillingdräktighet
- Spermahantering
 - färsk (AI)
 - kyld (TAI)
 - fryst (FAI)
 - naturlig betäckning

Alla journaler från dessa år genomlästes och uppgifter på ston som behandlats med prostaglandin och/eller hCG togs fram. Dessutom togs uppgifter på alla ston som ovulerade mer än en follikel. Kontrollston utvaldes slumpmässigt. Dock ingår alla ston med dubbelovulationer.

I journalerna saknades ofta uppgift om ras men merparten var svenskt halvblod, inga travare förekom men enstaka fullblod finns i gruppen som trots det kallas "halvblod". Språngrullan från 2002 och 2003 för fullblodshingsten Be My Chief, med enbart naturlig betäckning av fullblodsston, är med separat, för att kunna jämföras med halvbloden.

Från år 2002 ingår i studien journaluppgifter från 211 halvblodsston samt 42 fullblodsston, och från år 2003 uppgifter från 213 halvblodsston samt 24 fullblodsston. Totalt är 490 ston med i studien, 335 behandlade ston (behandlade i en eller flera brunster) samt 155 kontrollston (ej behandlade i någon brunst).

Undersökningar samt inseminations – och behandlingsrutiner vid Flyinge

Undersökningar

Djurägaren kunde antingen lämna sitt sto på plats eller komma dit polikliniskt med stoet för gynekologisk undersökning och/eller insemination. Djurägaren kom till kliniken när stoet visade tecken på brunst, eller när beräknad brunst borde inträffa. Veterinären undersökte stoet rektalt och med hjälp av ultraljud för att bedöma brunstcykelstadium. Mjukheten hos äggstocksfolliklarna samt livmoderns tonus och tjocklek på slemhinnan bedömdes med hjälp av palpation. Ultraljud användes för att bedöma follikelstorlek, förekomst av gulkropp samt grad av ödem i livmodern. Alla undersökningsfynd antecknades i stournalen.

Ultraljudet användes också vid dräktighetsundersökning. Den första dräktighetsundersökningen utfördes som regel mellan dag 14 och 20 efter ovulationen. Om veterinären upptäckte att stoet dubbelovulerat, återkallades hon för dräktighetsundersökning redan dag 14. Detta för att i god tid ha möjlighet att manuellt krossa den minsta fosterblåsan vid en eventuell tvillingdräktighet. Om det på dag 14 inte gick att krossa fosterblåsan p.g.a. att den var för liten, fick stoet återkomma nästa dag tills reduceringen lyckades. Viktigt var, enligt den veterinär som arbetade år 2003, att inte vänta till efter fixeringen (dag 17), då fosterblåsorna i de flesta fallen fixerats tätt intill varandra i samma horn, vilket markant försvårar reduceringen. Om det inte gick att klämma någon av fosterblåsorna t.ex. då de låg för tätt intill varandra redan tidigt och ej gick att separera, samt om ingen av dem resorberats naturligt, så sprutades båda bort med prostaglandin.

För de ston som var inackorderade på Flyinge, sköttes brunstkontrollen med hjälp av en pensionerad travarhingst. Brunstsymptomen hos varje sto, eller avsaknaden av dem, journalfördes noggrant.

Inseminationsrutiner

Flyinge har cirka tjugo egna hingstar i avel, det varierar dock från år till år, varav en av dem är en fullblodshingst som betäcker naturligt. Sperma samlas på hingstarna varannan dag under högsäsong i Flyinges EU-godkända betäckningshall. Sperman kontrolleras och doser räknas ut av personalen på kliniken. Den frysta sperman förvaras i flytande kväve inne på kliniken.

Om stoet var i brunst vid undersökningstillfället med mogna folliklar så inseminerades hon. Här skiljde sig rutinerna åt beroende på om sperman var färsk, kyld eller fryst. Om fryst sperma användes så undersöktes stoet var sjätte timme efter det att veterinären funnit mogna folliklar.

Behandlingsrutiner

Eftersom det var olika veterinärer som arbetade på Flyinge år 2002 och 2003, så skiljer sig behandlingsrutinerna åt. Det var samma preparat och doser som användes de båda åren, Prosolvin (prostaglandin) 2ml, samt Pregnyl (hCG) 3000 IE. Den veterinär som var verksam år 2002 använde enligt egen uppgift hCG framför allt till de långa brunsterna. Strategin skilde sig från den som tillämpades under 2003. Den veterinär som arbetade detta år använde enligt egen uppgift hCG

endast på riktigt bra och tydliga brunster. Enligt dennes erfarenhet var det ofta för sent att behandla en lång brunst.

Statistiska metoder

Frekvenstabeller har räknats ut manuellt samt i Excel där materialet förts in i tabeller. För att kunna ta hänsyn till flera faktorer som kan påverka resultatet användes logistisk regression som beräknades med hjälp av statistikprogrammet SAS. Vid dessa beräkningar inkluderades följande parametrar:

- ålder
- säsong
- reproduktionsstatus
- PG-behandling
- hCG-behandling
- PG- och hCG-behandling
- AI (färsk), TAI (kyld) eller FAI (fryst)

Signifikansen är om inget annat anges $P < 0,05$.

RESULTAT

Beskrivning av materialet

Åldersfördelning ston

Tabell 1 visar åldersfördelningen hos stona i studien. Bland halvbloden var nära dubbelt så många ston äldre än 15 år 2003 jämfört med 2002. Antalet ston yngre än 6 år var nästan identiskt hos halvbloden de båda åren, men här syntes en skillnad hos fullbloden där detta antal var större 2003 jämfört med 2002. En jämförelse mellan halvblod och fullblod visar att fullbloden har fler unga ston (0 – 10 år) samt färre gamla ston (>15 år) än halvbloden.

Tabell 1. Åldersfördelning hos de ston som ingick i studien..

| Ålder | Halvblod 2002 | | Halvblod 2003 | | Fullblod 2002 | | Fullblod 2003 | |
|--------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % |
| <6 år | 28 | 13,3 | 28 | 13,1 | 6 | 14,3 | 5 | 20,8 |
| 6-10 år | 56 | 26,5 | 40 | 18,8 | 16 | 38,1 | 10 | 41,7 |
| 11-15 år | 70 | 33,2 | 47 | 22,1 | 13 | 30,9 | 7 | 29,2 |
| >15 år | 57 | 27,0 | 98 | 46,0 | 7 | 16,7 | 2 | 8,3 |
| Summa | 211 | 100 | 213 | 100 | 42 | 100 | 24 | 100 |

Reproduktionsstatus

Tabell 2 visar hur materialet är fördelat mellan ston med eller utan föl vid sidan. Halvblodens fördelning mellan de två grupperna skiljer sig inte så mycket de båda åren. Det var något fler ston utan föl bland halvbloden 2003 (74,3%) jämfört med 2002 (65,4%). Hos fullbloden hade hälften av stona i studien ett föl vid sidan, alltså mycket större andel än hos halvbloden.

Tabell 2. Antal ston med eller utan föl vid sidan.

| Reproduktionsstatus | Halvblod 2002 | | Halvblod 2003 | | Fullblod 2002 | | Fullblod 2003 | |
|----------------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|---------------|------------|
| | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % |
| lakterande | 73 | 34,6 | 55 | 25,7 | 21 | 50,0 | 14 | 58,3 |
| ej lakterande | 138 | 65,4 | 158 | 74,3 | 21 | 50,0 | 10 | 41,7 |
| Summa | 211 | 100 | 213 | 100 | 42 | 100 | 24 | 100 |

Antal brunster fram till dräktighet

Tabell 3 visar hur många brunster det tog innan stoet blev dräktigt alternativt behandlingen avbröts. Här syns en skillnad hos halvbloden mellan de båda åren. Det tog oftare fler brunster att få stoet dräktigt, alternativt försökte man i fler brunster, 2002 jämfört med 2003.

Tabell 3 visar fördelningen mellan hur många brunster det tog innan stoet blev dräktigt alternativt behandlingen avbröts.

| Antal brunster | Halvblod 2002 | | Halvblod 2003 | | Fullblod 2002 | | Fullblod 2003 | |
|-----------------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|
| | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % | n=sto | andel % |
| 1 | 119 | 56,4 | 152 | 71,4 | 26 | 61,9 | 18 | 75,0 |
| 2 | 58 | 27,5 | 43 | 20,2 | 14 | 33,3 | 3 | 12,5 |
| 3 | 26 | 12,3 | 15 | 7,0 | 2 | 4,8 | 2 | 8,3 |
| >3 | 8 | 3,8 | 3 | 1,4 | 0 | 0,0 | 1 | 4,2 |
| Summa | 211 | 100 | 213 | 100 | 42 | 100 | 24 | 100 |

Fördelning mellan de olika spermatyperna

Tabell 4 a och b visar fördelningen av de olika spermatyperna inom grupperna, (behandlade ston samt kontrollston medräknade) Analysen baserar sig på antal ston. Är det vanligare med någon behandling vid insemination med färsk, kyld respektive fryst sperma? Fullbloden är inte med då de endast betäckts naturligt.

Tabell 4a. Fördelning av de olika spermatyperna inom grupperna .

| Grupp | 2002 | | | | | |
|---------------------|-------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|
| | AI | andel % | TAI | andel % | FAI | andel % |
| Obehandlade | 49 | 31,2 | 12 | 40,0 | 1 | 4,2 |
| PG | 47 | 29,9 | 8 | 26,7 | 1 | 4,2 |
| hCG | 33 | 21,0 | 7 | 23,3 | 16 | 66,7 |
| PG & hCG | 28 | 17,8 | 3 | 10,0 | 6 | 25,0 |
| Summa | 157 | 100 | 30 | 100 | 24 | 100 |

Tabell 4b. Fördelning av de olika spermatyperna inom grupperna.

| Grupp | 2003 | | | | | |
|---------------------|-------------|----------------|------------|----------------|------------|----------------|
| | AI | andel % | TAI | andel % | FAI | andel % |
| Obehandlade | 55 | 34,4 | 10 | 33,3 | 4 | 17,4 |
| PG | 96 | 60,0 | 13 | 43,3 | 0 | 0 |
| hCG | 4 | 2,5 | 1 | 3,3 | 8 | 34,8 |
| PG & hCG | 5 | 3,1 | 6 | 20,0 | 11 | 47,8 |
| Summa | 160 | 100 | 30 | 100 | 23 | 100 |

Behandlingsfrekvens ston

Tabell 5 visar hur många av det totala antalet undersökta ston på Flyinge 2002 och 2003 som var obehandlade eller hade behandlats med PG, hCG eller PG & hCG. Ett sto räknades som behandlad då hon behandlats i en brunst eller fler. Antalet behandlade ston skiljer sig inte nämnvärt mellan åren, däremot fördelningen mellan de olika behandlingarna. Antalet ston som fått PG var nästan dubbelt så många år 2003 jämfört med år 2002. Tvärtom förhöll det sig med hCG samt PG & hCG som användes mer än tre gånger respektive närmare två gånger så ofta år 2002 jämfört med år 2003.

Tabell 5. Ston som behandlats med PG, hCG eller PG & hCG.

| Grupp | 2002 | | 2003 | |
|---------------------|------------|------------|------------|------------|
| | n=sto | andel % | n=sto | andel % |
| Obehandlade | 207 | 54,2 | 191 | 54,4 |
| PG | 66 | 17,3 | 116 | 33,0 |
| hCG | 64 | 16,8 | 18 | 5,1 |
| PG & hCG | 45 | 11,8 | 26 | 7,4 |
| Summa | 382 | 100 | 351 | 100 |

Behandlingsfrekvens brunster

Tabell 6 visar antalet behandlade brunster samt behandlingsfrekvensen för de olika behandlingsgrupperna.

Tabell 6. Brunster som behandlats med PG, hCG eller PG & hCG.

| Grupp | Halvblod 2002 | | Halvblod 2003 | | Fullblod 2002 & 2003 | |
|---------------------|---------------|------------|---------------|------------|----------------------|------------|
| | n=brunst | andel % | n=brunst | andel % | n=brunst | andel % |
| PG | 69 | 36,7 | 133 | 76,4 | 26 | 47,3 |
| hCG | 86 | 45,7 | 26 | 14,9 | 22 | 40,0 |
| PG & hCG | 33 | 17,6 | 15 | 8,6 | 7 | 12,7 |
| Summa | 188 | 100 | 174 | 100 | 55 | 100 |

Antalet behandlade brunster hos halvbloden var något fler år 2002 (n=188) jämfört med år 2003 (n=174). Fördelningen mellan de olika behandlingsgrupperna skiljer sig kraftigt åt mellan de båda åren. Brunsternas behandlingsmönster följer stonas. Det var alltså mer än dubbelt så många PG-behandlade brunster år 2003 jämfört med år 2002. Tvärtom förhöll det sig med hCG samt PG & hCG som användes i mer än tre gånger respektive mer än två gånger så många brunster år 2002 jämfört med år 2003. Hos fullbloden utgjordes den största gruppen av PG-behandlade brunster följt av hCG-behandlade och den minsta gruppen PG & hCG.

Åldersfördelning behandlade brunster

Vid vissa frågeställningar kan det vara av värde att undersöka brunsterna var för sig. I nedanstående tabeller har varje brunst räknats separat, vilket innebär att ett och samma sto kan vara med i flera olika grupper om hon återkommer i mer än en brunstperiod.

Åldersfördelningen av alla brunster hos de ston som är med i denna studie, åskådliggörs i tabell 7 a -c. Är det vanligare att behandla med prostaglandin, hCG eller en kombination av dem i någon viss åldersgrupp?

Tabell 7a. Åldersfördelning inom behandlingsgrupperna (n=brunst).

| Ålder | Halvblod 2002 | | | | | | | | |
|--------------|---------------|------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| < 6 år | 47 | 21 | 44,7 | 8 | 17,0 | 13 | 27,7 | 5 | 10,6 |
| 6-10 år | 85 | 35 | 41,2 | 20 | 23,5 | 23 | 27,1 | 7 | 8,2 |
| 11-15 år | 101 | 50 | 49,5 | 22 | 21,8 | 20 | 19,8 | 9 | 8,9 |
| > 15 år | 121 | 60 | 49,6 | 19 | 15,7 | 30 | 24,8 | 12 | 9,9 |
| Summa | 354 | 166 | | 69 | | 86 | | 33 | |

Tabell 7b. Åldersfördelning inom behandlingsgrupperna (n=brunst).

| Ålder | Halvblod 2003 | | | | | | | | |
|--------------|---------------|------------|---------|------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| < 6 år | 58 | 26 | 44,8 | 21 | 36,2 | 6 | 10,3 | 5 | 8,6 |
| 6-10 år | 80 | 37 | 46,3 | 34 | 42,5 | 6 | 7,5 | 3 | 3,8 |
| 11-15 år | 95 | 40 | 42,1 | 48 | 50,5 | 5 | 5,3 | 2 | 2,1 |
| > 15 år | 71 | 29 | 40,8 | 30 | 42,3 | 7 | 9,9 | 5 | 7,0 |
| Summa | 304 | 132 | | 133 | | 24 | | 15 | |

Tabell 7c. Åldersfördelning inom behandlingsgrupperna (n=brunst)

| Ålder | Fullblod 2002 & 2003 | | | | | | | | |
|--------------|----------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| < 6 år | 13 | 5 | 38,5 | 4 | 30,8 | 4 | 30,8 | 0 | 0 |
| 6-10 år | 44 | 22 | 50,0 | 11 | 25,0 | 9 | 20,5 | 2 | 4,5 |
| 11-15 år | 31 | 11 | 35,5 | 8 | 25,8 | 7 | 22,6 | 5 | 16,1 |
| > 15 år | 13 | 8 | 61,5 | 3 | 23,1 | 2 | 15,4 | 0 | 0 |
| Summa | 101 | 46 | | 26 | | 22 | | 7 | |

Enligt statistiska beräkningar i form av logistisk regression, fanns det inget signifikant samband mellan ålder och hormonbehandling (P = 0,1806). Fullblodsgruppen var för liten för att bedöma statistiskt i detta avseendet.

Säsongsvariation behandlade brunster

I tabell 8a-c visas en eventuell variation i behandlingsfrekvens beroende av tidpunkt på säsong. Är det vanligare att behandla med något hormon i en viss del av säsongen?

Tabell 8a. Säsongsmässig spridning av behandlingar (n=brunst).

| Månad | Halvblod 2002 | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| mars/april | 36 | 18 | 50,0 | 3 | 8,3 | 12 | 33,3 | 3 | 8,3 |
| maj | 113 | 47 | 41,6 | 25 | 22,1 | 33 | 29,2 | 8 | 7,1 |
| juni | 103 | 54 | 52,4 | 18 | 17,5 | 26 | 25,2 | 5 | 4,9 |
| juli/aug | 102 | 47 | 46,1 | 23 | 22,5 | 15 | 14,7 | 17 | 16,7 |
| Summa | 354 | 166 | | 69 | | 86 | | 33 | |

Tabell 8b. Säsongsmässig spridning av behandlingar (n=brunst).

| Månad | Halvblod 2003 | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|------------|---------|------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| mars/april | 42 | 23 | 54,8 | 12 | 28,6 | 5 | 11,9 | 2 | 4,8 |
| maj | 93 | 38 | 40,9 | 44 | 47,3 | 6 | 6,5 | 5 | 5,4 |
| juni | 98 | 42 | 42,9 | 45 | 45,9 | 6 | 6,1 | 5 | 5,1 |
| juli/aug | 71 | 29 | 40,8 | 32 | 45,1 | 7 | 9,9 | 3 | 4,2 |
| Summa | 304 | 132 | | 133 | | 24 | | 15 | |

Tabell 8c. Säsongsmässig spridning av behandlingar (n=brunst)

| Månad | Fullblod 2002 & 2003 | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|---------|
| | Totalt | Obeh. | andel % | PG | andel % | hCG | andel % | PG & hCG | andel % |
| mars/april | 41 | 13 | 31,7 | 10 | 24,4 | 15 | 36,6 | 3 | 7,3 |
| maj | 47 | 24 | 51,1 | 15 | 31,9 | 5 | 10,6 | 3 | 6,4 |
| juni | 14 | 9 | 64,3 | 2 | 14,3 | 2 | 14,3 | 1 | 7,1 |
| juli/aug | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Summa | 101 | 45 | | 26 | | 22 | | 7 | |

Statistiskt ses en skillnad i behandling mellan månaderna år 2002 ($P < 0,02$) samt tendens till skillnad hos fullbloden ($P < 0,07$). Ingen statistiskt signifikant skillnad ses mellan månaderna år 2003.

Dubbelovulationer

Frekvens dubbelovulationer

Hos halvbloden observerades dubbelovulation i 14,4 % av brunsterna som ingick i studien år 2002 och 21,4 % år 2003. Hos fullbloden sågs dubbelovulation i 15,8 % av brunsterna.

Det förekom alltså många fler dubbelovulationer hos halvbloden år 2003 jämfört med år 2002. Eftersom alla brunster med dubbelovulationer från år 2002 och 2003 är medräknade, men inte alla ston (253 ston av totalt 382 år 2002, samt 237 ston av totalt 351 år 2003) är med i studien, så är frekvensen sannolikt något högre än om alla ston hade varit med.

Tabell 9. Frekvens dubbelovulationer räknat per brunst.

| | n = brunst | 2 | andel % |
|---------------------------------|-------------------|----------|----------------|
| Halvblod 2002 | 354 | 51 | 14,4 |
| Halvblod 2003 | 304 | 65 | 21,4 |
| Fullblod 2002 & 2003 | 101 | 16 | 15,8 |

Ärftlighet

Eftersom fenomenet dubbelovulationer anses vara genetiskt betingat (3) är det av intresse att veta om ett och samma sto bidrog till flera.

År 2002 var det två av de dubbelovulerande halvbloden som hade mer än en dubbelovulation. Sto A 12 år, ovulerade två ägg båda de brunster som hon undersöktes på Flyinge. Sto B 15 år, ovulerade två ägg i två av de tre brunster som hon undersöktes på Flyinge.

År 2003 var det ett sto C som dubbelovulerade mer än en gång. Hon var 9 år och ovulerade 2 ägg båda de brunster som hon undersöktes på Flyinge. Detta år var det även ett sto som ovulerade tre ägg i en prostaglandin inducerad brunst.

Hos fullbloden var det ett 15-årigt sto D som dubbelovulerade mer än en gång. Hon ovulerade två ägg i tre av de fyra brunster som hon undersöktes på Flyinge.

Åldersfördelning

I följande tabeller (10 t.o.m. 12) är alla dubbelovulationer med oavsett behandling som förekommit på Flyinge under åren 2002 och 2003. Tabell 11 visar hur dubbelovulationerna är fördelade på de olika åldrarna. Finns det något samband?

Tabell 10. Åldersfördelning (n=dubbelovulation) räknat per brunst. Kontrollstons brunster är inkluderade.

| Ålder | Halvblod 2002 | | | Halvblod 2003 | | | Fullblod 2002 & 2003 | | |
|--------------|---------------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|-------------------------|-----------|---------|
| | totalt | <u>2</u> | andel % | totalt | <u>2</u> | andel % | totalt | <u>2</u> | andel % |
| < 6 år | 47 | 4 | 8,5 | 58 | 8 | 13,8 | 13 | 0 | 0 |
| 6-10 år | 85 | 14 | 16,5 | 80 | 19 | 23,8 | 44 | 6 | 13,6 |
| 11-15 år | 101 | 24 | 23,8 | 95 | 26 | 27,4 | 31 | 7 | 22,6 |
| > 15 år | 121 | 9 | 7,4 | 71 | 12 | 16,9 | 13 | 3 | 23,1 |
| Summa | 354 | 51 | | 304 | 65 | | 101 | 16 | |

De statistiska beräkningarna visade på ett signifikant samband mellan ålder och frekvens dubbelovulationer. Denna studie visar att det är större risk för dubbelovulationer hos ston vid en ålder av 11 år och uppåt (P = 0,0001; OR = 2,460).

Samband reproduktionsstatus/frekvens dubbelovulationer

Tabell 11 redovisar antalet dubbelovulationer hos de lakterande respektive icke lakterande ston som ingår i studien.

Tabell 11. Samband reproduktionsstatus/frekvens dubbelovulationer (n=dubbelovulation). Kontrollstons brunster är inkluderade.

| Reproduktionsstatus | Halvblod 2002 | | | Halvblod 2003 | | | Fullblod 2002 & 2003 | | |
|---------------------|---------------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|-------------------------|-----------|---------|
| | totalt | <u>2</u> | andel % | totalt | <u>2</u> | andel % | totalt | <u>2</u> | andel % |
| Lakterande | 116 | 13 | 11,2 | 74 | 12 | 16,2 | 47 | 5 | 10,6 |
| ej lakterande | 238 | 38 | 16,0 | 230 | 53 | 23,0 | 54 | 11 | 20,4 |
| Summa | 354 | 51 | | 304 | 65 | | 101 | 16 | |

De statistiska beräkningarna visade att det fanns ett signifikant samband mellan laktationsstatus och förekomst av dubbelovulationer (P = 0,0360; OR = 1,610). Det var vanligare med dubbelovulationer hos de ston som ej var lakterande.

Säsongsvariation

Tabell 12 visar hur dubbelovulationerna (2) är fördelade över säsongen de båda åren.

Tabell 12. Säsongsvariation för dubbelovulationer (n=dubbelovulation). Kontrollstons brunster är inkluderade

| Månad | Halvblod 2002 | | | Halvblod 2003 | | | Fullblod 2002 & 2003 | | |
|-------------------|---------------|-----------|------|---------------|-----------|------|-------------------------|-----------|------|
| | Total t | andel % | | totalt | andel % | | totalt | andel % | |
| mars/april | 36 | 6 | 16,7 | 42 | 6 | 14,3 | 41 | 9 | 22,0 |
| maj | 113 | 15 | 13,3 | 93 | 20 | 21,5 | 47 | 6 | 12,8 |
| juni | 103 | 12 | 11,7 | 98 | 24 | 24,5 | 14 | 1 | 7,1 |
| juli/aug | 102 | 18 | 17,6 | 71 | 15 | 21,1 | 0 | 0 | 0 |
| Summa | 354 | 51 | | 304 | 65 | | 101 | 16 | |

Enligt de statistiska beräkningarna fanns det inget signifikant samband mellan säsong och frekvens dubbelovulationer. År 2002 var signifikansen $P = 0,1618$ och år 2003 var den $P = 0,7370$.

Behandlingsfrekvens brunster

För att få ett korrekt statistiskt underlag för att undersöka hormonbehandlingarnas inverkan på antalet dubbelovulationer, så sorterades kontrollston bort i denna analys. Istället räknades varje brunst separat hos de ston som fått hormonbehandling i minst en brunst, 175 ston 2002 och 160 ston 2003. Dessa ston fick fungera som sina egna kontroller med de brunster som de ej behandlats i. Fördelningen av brunsterna mellan de olika behandlingsgrupperna ses i tabell 13.

Tabell 13. Fördelning av brunster mellan de olika grupperna. Kontrollston är exkluderade.

| Grupp | Halvblod 2002 | | Halvblod 2003 | | Fullblod 2002 & 2003 | |
|---------------------|------------------|------------|------------------|------------|-------------------------|------------|
| | n=brunst | andel % | n=brunst | andel % | n=brunst | andel % |
| Obehandlade | 84 | 30,9 | 54 | 23,7 | 10 | 15,4 |
| PG | 69 | 25,4 | 133 | 58,3 | 26 | 40,0 |
| hCG | 86 | 31,6 | 26 | 11,4 | 22 | 33,8 |
| PG & hCG | 33 | 12,1 | 15 | 6,6 | 7 | 10,8 |
| Summa | 272 | 100 | 228 | 100 | 65 | 100 |

Samband behandling/dubbelovulation

Tabell 14 a-c visar fördelningen av anovulatoriska (**0**) samt singel- och dubbelovulatoriska brunster (**1** och **2**), mellan de olika behandlingsgrupperna. Är det vanligare med dubbelovulationer efter behandling med hormonpreparat? Finns det någon statistiskt signifikant skillnad mellan de olika grupperna?

Tabell 14a. Fördelning av anovulatoriska samt singel- och dubbelovulatoriska brunster mellan de olika grupperna för halvblod 2002. Kontrollston är exkluderade.

| Grupp | Halvblod 2002 | | | | | | |
|---------------------|---------------|-----------|---------|------------|---------|-----------|---------|
| | n=brunst | 0 | andel % | 1 | andel % | 2 | andel % |
| Obehandlade | 84 | 3 | 3,6 | 76 | 90,5 | 5 | 6,0 |
| PG | 69 | 1 | 1,4 | 53 | 76,8 | 15 | 21,7 |
| hCG | 86 | 12 | 14,0 | 68 | 79,1 | 6 | 7,0 |
| PG & hCG | 33 | 3 | 9,1 | 27 | 81,8 | 3 | 9,1 |
| Summa | 272 | 19 | | 224 | | 29 | |

Tabell 14b. Fördelning av anovulatoriska samt singel- och dubbelovulatoriska brunster mellan de olika grupperna för halvblod 2003. Kontrollston är exkluderade.

| Grupp | Halvblod 2003 | | | | | | |
|---------------------|---------------|-----------|---------|------------|---------|-----------|---------|
| | n=brunst | 0 | andel % | 1 | andel % | 2 | andel % |
| Obehandlade | 54 | 2 | 3,7 | 44 | 81,5 | 8 | 14,8 |
| PG | 133 | 10 | 7,5 | 91 | 68,4 | 32 | 24,1 |
| hCG | 26 | 6 | 23,1 | 17 | 65,4 | 3 | 11,5 |
| PG & hCG | 15 | 0 | 0 | 11 | 73,3 | 4 | 26,7 |
| Summa | 228 | 18 | | 163 | | 47 | |

Tabell 14c. Fördelning av anovulatoriska samt singel- och dubbelovulatoriska brunster mellan de olika grupperna för fullblod 2002 och 2003. Kontrollston är exkluderade.

| Grupp | Fullblod 2002 & 2003 | | | | | | |
|---------------------|----------------------|----------|---------|-----------|---------|----------|---------|
| | n=brunst | 0 | andel % | 1 | andel % | 2 | andel % |
| Obehandlade | 10 | 0 | 0 | 9 | 90,0 | 1 | 10,0 |
| PG | 26 | 0 | 0 | 22 | 84,6 | 4 | 15,4 |
| hCG | 22 | 1 | 4,5 | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 |
| PG & hCG | 7 | 0 | 0 | 6 | 85,7 | 1 | 14,3 |
| Summa | 65 | 1 | | 56 | | 8 | |

Vid jämförelse mellan singel och dubbelovulation visade den statistiska analysen att PG behandling medförde högre frekvens dubbelovulationer än när ingen behandling gjordes ($P = 0,0065$; $OR = 2,653$). Behandling med hCG samt PG och hCG gav inte enligt statistiska beräkningar någon signifikant ökad risk för dubbelovulationer jämfört med obehandlade brunster. Vid en jämförelse av risken för dubbelovulationer behandlingsgrupperna emellan, var alltså PG det hormon som gav flest dubbelovulationer ($P = 0,0065$; $OR = 2,653$), följt av PG & hCG ($P = 0,6278$; $OR = 1,765$) och hCG ($P = 0,2799$; $OR = 1,086$).

Tvillingdräktigheter

Frekvens

Antalet tvillingdräktigheter hos halvbloden var 17 stycken ($17/336 = 5,1\%$) år 2002 och 32 stycken ($32/326 = 9,8\%$) år 2003. Hos fullbloden var det sammanlagda antalet tvillingdräktigheter 5 stycken ($5/71 = 7,0\%$) för de båda åren. Frekvensen tvillingdräktigheter är beräknad på det totala antalet ston undersökta och inseminerade/betäckta på Flyinge år 2002 och 2003.

Samband behandling/tvillingdräktighet

Tvillingdräktigheternas fördelning över de olika grupperna (alla ston inkluderade) visas i tabell 15. I tabellen är alla ston med som dräktighetsundersökts på Flyinge de båda åren.

Tabell 15. Tvillingdräktigheter fördelade på de olika grupperna.

| Grupp | Halvblod 2002 | | | Halvblod 2003 | | | Fullblod 2002 & 2003 | | |
|---------------------|---------------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|-------------------------|----------|---------|
| | n=sto | tvilling | andel % | n=sto | tvilling | andel % | n=sto | tvilling | andel % |
| Obehandlade | 187 | 7 | 3,7 | 182 | 15 | 8,2 | 26 | 3 | 11,5 |
| PG | 56 | 9 | 16,1 | 109 | 14 | 12,8 | 18 | 1 | 5,6 |
| hCG | 56 | 0 | 0 | 13 | 1 | 7,7 | 15 | 1 | 6,7 |
| PG & hCG | 37 | 1 | 2,7 | 22 | 2 | 9,1 | 12 | 0 | 0 |
| Summa | 336 | 17 | | 326 | 32 | | 71 | 5 | |

Den statistiska analysen visade att det fanns ett statistiskt signifikant samband vad gäller behandling med PG och förekomst av tvillingdräktighet ($P = 0,0032$; $OR = 2,084$)

Risken för ökad förekomst av tvillingdräktigheter vid behandling med hCG var i denna studie $P = 0,1788$ och vid behandling med både PG och hCG, $P = 0,6110$, och alltså inte statistiskt signifikant.

Samband spermatyp/tvillingdräktighet

Tabell 16 visar frekvensen tvillingdräktigheter hos de olika spermatyperna (behandlade ston samt kontrollston medräknade). Finns det en ökad risk för tvillingdräktighet beroende på vilken typ av sperma stoet insemineras med?

Tabell 16. Samband spermatyp och tvillingdräktighet.

| Spermatyp | 2002 | | | 2003 | | |
|--------------|------------|-----------|---------|------------|-----------|---------|
| | n=sto | tvilling | andel % | n=sto | Tvilling | andel % |
| AI | 157 | 12 | 7,6 | 160 | 27 | 16,9 |
| TAI | 30 | 5 | 16,7 | 30 | 2 | 6,7 |
| FAI | 24 | 0 | 0 | 23 | 3 | 13,0 |
| Summa | 211 | 17 | | 213 | 32 | |

I detta material hade typen av sperma ingen påverkan på andelen tvillingdräktigheter.

DISKUSSION

I denna studie sågs en signifikant högre frekvens dubbelovulationer år 2002 (14,4 %) jämfört med år 2003 (21,4 %). Denna skillnad sågs både vid obehandlade och behandlade brunster.

Alla dubbelovulationer från år 2002 och 2003 är medräknade, men bara 253 ston av totalt 382 år 2002, samt 237 ston av totalt 351 år 2003. Detta betyder att frekvensen dubbelovulationer i detta material är något högre än om samtliga ston som inseminerats vid Flyinge hade inkluderats. Detta hindrar dock inte att åren kan jämföras sinsemellan, vilket på grund av de stora skillnaderna är av intresse.

Orsaken till att frekvensen dubbelovulationer var så mycket högre år 2003 än år 2002 kan bero på olika faktorer. Faktorer som spelar in är t.ex. stoets ålder, reproduktionsstatus, tidpunkt på säsong samt hormonbehandling. Hur stor roll dessa faktorer spelar diskuteras nedan.

Ålder

I denna studie visade sig åldern ha en signifikant betydelse vad gäller förekomsten av dubbelovulationer ($P < 0,0001$). Det visade sig innebära en större risk för dubbelovulationer om stoet uppnått en ålder av 11 år eller mer.

Dessa resultat kan jämföras med en studie utförd av Deskur (13) där det rapporterades om en signifikant ökning av antalet tvillingdräktigheter hos 16 – 20 åriga fullblodsston, jämfört med ston som var yngre. Även Bruck et al. (10) fann att tvillingfrekvensen var högre hos äldre ston. Ginther och Sandersson (25,26) såg däremot inte något samband mellan ålder och risken för multipla ovulationer. Den verkliga effekten av ålder på dubbelovulationer behöver således utredas ytterligare.

Reproduktionsstatus

De statistiska analyserna visade att icke lakterande ston hade en signifikant högre incidens dubbelovulationer ($P < 0,05$) än lakterande. Dessa resultat stämmer väl överens med tidigare studier, där flera författare visat att icke lakterande ston har en högre incidens tvillingdräktigheter (5,10,11,15) jämfört med lakterande.

Det var fler äldre ston bland halvbloden, men färre ston med föl vid sidan jämfört med fullbloden. Skillnaden kan bero på att många halvblodsägare vill betäcka sitt sto först när hon tävlat klart. Detta medför att det är vanligt att halvblod tas till avel först efter 15 års ålder. Ett fullblod startar sin tävlingskarriär tidigare och avslutar den också vid relativt ung ålder. Detta innebär att de ofta sätts in i aveln tidigare än halvbloden.

Säsongsvariation

Denna studie visade inte något signifikant samband mellan säsong och frekvens dubbelovulationer ($P > 0,05$).

Vissa forskare har funnit effekt av säsong/månad på frekvensen dubbelovulationer, andra inte. I en rapport sågs en högre frekvens på våren i en annan sågs detsamma på hösten. I ingen av studierna hade statistisk bearbetning gjorts på materialet. Frågan om säsongen har effekt på frekvensen dubbelovulationer är därför inte fullt klarlagd.

Prostaglandin F_{2α}

I denna studie gav behandling med PG för att inducera brunst signifikant fler dubbelovulationer jämfört med obehandlade brunster ($P < 0,01$).

Enligt Ginther (18) så börjar FSH-mängden, som stimulerar de ovulatoriska vågorna, att minska i koncentration när den största follikeln når en diameter av cirka 13 mm. Denna minskning av FSH fortsätter under tillväxten av folliklar i en våg, samt även i flera dagar efter det att selektionen påbörjats. För selektion krävs en låg koncentration FSH. Efter administration av FSH eller anti-inhibin som höjer den endogena koncentrationen FSH, sker en utveckling av multipla dominanta folliklar.

Jöchle et al. (17) rapporterade att en injektion med en PGF_{2α} analog inom några få minuter resulterade i en kraftig höjning av LH och FSH i blodet. Detta medför att PGF_{2α} stör den kontroll som FSH har över follikelvågorna. Detta kan orsaka multipel follikelväxt och därmed leda till multipla ovulationer. Administration av PGF_{2α} under lutealfasen skulle alltså kunna interferera med den komplicerade mekanism som follikelselektionen utgör och leda till att två folliklar selekteras ut och växer vidare mot ovulation. Troligen har tidpunkten för PG-behandlingen betydelse för om en störning av follikelselektionen sker eller inte. Om stoet behandlas tidigt i lutealfasen kanske selektionen ej påverkas eftersom den ännu inte startat.

I denna studie var det mer än dubbelt så många PG-behandlingar år 2003 jämfört med år 2002. Tvärtom förhöll det sig med hCG samt PG & hCG som användes mer än tre gånger respektive mer än två gånger så ofta, år 2002 jämfört med år 2003. Skillnaderna i behandlingsstrategi beror sannolikt på att det var olika veterinärer som arbetade på Flyinge dessa två år.

Humant chorion gonadotropin (hCG)

I denna studien gav behandling med hCG, ensam eller i kombination med PG, inte någon signifikant ökad frekvens dubbelovulationer ($P > 0,05$). Detta resultat skiljer sig från andra studier. T.ex. rapporterade Perkins och Grimmet (11) att hCG-behandling ökade risken för tvillingar ($OR = 2,04$). Glykoproteinet hCG har en halveringstid på 8 – 12 timmar och skiljer sig kemiskt från LH. Dess biologiska aktivitet är i huvudsak densamma. Dock har hCG till viss del även en FSH-liknande effekt. Därför kan hCG, förutom att inducera ovulation av preovulatoriska folliklar, även påverka initieringen av follikelselektionen (28). I de fall PG behandling kombineras med hCG tycks effekterna adderas.

Risken att få dubbelovulation efter hCG-behandling och efter hCG-behandling på en PGF2 α -inducerad brunst, var i denna studie olika beroende av år. Det var lägre risk år 2002 jämfört med år 2003. Detta skulle kunna förklaras med att behandlingsstrategin skilde sig mellan åren. Den veterinär som arbetade på Flyinge år 2002 hade, enligt egen uppgift, som rutin att behandla med hCG vid långa brunster. Denna strategi skilde sig från den som tillämpades under år 2003. Veterinären som arbetade detta år, använde enligt egen uppgift, hCG endast på riktigt bra brunster med normal follikelutveckling. Enligt dennes erfarenhet var det ofta för sent att inducera ovulation genom att behandla med hCG på en lång brunst.

Enligt både vetenskapliga studier (e.g. Barbacini et al., 2000) och erfarenheter i praktiken, får man bäst effekt av hCG om behandlingen görs på en växande follikel med en storlek på > 35 mm. I de fall hCG används vid långa brunster har troligen follikeln slutat att växa. Det är dessutom troligt att behandlingen inte sammanfaller med den känsliga tidpunkt då selektionen av den dominanta follikeln äger rum. Detta skulle kunna förklara varför frekvensen dubbelovulationer vid hCG-behandling och dubbelbehandling var så mycket lägre år 2002 jämfört med år 2003. Statistiken baserar sig på båda åren tillsammans. Det hade varit intressant att analysera åren var för sig. Detta för att se om hCG samt dubbelbehandling har signifikant effekt på frekvensen dubbelovulationer när korta brunster behandlas, som var fallet år 2003. Det finns en risk att åren tar ut varandra när det förekommer så pass stora skillnader. Siffrorna i tabell 14 stödjer denna misstanke.

Tvillingfrekvens

När det gäller dubbelovulationer kan enskilda brunster analyseras, dock måste den genetiska faktorn tas med i beräkningen, alltså att samma sto kan ge upphov till flera dubbelovulationer. Vid tvillingdräktighet krävs dock att hänsyn tas till fler parametrar, inte minst spermakvalitet hos hingsten samt hanteringen av sperman efter samling (färsk, kyld eller fryst). Dessutom är kvaliteten på äggen, miljön i livmodern, utfodring, stress m.m. ytterligare faktorer av vikt.

Antalet tvillingdräktigheter hos halvbloden, räknat på samtliga inseminerade ston, var 5,1 % år 2002 och 9,8 % år 2003. Hos fullbloden var siffran 7,0 % för båda åren. I denna studien fanns det ett signifikant samband mellan behandling med PG och frekvens tvillingdräktigheter ($P < 0,005$). Behandling med hCG för att inducera ovulation, ensam eller ihop med PG, visade i denna studie inte på något signifikant samband med ökad frekvens tvillingdräktigheter ($P > 0,05$). Dock skilde sig denna risk mellan åren på samma sätt som för dubbelovulationerna. Jämförelsen av risken för tvillingdräktighet mellan behandlingsgrupperna visade att de ston som behandlats med PG löpte störst risk (OR = 2,08), följda av dem som behandlats med hCG på en PG-inducerad brunst (OR = 0,68), minst risk löpte de som behandlats med enbart hCG (OR = 0,41).

Dessa resultat kan jämföras med dem i en studie utförd av Veronesi et. al. (27). Där var frekvensen tvillingdräktigheter vid behandling med hormoner signifikant högre ($P < 0,0001$; OR = 2,87) än den hos obehandlade kontroller. Vid en jämförelse behandlingarna emellan, var den behandling som innebar störst risk för tvillingdräktigheter hCG på en PGF2 α -inducerad brunst ($P < 0,0001$; OR = 6,37). Minst risk utgjorde behandling med enbart hCG ($P < 0,05$; OR = 2,18) och jämförelse mellan incidens tvillingdräktigheter hos kontroller och ston behandlade med PGF2 α visade en skillnad med statistisk signifikans på $P < 0,01$; OR = 3,05.

Slutsats

Resultaten i denna studie visar att förutom ålder och reproduktionsstatus så bidrar induktion av östrus genom behandling med PG under lutealfasen, till en ökad risk för dubbelovulation och därmed tvillingdräktighet. Vid behandling med hCG ensam, eller på en PG-inducerad brunst, syntes ingen signifikant ökad risk för dubbelovulationer. Dock sågs en skillnad mellan de två åren beroende på olika behandlingsstrategier.

Användandet av hormoner för induktion av brunst och ovulation anses idag mer eller mindre nödvändigt för ett effektivt arbete vid stuterier. Än mer vedertaget är det, att tvillingdräktighet hos häst är något icke önskvärt. Eftersom hormonbehandling kan påverka frekvensen dubbelovulationer och tvillingdräktigheter bör veterinären vara mycket noggrann vid den tidiga dräktighetsundersökningen. Detta för att upptäcka eventuella tvillingar, och vidta lämplig åtgärd för att uppnå bästa möjliga överlevnad av ett foster.

Tack! Jag vill tacka Flyinge för vänligt bemötande samt generositet vad gäller tillhandahållande av material. Jag vill även tacka Patrik Öhagen som gjort den statistiska bearbetningen av materialet möjlig. Sist men inte minst vill jag tacka min handledare Anne-Marie Dalin, som med brinnande entusiasm och ett stort mått av medmänsklighet har stöttat och hjälpt mig i arbetet med denna studie.

REFERENSER

- 1 Söderquist, L. Artificial insemination. In Compendium on Equine Reproduction. Department of Obstetrics and Gynaecology Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden, 2000, p.167 - 179.
 - 2 Kindahl, H. Reproductive physiology in the mare. In Compendium on Equine Reproduction. Department of Obstetrics and Gynaecology Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden, 2000, p. 14 – 38.
 - 3 Ginther OJ. Embryology and placentation. In Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd edition Cross Plains, WI: Equiservices; 199. .p. 345 - 418.
 - 4 Darenius, K. Irregularities in the oestrus cycle of the mare. In Compendium on Equine Reproduction. Department of Obstetrics and Gynaecology Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala, Sweden.2000, p. 78 - 84.
 - 5 Merkt H, Jochle W. Abortions and twin pregnancies in Thoroughbreds: rate of occurrence, treatments and prevention. J Equine Vet Sci 1993, 13, 690-4.
 - 6 Jeffcott LB, Whitwell K. Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in the Thoroughbred mare. J Comp Pathol 1973, 83, 91-106.
 - 7 Ginther OJ. Relationship among number of days between multiple ovulation, number of embryos, and type of fixation in mares. J Equine Vet Sci 1987, 7, 82-88.
 - 8 Ginther OJ. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Cross Plains, WI: Equiservices; 1986.
 9. Klemetsdal G, Johnson M. Effect of inbreeding on fertility in Norwegian Trotter. Livestock Prod. Sci. 1989, 21, 263-272.
 - 10 Bruck I, Anderson GA, Hyland JH. Reproductive performance of Thoroughbred mares on six commercial stud farms. Aust. Vet J 1993, 70, 299-303.
 - 11 Perkins N, Grimmet J. Pregnancy and twinning rates in Thoroughbred mares following the administration of human chorionic gonadotropin (hcg). N Z Vet J 2001, 49-100.
 - 12 Woods GL, Hollowell AL. Management of twin embryos and twin foetuses in the mare. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. Equine reproduction. Media: Williams & Wilkins; 1993, p.532-535.
 - 13 Deskur S. Twinning in Thoroughbred mares, in Poland. Theriogenology, 1985, 23, 711-718.
 - 14 Ginther OJ. Twins: origin and development. In: Ginther OJ, editor. Ultrasonic imaging and animal reproduction. Cross Plains, WI: Equiservices; 1995, p. 249-306.
 - 15 Pascoe DR, Pascoe RR, Hughes JP, Stabenfeldt GH, Kindahl H. Management of twin conceptus by manual embryonic reduction: comparison of two techniques and three hormone treatments. Am J Vet Res 1987, 48, 1594-1599.
- Samma som under 4:an!
- 16 Barbacini, S., Zavaglia, G, Marchi, V., Necchi, D., Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial semination programme using frozen semen. Euwine vet. Ed., 2000, 12, 312 – 317.
 - 17 Jöchle W, Irvine CH, Alexander SL, Newby TJ. Release of LH, FSH and GnRH into pituitary venous blood in mares treated with a PGF analogue, luproston, during the transition period. J Reprod Fertil Suppl 1987, 35, 261-267.

- 18 Ginther OJ, Meira C, Beg MA, Bergfeldt DR. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. *Biol. Reprod* 2002, 67, 862-867.
- 19 Bergfeldt D. Estrous synchronization. In: Samper J, editor. *Equine breeding management and artificial insemination*. Philadelphia: Saunders; 2000, p. 165-77.
- 20 Duchamp G, Bour B, Combarous Y, Palmer E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 1987, 221-228.
- 21 Michel T.H, Rosedale P.D, Cash R.S.G. Efficacy of human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone for hastening ovulation in Thoroughbred mares. *Equine Vet Journal* 1986, 18 , 438-442.
- 22 Barrier-Battut, Le Poutre N, Trocherie E, Hecht S, Grandchamp des Raux A, Nicaise J.L, Vérin X, Bertrand J, Fiéni F, Hoier R, Renault A, Egron L, Tainturier D, Bruyas J.F. Use of Buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology* 2001, 55, 1679-1695.
- 23 Samper JC, Jensen S, Sergeant J, Estrada A. Timing of induction of ovulation in mares treated with Ovuplant or Chorulon. *Journal of Vet. Sci* 2002, 22, 320-324.
- 24 Johnson CA, McMeen, S.L., Thompson Jr, D.L.. Effects of multiple GnRH analogue (deslorin acetate) implants on cyclic mares. *Proceedings Equine reproduction VIII, Fort Collins, USA, 2002*, 469 – 471.
- 25 Ginther OJ. Twinning in mares: a review of recent studies. *J Equine Vet Sci* 1982, 2, 127-135.
- 26 Sanderson MW. Twin ovulation, conception and gestation in the Thoroughbred mare. M.Sc. Thesis. Aberystwyth, UK: University of Wales press; 1982.
- 27 Veronesi M.C, Battocchio M, Faustini M, Gandini M, Cairoli F. Relationship between pharmacological induction of estrous and/or ovulation and twin pregnancy in the Thoroughbred mares. *Domestic Animal Endocrinology* 2003, 25, 133-140.
- 28 Bergfeldt D, Gastal E, Ginther OJ. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol. Reprod* 2001, 65, 426-432.
- 29 Woods G, Ginther OJ. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 1983, 20, 347-355.
- 30 Ginther OJ. Characteristics of the ovulatory season. In *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2nd edition Cross Plains, WI: Equiservices; 1992.p 173 - 232.