



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Ultraljud som hjälpmedel vid seminträning på nötkreatur

Caroline Ångström

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:88*

Ultraljud som hjälpmedel vid semintraning på nötkreatur

Caroline Ångström

*Handledare: Hans Gustafsson, Institutionen för Kliniska vetenskaper
Biträdande handledare Renée Båge, Institutionen för Kliniska vetenskaper*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2010
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239 Nivå X, 30hp*

Nyckelord: nötkreatur, artificiell insemination, reproduktion, utbildning, seminörer

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:88*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
SUMMARY	4
INLEDNING	5
LITTERATURÖVERSIKT	6
Artificiell insemination.....	6
<i>Bakgrund</i>	6
<i>Reproduktionsfysiologi och AI</i>	7
<i>Inseminationsteknik</i>	7
<i>Deponeringsplats</i>	8
Ultraljudsteknik	11
MATERIAL OCH METOD	12
Inledande försök	12
Anpassning av utrustningen	12
Organförsök.....	13
<i>Organförsök I</i>	13
<i>Organförsök II</i>	14
Försök på levande djur	15
RESULTAT	16
Inledande försök	16
Organförsök I	16
Organförsök II	17
Försök på levande djur	18
DISKUSSION.....	19
Slutsatser	21
LITTERATURFÖRTECKNING.....	22

SAMMANFATTNING

En av de viktigaste faktorerna för ett bra fruktsamhetsresultat vid seminering av kor är att sperman deponeras på rätt plats i kons könsorgan. Deponering i cervix istället för optimalt i livmodern ger ett signifikant försämrat dräktighetsresultat. Studier har visat att vid storleksordningen en fjärdedel av inseminationerna deponeras sperman felaktigt i cervix. Ett viktigt moment i grundutbildning och fortbildning av husdjurstekniker alternativt djurägarseminörer är möjligheten till praktisk träning med efterföljande kontroll av deponeringsplats på levande nötkreatur. Det finns några olika sätt att öva på detta moment men inget är i dagsläget optimalt.

Syftet med den här studien var att utvärdera om ett portabelt ultraljud skulle kunna användas för att ta fram en alternativ övningsmetod. Denna metod skulle vara användbar i fält, skonsam för djuret, kompatibel med ordinarie inseminationsutrustning, godkänd ur livsmedelssäkerhetssynpunkt samt helst kunna upprepas fler gånger på samma djur.

Ett antal olika material (metall, glas) och flytande produkter undersöktes inledningsvis i vattenbad samt deponerades i livmödrar från slaktade kor för att utvärdera synbarheten med ultraljudsteknik. Metallstavar som fästes i nylonlina och som efter deponering kunde dras ut valdes som det mest lämpliga alternativet, då de har stark ekogenitet. Dessa deponerades sedan av en rutinerad seminör i tio livmödrar från slaktade kor, vilka därefter undersöktes med ultraljud i ett vattenbad. Ultraljudsoperatören var ovetande om metallstavarnas placering i organet och kunde i samtliga fall korrekt bedöma dess läge. Samma försök upprepades på tio levande kor. Korrekt deponeringsplats kunde då bedömas i 8 av 10 fall med rektalt ultraljud. Den största svårigheten med att bedöma metallstavarnas läge på levande kor gentemot organ, var att vissa kor hade strukturer i livmodern av okänd natur, som uppvisade liknande ekogenitet som metallstavarna.

Sammanfattningsvis visar vår studie att ultraljud skulle kunna användas tillsammans med utdragbara metallstavar för att avgöra deponeringsplats vid semintränning. Metoden uppfyller samtidigt alla de krav som sattes inledningsvis. Metoden kräver emellertid en rutinerad ultraljudsoperatör och det behövs förbättringar i utformningen av metallföremålet och inseminationsutrustningen. Därefter bör metoden valideras på ett större antal kor innan den fullt ut kan användas i utbildningen.

SUMMARY

One of the most important elements in achieving a good conception rate when inseminating cows, is that the sperm is deposited at the correct site in the reproductive tract. Depositing the sperm in the cervix instead of optimally in the uterus, results in a significantly lower conception rate. Studies have provided evidence that in as much as one-fourth of the inseminations, semen is incorrectly deposited in the cervix. One important part in the basic education and further training of professional and do-it-yourself inseminators, is the opportunity to practice on live cows with subsequent evaluation of the site of deposition. There are some various techniques which enable such training, none of them are however optimal.

The purpose of this study was to evaluate the possibility of using a portable ultrasound machine, in order to develop an alternative training technique. This technique should be usable in field, not be harmful to the animal, compatible with the ordinary insemination-equipment, food safety approved and preferably possible to repeat on the same animal.

At the beginning, a variety of different materials (metal, glass) and liquids were analyzed in water-bath and deposited into excised bovine reproductive tracts, in order to evaluate the visibility with ultrasonography. Rods of metal attached to a nylon line and therefore possible to pull out from the reproductive tract after deposition, were chosen to be the most suitable alternative since they showed high echogenicity. The metal rods were thereafter deposited in ten uteri from excised tracts by a skilled inseminator. The organs were then moved to a water bath and examined with an ultrasound machine. The position of the metal rods in the organ was unknown to the ultrasound operator, whom in all cases identified the correct position. An identical experiment was performed with ten live cows. Identification of the correct site of deposition, using rectal ultrasonography, was achieved in 8 of 10 cases. The most pronounced difficulty when evaluating the location of the metal rods in live cows in contrast to organs, was the presence of unidentified structures in some of the cows' uteri. These structures produced echogenic signals similar to those of the metal rods.

In summary, our study shows that it is possible to use ultrasonography along with retractable metal rods in order to determine site of deposition in connection with inseminator training. The method fulfils all the requirements that were set initially, however, it demands a skilled ultrasound operator and adjustments of the metal object and the insemination equipment are required. The method should subsequently be validated by testing it on a larger number of animals before applying it in education.

INLEDNING

I den svenska mjölkkoaveln har artificiell insemination (AI) använts som reproduktionsteknik sedan slutet av 1940-talet. Idag används AI till ca 90 % av mjölkorna. Mellan september 2008 och augusti 2009 inseminerades 357 789 nötkreatur i de svenska mjölkbesättningarna (Svensk Mjök 2010).

Effektiviteten i mjölkproduktionen baseras på att djuren blir dräktiga i optimal tid i laktationsperioden. Om djuren går tomma för länge medför det stora kostnader för djurägaren. En av de viktigaste faktorerna för goda dräktighetsresultat är att semineringen sker vid rätt tidpunkt och utförs korrekt. Därför är utbildning och träning av de som ska utföra inseminationerna, husdjurstekniker eller djurägarseminörer, avgörande för hur väl fruktsamheten kommer att fungera i en besättning.

En brittisk studie har visat att semineringsovningar på levande kor, i samband med utbildning av djurägarseminörer, har stor inverkan på hur väl de lyckas med arbetet i den egna besättningen (Howells *et al* 1997). Antalet övningstillfällen på levande kor visade sig var positivt korrelerat till dräktighetsprocenten i det egna seminarbetet.

Ett av de viktigaste momenten, för att uppnå goda resultat i seminverksamheten, är att sperman deponeras på rätt ställe i livmodern. För att säkerställa att så sker ingår träning på både organ och levande djur på slakteri vid utbildning av semin veterinärer, husdjurstekniker och djurägarseminörer i Sverige. Traditionellt har man använt djur på slakterier som väntar på att bli slaktade som träningsdjur. Slaktdjuret har sminerats med ett instrument som skapat ett litet brännmärke i livmodern och sedan har man undersökt reproduktionsorganen efter slakt, för att se var den tänkta deponeringen av sperman skedde. Det har emellertid blivit allt svårare att få tillgång till djur för praktisk övning på slakterierna. Dels på grund av att slakterierna blir allt färre och att djuren går direkt till slakt utan väntetid men även att slakterierna blivit mindre benägna att släppa in externa besökare och att upplåta djuren till utbildningsverksamhet. Det är även tveksamt av etiska skäl att utsätta nötkreaturen på slakterierna för den extra stress som träningen kan medföra. Därför är det önskvärt med en alternativ metod för att kunna avgöra om man ligger rätt med inseminationsinstrumentet i livmodern vid inseminationstillfället.

Den metod som framförallt används i nuläget för att kontrollera att eleven ligger rätt vid inseminationstillfället är så kallad torrinsemination. Eleven använder då den vanliga utrustningen fast utan att den laddas med sperma. Läraren kontrollerar sedan med rektalpalpation att pistoletten är placerad på rätt ställe vid den tänkta inseminationen. Nackdelen med den här typen av övning är att instrumentet riskerar att ändra läge då det sker ett byte från elevens till lärarens arm i rektum.

Ytterligare ett alternativ till att åskådliggöra deponeringsplats är att inseminera flytande ämnen som går att se med ultraljud. Det finns emellertid inga studier utförda på vilka medier som syns bäst vid ultraljudsundersökning. Då korna är livsmedelsproducerande djur måste man även ta hänsyn till vad som är tillåtet att använda sig av enligt MRL-förordningen. Enligt Hultén¹ är det tillåtet att

¹ Fredrik Hultén, Läkemedelsverket, e-mail den 18 oktober 2010.

deponera glidslem och paraffinolja intrauterint, då dessa produkter inte räknas som läkemedel och det därför inte är aktuellt med karenstid. En annan svårighet med flytande medier är att de flyter ut och sprider sig i livmodern, vilket försvårar möjligheten att kunna fastställa exakt deponeringsplats.

I en studie av Beal *et al* (1989) deponerades en mässingskula på olika simulerade inseminationsplatser i reproduktionsorganen hos kor. Mässingskulan kunde identifieras i 24 av 25 fall med rektal ultraljudsundersökning. Kulan, som var fäst i en nylonlina, kunde sedan dras ut efter undersökningen. I den här studien är syftet att utvärdera medier och metoder för lokalisering av deponeringsplats vid AI med ultraljudsundersökning och då testa både flytande medier och metall/glas/plast enligt Beal *et al*. Vidare att komma fram till lämplig fältmässigt användbar träningsteknik genom användande av en portabel ultraljudsapparat. Kraven som metoden måste uppfylla är följande:

- Användbar på levande djur ute i besättningar
- Vara så skonsam som möjligt för djuret
- Kunna användas med den ordinarie inseminationsutrustningen
- Inte innebära någon risk ur livsmedelssäkerhetssynpunkt

En ytterligare fördel vore om metoden är upprepbar på samma djur eftersom det ofta råder brist på lämpliga träningskor

LITTERATURÖVERSIKT

Artificiell insemination

Tillämpningen av AI regleras i Statens jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet med nötkreatur (SJVFS 2004:41). Enligt föreskrifterna krävs seminutbildning för veterinärer och husdjurstekniker alternativt genomgången seminkurs för djurägare för att få tillstånd att seminera. Seminverksamheten ska även övervakas av en ansvarig veterinär som har särskild seminutbildning. Andelen inseminationer som utförs av djurägare har ökat kraftigt de senaste 20 åren och ligger nu på ca 50 % av det totala antalet inseminationer (Svensk Mjolk 2009/2010).

Bakgrund

Det första beskrivna försöket till insemination utfördes på hund år 1784 av Lazzaro Spallanzi, en italiensk munk och vetenskapsman, men det var framförallt under 1900-talet som de stora framstegen inom AI åstadkoms (Einarsson *et al* 1987). Tekniken introducerades i Sverige som syfte att förbättra avelsarbetet inom mjölkkoaveln på 1930-talet. Sedan dess har tekniken vidareutvecklats och används nu på flertalet olika djurslag. Utöver mjölkbesättningarna är även AI den dominerande reproduktionsmetoden inom gris- och hästaveln. Anledningen till att AI har haft sådan genomslagskraft är att det möjliggör säkrare dräktighetsresultat, minskar skaderiskerna i samband med naturlig parning, förhindrar spridning av könssjukdomar och gör att avelsarbetet kan effektiviseras. Nackdelarna med AI är bland annat att dåliga anlag riskerar att få en stor spridning och att det kräver mycket arbete och tid för brunstpassning.

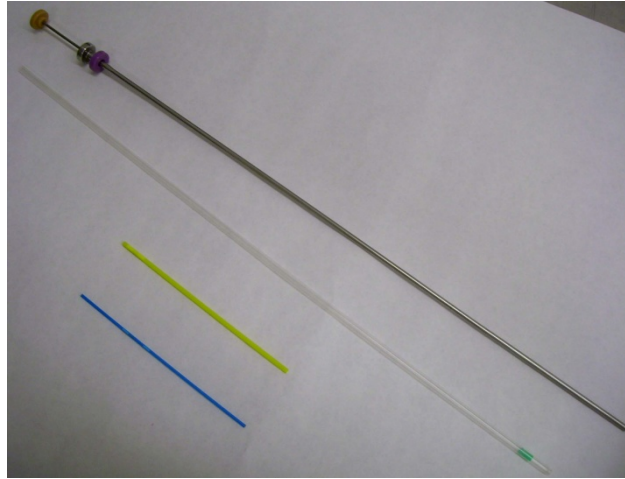
Reproduktionsfysiologi och AI

När sperma deponerats i de honliga könsorganen via naturlig betäckning eller AI hjälper den glatta muskulaturen i könsorganen till att transportera spermerna i riktning mot äggledarna (Larsson 2009). På vägen mot äggledarna samlas en del av spermerna tillfälligt upp i reservoarer. Dessa reservoarer finns i cervix, i övergången mellan livmoder och äggledare (UTJ) samt i isthmus. I reservoarerna kan spermerna undgå att bli fagocyterade av hondjurets leukocyter samt genomgå mognadsprocesser. Det kommer bara vara ett mycket litet antal spermier som överlever och når ända fram till övergången mellan ampulla och isthmus (AIJ), där befruktningen sedan sker. Efter ovulationen fångas den mogna oocyten upp av äggledartratten och transporteras vidare till ampullan och övergången till isthmus. Oocyten kan bara överleva 8-12 timmar efter ovulationen medan spermerna kan överleva i de honliga könsvägarna i 24-48 timmar.

För att lyckas med AI krävs noggrann brunstpassning. Nötkreaturens brunst består av förbrunst, högbrunst och efterbrunst (Gustafsson 2006). Under förbrunsten kan man se beteendeförändringar och en tilltagande brunstflytning. Då högbrunsten inträder står djuret för upphopp av andra djur och svankar. Man kan se en klar, bubblig flytning och vaginalslemhinnan är hyperemisk. Under efterbrunsten avtar flytningen och brunstbeteendet. Högbrunsten pågår under ca 12-26 timmar (Einarsson *et al* 1987). Ovulation sker 10-18 timmar efter högbrunstens slut och den bästa tidpunkten för befruktning av oocyten är de första fyra timmarna efter ovulationen. För att spermerna ska kunna befrukta oocyten behöver de genomgå kapacitering, en mognadsprocess som sker i livmodern och tar 3-6 timmar. För att få störst chans till befruktning bör därför kapaciterade spermier finnas på plats i livmodern redan vid ovulationen. Därför rekommenderas att djur som visar högbrunst på förmiddagen/morgonen insemineras följande eftermiddag/kväll medan djur som visar högbrunst på eftermiddag/kväll insemineras följande dags morgon.

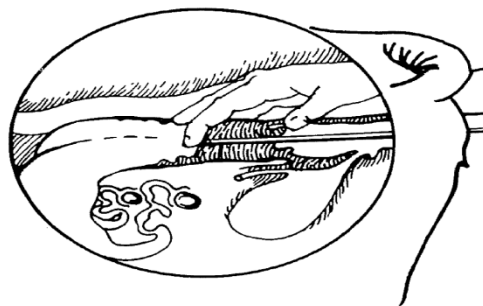
Inseminationsteknik

Spermasamlingen sker på tjurstationer och efter samling bedöms spermans kvalitet (Gustafsson 2006). Därefter späds den med spädningsvätska, kyls ned och fylls sedan i strån (payetter). Dessa strån fryses ned och förvaras sedan i flytande kväve. Strået består av plast och finns i två olika storlekar; ett som rymmer 0,25 ml (minipayette) och ett som rymmer 0,5 ml (mediumpayette). I den ena änden av strået sitter två tätande bomullsproppar och i den andra änden en förslutning i form av en svetsfog. För insemination krävs en pistolett, vilket är ett rör av metall som en pistong kan föras in i. Rörets inre diameter är avpassad för att hålla strået centrerat, vilket gör att pistongen kommer att kunna föras in i strået mot bomullsproppen. Pistoletten skyddas i sin tur av en engångsstrumpa i plast som förs över pistoletten och förankras med en låsring.



Figur 1. Pistolett, engångsstrumpa och payetter.

Själva inseminationen inleds med att strån varsamt tinas upp (Gustafsson 2006). Därefter laddas pistoletten med ett strå som klipps av under svetsfogen. En plaststrumpa förankras över pistoletten. Pistongen förs in så pass långt att sperma blir synlig längst fram i plaststrumpans öppning. Pistoletten förs in genom vagina och fram till cervix. Med hjälp av en hand i rektum fattas tag om cervix så att denna kan "träs över" pistoletten. Med tumme och pekfinger kontrolleras att pistoletten har passerat cervix och nått fram till inre livmodermunnen och att spetsen befinner sig ca 5-10 mm in i livmodern. I det här läget trycks pistongen in och sperman deponeras i corpus uteri (figur 2).

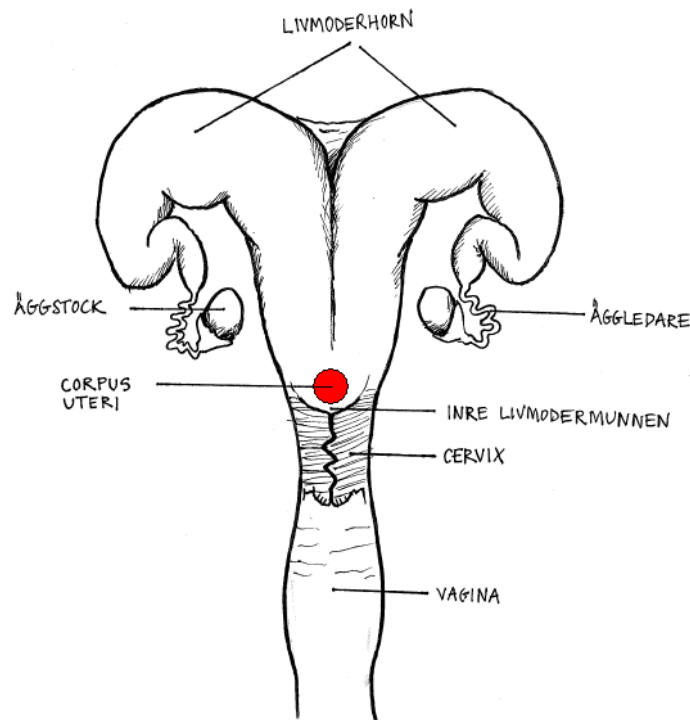


*Figur 2. Insemination i corpus uteri.
Einarsson (1987)*

Deponeringsplats

Vid naturlig betäckning deponerar tjuren sperman i främre delen av vagina (Hafez & Hafez 2000). Ejakulatet har en volym på 4-10 ml och innehåller 0,8-2,0 miljarder spermier per milliliter. Cervix hos hondjuret är emellertid en barriär som måste forceras och inte mer än 1 % av spermerna tar sig in i livmodern (López-Gatius 2000). Eftersom det är möjligt att passera cervix med AI-utrustning på nöt

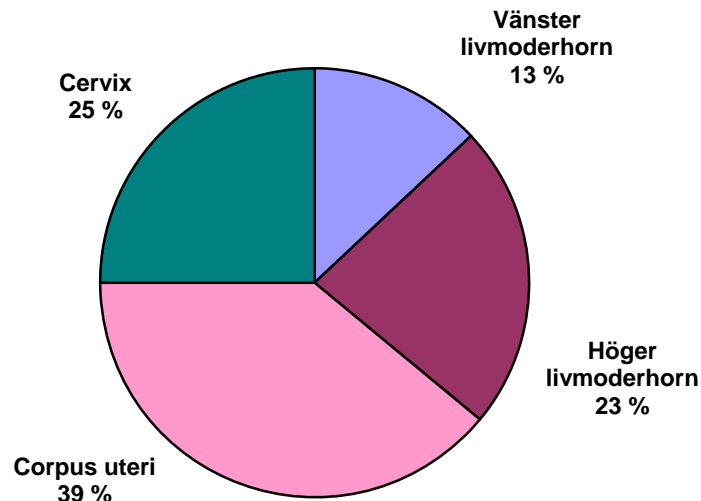
kan sperman deponeras direkt i corpus uteri och därmed krävs väsentligt mindre antal spermier.



Figur 3. Schematisk nötlivmoder sedd från ovan. Korrekt deponeringsplats i corpus uteri rödmarkerad. Illustration: C. Ångström.

Den sperma som används vid AI är spädd utefter spermieantal och kvalitet för att uppnå en koncentration på 15-20 miljoner spermier per 0,25 ml, det vill säga en inseminationsdos (Einarsson *et al* 1987). Hur mycket ett ejakulat kan spädas är baserat på antalet spermier som krävs för att vara säker på att erhålla dräktiga djur (Noakes *et al* 2009). Dessutom påverkar även volymen och platsen för deponering hur mycket spermier som behövs. Deponering i livmodern kräver minst antal spermier, deponering i cervix kräver större andel spermier medan deponering i vagina ökar behovet än mer.

Intrauterin deponering i corpus uteri är, som tidigare nämnts, den metod som vanligtvis används inom AI på nöt. Corpus uteri är i genomsnitt endast 1,7 cm lång från inre livmodermunnen till bifurkationen av livmoderhornen (Peters *et al* 1984). Därför är en av de stora svårigheterna med AI på nöt att träffa rätt vid deponeringen. Peters *et al* (1984) undersökte hur skickliga professionella seminörer respektive djurägarseminörer var på att placera pistoletens mynning på rätt ställe. Det visade sig att det inte fanns några signifikanta skillnader mellan de professionella seminörerna och djurägarna. Däremot framkom att 82 % av alla seminörer i mer än 60 % av försöken inte lyckades placera pistoletten i corpus uteri. Pistoletten placerades istället i cervix (25 % av försöken) eller i något av livmoderhornen (figur 4).



Figur 4. Placering av pistolettens mynning vid 586 inseminationsförsök av djurägarseminörer samt professionella seminörer. Modifierad efter Peters et al 1984.

Vid deponering i cervix minskar dräktighetsresultaten med 10 % (MacPherson 1968). Även i en senare studie av Williams *et al* (1988) kunde man visa att insemination i cervix inte var lika effektivt som intrauterin deponering. Detta kan ha sin grund i att det sker ett förhållandevis större bakåtlöde av spermier efter deponering i cervix jämfört med intrauterin deponering (Gallagher & Senger 1989). Således bevaras ett för litet antal spermier i livmodern för vidare transport till äggledarna för att uppnå dräktighet.

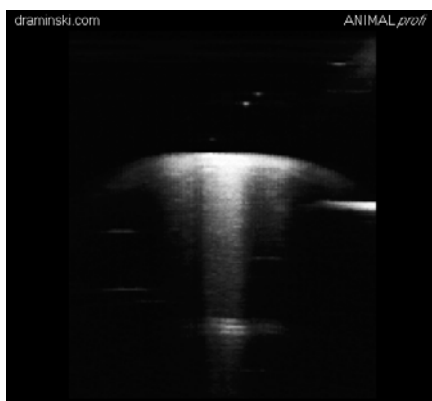
Det förekommer även djupare former av insemination, då sperman deponeras i något av hornen (unilateral insemination) eller delas upp mellan de båda hornen (bikornual insemination). Enligt Momont *et al* (1989) är det ingen skillnad i dräktighetsresultat vid deponering i corpus uteri jämfört med i något av livmoderhornen. Ett antal olika studier har jämfört effekterna av bikornual och unilateral insemination. Vid unilateral insemination har det även studerats om det har någon betydelse om deponering sker i det horn som förväntad ovulation ska ske gentemot motstående sidas horn. Resultaten av dessa studier har varit varierande, där en del menar att det är större chans till dräktighet vid insemination i det horn där ovulation förväntas medan andra anser att det inte verkar ha någon betydelse (López-Gatius 2000). Vissa undersökningar har visat fördelar med bikornual insemination medan andra studier tyder på att det inte ger upphov till någon större skillnad. Den stora fördelen med inseminering i något av hornen skulle istället kunna vara att man på så vis kan minska risken för cervikal deponering. Tekniskt sett skulle det dock kunna medföra vissa risker vid djup insemination i endera av hornen. Enligt Hunter (2003) skulle inseminationstekniken potentiellt sett kunna ge skador på endometriet och i värsta fall orsaka perforation av livmoderväggen. Vidare kan palpation och manipulation av äggstockarna, för att avgöra var ovulation förväntas ske i samband med djup insemination, öka risken för prematur ovulation.

Ultraljudsteknik

Vid undersökning med ultraljud används en ultraljudsgivare, även kallad probe, som anläggs mot den yta som ska undersökas. Proben innehåller så kallade piezoelektriska kristaller, som vid elektrisk påverkan genererar högfrekventa ljudvågor med förmåga att penetrera kroppsvävnad (Kealy & McAllister 2005). När ljudvågorna stöter på olika vävnadstyper kan ljudreflektioner av varierande styrka uppstå (eko). De reflekterade signalerna skickas åter till kristallerna och omvandlas där till olika starka elektriska impulser. Impulserna åskådliggör vävnadens struktur i gråskala på en bildskärm. Bilden som genereras förnyas ständigt i samband med att probens läge ändras.

Frekvensen på ultraljudsvågorna kan justeras beroende på vilket djup det man vill studera är beläget och vilken typ av vävnad ljudvågorna måste passera på vägen. Lågfrekventa vågor når djupare, men ger en sämre bildupplösning, medan högfrekventa vågor har kortare räckvidd till förmån för en tydligare bild.

Flera olika faktorer påverkar styrkan på det återvändande ekot och därmed även vad man ser på bildskärmen. Strukturella variationer inom kroppsvävnader, hur långa avstånd som signalen färdas, med vilken hastighet och med vilken vinkel har alla betydelse för hur det man undersöker avbildas (Goddard 1995). Vätska är mer eller mindre anekoiskt, ljudvågorna passerar långsamt utan att skicka reflekterande signaler, vilket ser svart ut på bildskärmen (Nyland & Mattoon 2002). Mjukdelar och organ har högre ekogenitet och ger olika nyanser av grått på bildskärmen. Skelett och gas är starkt reflekterande, högekogena, och återges som intensivt vitt på bildskärmen. Eftersom gas är högekogent används ultraljudsgel mellan proben och det som ska undersökas för att undvika störningar från luften. Även metall är starkt ekogent (Mills & Butts 2009). Det är vanligt att metall ger artefakter i form av skuggor eller upprepande, vita reflektioner nedanför metallföremålet (figur 5).



Figur 5. Ultraljudsbild av metallkulkedja i vattenbad med "kometliknande" artefakt.

MATERIAL OCH METOD

Den ultraljudsutrustning som användes i alla steg i genomförandet var en portabel ultraljudsapparat (DRAMINSKI ANIMAL*profi*L, Draminski® - Electronics in Agriculture, Olsztyn, Polen), B-Mode med en linjär probe på 7,5 MHz.

Inledande försök

Första steget var att prova ett antal olika material och medier i vattenbad för att undersöka synbarhet med ultraljud. De material/medier som undersöktes var:

- Metallpärlor
 - Släta metallstavar i försilvrad mässing
 - Räfflade metallpärlor i försilvrad mässing
 - Kulkedja i förkromad mässing
- Glaspärlor
- Mediumpayetter fyllda med:
 - Luft
 - Vatten
 - Glidslem
 - Paraffinolja
 - Flytande bariumsulfat-kontrastmedel

Kontrastmedlet togs främst med som en positiv kontroll eftersom det av livsmedelssäkerhetsskäl inte är godkänt att föra in i livsmedelsproducerande djur.

Pärlorna fästes på en nylonlina som spändes i vattenbadet så att de kunde sväva fritt i vattnet. Payetterna hölls nedsänkta i mitten av vattenbadet. Proben hölls konsekvent på samma avstånd från det som skulle undersökas och bilden på ultraljudsmonitorn frystes samt sparades för att senare kunna analyseras.

Ultraljudsbilderna bedömdes av två personer med lång respektive kort erfarenhet av tolkning av ultraljudsbilder. Bilderna bedömdes subjektivt avseende hur väl synliga de undersökta materialen var i vattenbadet. Som komplement till den subjektiva bedömningen analyserades även skillnaden i ljusintensitet hos de undersökta medierna/föremålen med hjälp av bildbehandlingsprogrammet Adobe® Photoshop® Elements 2.0. Ljusintensiteten mättes på den punkt av föremålet som gav starkast eko (vitast) och medierna i payetten mättes på en punkt i mitten av payetten. Intensiteten i bilden angavs som en procentsats, där 100 % är helt vitt och 0 % är helt svart. De material och medier som kunde urskiljas tydligast gick sedan vidare för fortsatta försök i organ från slaktade kor.

Anpassning av utrustningen

För att gå vidare med försök i livmödrar behövdes materialet anpassas för att kunna fungera tillsammans med inseminationsutrustningen. Metallpärlorna trädde på en hattnål i försilvrad mässing som böjdes till en ögla i ena änden

(figur 6). I öglan fästes en fiskelina av nylon ("Magic Touch", Sufix®, Greensboro, NC, USA) med en diameter på 0,25 mm. Nylonlinan knöts fast med hjälp av en fiskeknut. Glaspärlorna trädde upp på samma typ av fiskelina och kulkedjan fästes även den i fiskelina. De olika föremålen fördes ner i mynningen på en mediumpistolett (IMV Technologies, L'Aigle, Frankrike) och nylonlinan fick löpa längs med utsidan. En plaststrumpa (IMV Technologies, L'Aigle, Frankrike) trädde på över lina och pistolett. För att pärlorna skulle kunna passera mynningen på plaststrumpan, vidgades den försiktigt med hjälp av en mosquitopeang till passande storlek. Plaststrumpan fick även kortas ca 3 cm i den andra änden, för att mynningen på pistoletten skulle nå ända fram till öppningen på plaststrumpan. Då pistongen sedan sköts in i pistoletten kunde pärlorna passera ut ur pistolett och plaststrumpa (figur 7).

Organförsök

Pistoletten laddades enligt ovanstående beskrivning och fördes in i cervix eller livmoder. Vid vald plats i könsvägarna fördes pistongen in varvid material eller medium deponerades. Därefter drogs först pistongen på pistoletten tillbaka en aning, därefter drogs pistoletten ut ur plaststrumpan och sist fördes plaststrumpan försiktigt ut för att undvika dragningar i nylonlinan. En markering med tuschpenna gjordes även på linan för att ytterligare kunna kontrollera att inga dragningar uppstod vid utförandet av pistolett och plaststrumpa. De flytande produkterna fylldes i mediumpayetter (IMV Technologies, L'Aigle, Frankrike) och deponerades på samma sätt som vid normal insemination. Inläggning av provmaterialet i organen skedde utanför vattenbad. För efterföljande ultraljudsundersökning lyftes försiktigt livmodern ner i vattenbadet.

Organförsök I

Det första försöket med organ utfördes för att utvärdera synbarheten av föremålen och de flytande produkterna i livmodrar. De organ som användes kom från kor slaktade i normalslakt. Livmödrarna hade varit frusna och tinades upp för försöket. Det föremål eller den produkt som tydligast kunde identifieras i organen, som var mest hanterbar och bäst lämpad för att kunna användas på levande kor, fick sedan gå vidare till det andra steget i organförsöken.

Följande material och medier undersöktes:

- Släta stavar i försilvrad mässing, trädde på en hattnål i samma material.
Ø 2,0 mm, längd: 13 mm.
(Inköpta på Maxis, Svartbäcksgatan 19, Uppsala. Import från Hongkong).
- Räfflade pärlor i försilvrad mässing, trädde på en hattnål i samma material.
Ø 2,5 mm, längd: 11 mm.
(Inköpta på Maxis, Svartbäcksgatan 19, Uppsala. Import från Hongkong).
- Kulkedja ST BILIT®, förkromad mässing.
Ø 2,5 mm, längd: 16 mm.
(Inköpt på Jula, Bolandsgatan 17, Uppsala).
- Glaspärlor.
Ø 3,0 mm, längd: 9,0 mm.
(Inköpta på Kreativ Hobby & Pyssel, Vaksalagatan 18, Uppsala).

- Vatten, 0,5 ml.
- Glidslem, 0,5 ml.
(Valueline Lube Gel, Jørgen KRUISE A/S, Langeskov, Danmark).
- Paraffinolja, 0,5 ml.
(Apoteket).
- Flytande bariumsulfat-kontrastmedel, 0,5 ml.
(Mixobar® Colon, Initios Medical AB, Hisings Backa, Sverige).

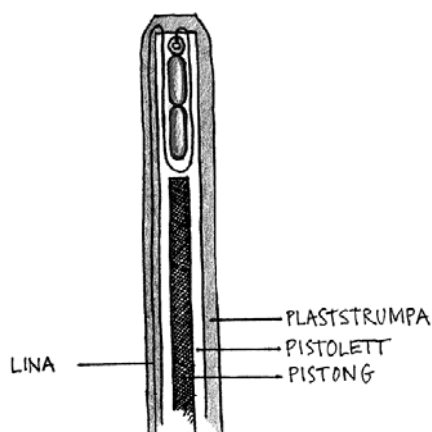


Figur 6.

1. Släta metallstavar
2. Räfflade metallpärlor
3. Kulkedja,
4. Glaspärlor

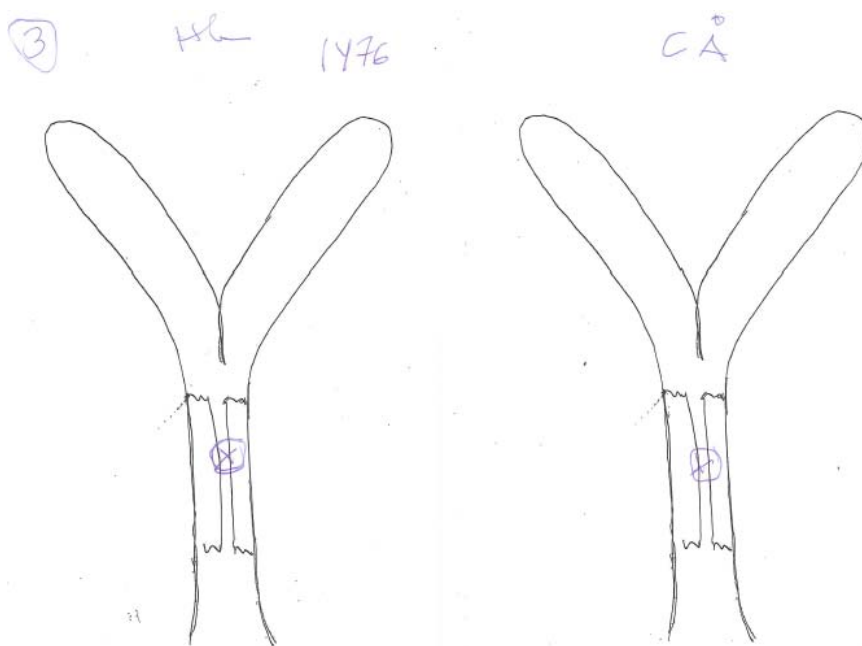
Organförsök II

Till den andra delen av organförsöken hade de släta metallstavarna valts ut som det enda försöksmaterialet. Inläggning skedde tio gånger i tio olika livmödrar från nio normalslaktade kor och en kviga. Livmödrarna hade varit frusna och tinades innan försöket. Organen bedömdes alla komma från normalt cyklande djur där livmödrarna var involverade efter föregående kalvning. För att få deponeringen att fungera optimalt justerades laddningen av pistoletten så att metallstavarna fördes ned med öglan riktad utåt och linan dubbelvikt (figur 7). Orsaken till denna modifiering var att pistongen behövde skjutas mot den ände av metallstavarna som saknade ögla för att dessa inte skjutas ut snett och därmed riskera att fastna. För att undvika dragningar i linan då inseminationsutrustningen fördes in organen veks linan dubbel.



Figur 7. Pistolett laddad med metallstavar. Illustration: C. Ångström.

En rutinerad seminör deponerade sedan metallstavarna i en vald del av livmodern och markerade inseminationsplats på en schematisk skiss av en livmoder ej tillgänglig för ultraljudsoperatörerna (figur 8). Organet lyftes sedan försiktigt ned i vattenbad och undersöktes med ultraljud av två ultraljudsoperatörer, med lång respektive kort erfarenhet av ultraljudsundersökningar. Efter metallföremålet identifierats och bedömts med avseende på lokalisering markerades detta på en likadan schematisk skiss som seminören markerat deponeringsplats på. Seminörens och ultraljudsoperatörens markeringar jämfördes sedan för att se om de överensstämde med varandra. Störst vikt lades vid att med hjälp av ultraljudet kunna urskilja om deponering i verkligheten skulle ha varit godkänd, det vill säga att den skett i livmodern och inte utanför (cervix). Utöver det bedömdes även läget inuti livmodern (corpus, höger horn eller vänster horn). Efter försöket klipptes några organ upp för att undersöka om proceduren orsakat några mekaniska skador i könsvägarna.



Figur 8. Schematisk skiss av en livmoder. Seminörens markering till vänster och ultraljudsoperatörens markering till höger.

Försök på levande djur

Försöket på levande djur utfördes enligt samma procedur som organförsök II. De djur som användes var tio undervisningskor av raserna SRB och SLB. Rena, desinficerade metallstavar användes till varje ko. Efter inseminationen undersöktes korna rektalt med ultraljud för bedömning av deponeringsplats. Efter undersökningen drogs stavarna ut med hjälp av nylonlinan. Utifrån resultatet beräknades metodens specificitet, sensitivitet och exakthet.

RESULTAT

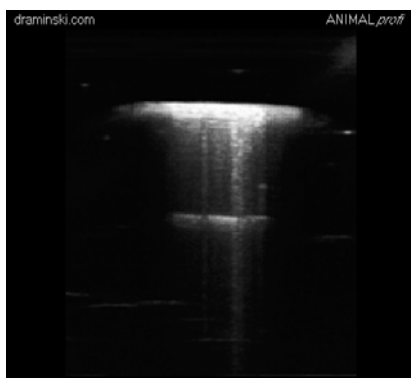
Inledande försök

Metallföremålen syntes tydligt på ultraljudsbilden och gav även upphov till kometliknande, starkt reflekterande artefakter (figur 9 och 10). Glaspärlorna gav också tydliga artefakter men var i sig inte så utmärkande i bilden. De uppmätta intensitetsvärdena ses i tabell 1.

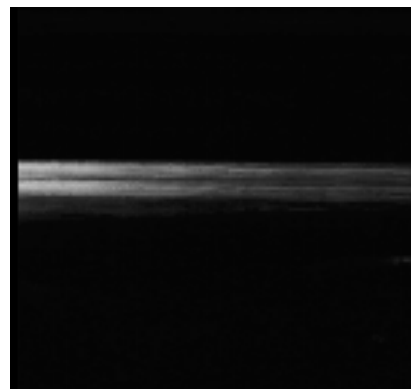
Tabell 1

Försöksmaterial	Intensitet %
Släta metallstavar	51
Räfflade metallpärlor	73
Kulkedja	38
Glaspärlor	29
Tom payette (luft)	99
Vattenfylld payette	18
Payette med kontrastmedel	99
Payette med glidslem	36
Payette med paraffinolja	25
Kometeffekt*	98
Vattnet i vattenbadet	2
Kanten av payetten	70

**Intensitetsvärdet av den kometliknande artefakt som i vissa vinklar uppstod från metallföremålen samt glaspärlorna.*



Figur 9 . Släta metallstavar med kometeffekt.



Figur 10 . Payette fylld med vatten.

Organförsök I

Föremålen i metall syntes mycket tydligt vid ultraljudsundersökningen. Synbarheten var god både då metallföremålen var placerade i cervix och inne i livmodern. Glaspärlorna syntes lite sämre än metallföremålen och fastnade ibland

i pistoletten vid inläggningen. Även nylonlinan som var fäst i föremålen kunde ibland ses i ultraljudsbilden som en vit linje.

De flytande produkterna var lätta att deponera men flöt snabbt ut inuti organen vilket gjorde dem svåra att både identifiera och lokalisera.

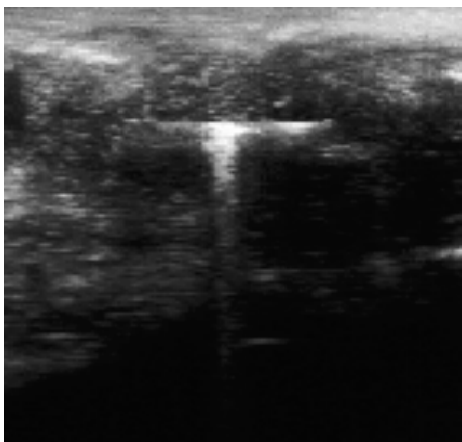
Det föremål som fungerade bäst ur aspekterna synbarhet med ultraljud, hanterbarhet och livsmedelssäkerhet var metallstavarna.

Organförsök II

Exempel på metallstavarnas synbarhet livmodern ses i figur 11 och 12. Resultatet av organförsök II redovisas i tabell 2 nedan.

Tabell 2

Organnummer	Deponeringsplats	Läge bedömt med ultraljud	Korrekt bedömning av godkänd deponering
1	Vänster horn	Vänster horn	Ja
2	Corpus	Corpus	Ja
3	Höger horn	Höger horn	Ja
4	Corpus	Corpus	Ja
5	Cervix	Cervix	Ja
6	Cervix	Cervix	Ja
7	Mitten av höger horn	Höger horn nära corpus	Ja
8	Corpus	Corpus	Ja
9	Cervix	Cervix	Ja
10	Vänster horn nära corpus	Corpus	Ja



Figur 11. Metallstavar i cervix.



Figur 12. Metallstavar i corpus.

Försök på levande djur

Resultatet av försöket redovisas i tabell 3. Två exempel på ultraljudsbilder av metallstavar och nylonlina ses i figur 13 och 14 nedan.

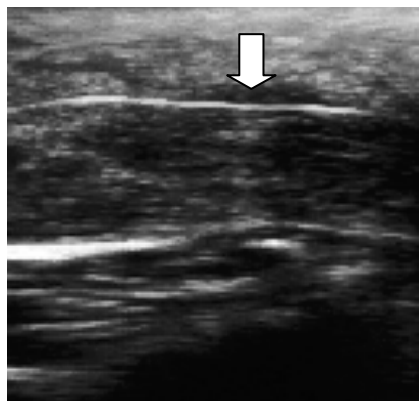
Två av korna, 1182 och 1445, var enligt seminören svårinseminerade, vilket medförde att platsen för deponering inte var helt säker.

Tabell 3

Djur-id	Deponeringsplats	Läge bedömt med ultraljud	Korrekt bedömning av godkänd deponering
1189	Corpus	Höger horn nära corpus	Ja
1182	Vänster horn nära corpus	Mitten av höger horn	Ja
1476	Cervix	Cervix	Ja
1445	Corpus	Corpus	Ja
1349	Cervix	Corpus	Nej
1346	Corpus	Höger horn nära corpus	Ja
1327	Höger horn	Vänster horn	Ja
1421	Cervix	Vänster horn	Nej
1395	Cervix	Cervix	Ja
1289	Corpus	Vänster horn nära corpus	Ja



Figur 13. Metallstavar i höger horn med kraftiga reflektioner.



Figur 14. Linan synlig i cervix (pil).

Sensitiviteten (sannolikheten för korrekt identifiering av en korrekt deponering (dvs. i livmodern)), specificiteten (sannolikheten för korrekt identifiering av en felaktig deponering (dvs. i cervix)) och exaktheten (metodens förmåga att utföra en korrekt identifiering av deponeringsplats) var i försöket 100 % (6/6), 50 % (2/4) och 80 % (8/10) respektive.

Varken vid organförsöket eller vid försöket på levande djur kunde vi upptäcka att metoden orsakar några mekaniska skador i livmodern.

RESULTAT

Syftet med den här studien var att hitta ett hjälpmedel för att åskådliggöra inseminationsplats i livmodern på levande kor med hjälp av ultraljudsteknik. För att nå det slutliga försöket med levande kor utvärderades först olika material och medier i flera steg med ultraljud i vattenbad samt i slaktorgan. I detta försök användes dels flytande medier av den typ som är tillåtet att använda på produktionsdjur och dels olika typer av metallföremål av typen bijouterier av lämplig dimension för en mediumpistolett.

Generellt sett var alla testade metallföremål lätta att lokalisera i vattenbad och organ eftersom de gav upphov till starka reflektioner i ultraljudsbilden. Den subjektiva bedömningen av synbarheten stämmer också väl överens med den objektiva test som gjordes beträffande ljusintensiteten i bildbehandlingsprogrammet (tabell 1). Vid tolkningen av de fyllda payetterna i vattenbad måste emellertid hänsyn tas till att ultraljudsbilden inte bara återger innehållet i payetten utan även plasten som payetten består av, vilket förväntas ge ökad ekogenitet till mediet. Trots inverkan av plasten kunde flytande innehåll (vatten, glidslem och paraffinolja) tydligt urskiljas vid tolkningen av bilderna. De uppmätta värdena på intensiteten pekade även de på att plasten tycktes ha liten påverkan på ultraljudsbilden.

Rent teknisk fungerade de släta metallstavarna bäst tillsammans med inseminationsutrustningen eftersom de hade minst tendens att fastna i mynningen på plaststrumpan. Glaspärlorna var svårare att hitta i organen än metallföremålen men då ultraljudsproben riktades i vissa vinklar mot dem kunde även de ibland ge starka reflektioner. De flytande medierna var lätta att deponera men flöt snabbt ut inuti organen, vilket gjorde dem svåra att både identifiera och lokalisera. Därför tycks varken glidslem eller paraffinolja vara särskilt användbart i det här sammanhanget.

I organförsök nr II var det i stort sett full överensstämmelse i deponeringsplats mellan seminör och ultraljudstekniker (Tabell 2). På organ gick det mycket bra att bedöma exakt deponeringsplats i livmodern, till skillnad från i levande djur då det var mycket svårare att säkert avgöra läget. Detta beror på att man vid organestet hade hjälp av att se probens läge på organet.

På det levande djuret var det större chans att avgöra en rätt deponering (sensitivitet = 100) än att avgöra en felaktig deponering (specificitet = 50). I detta försök använde vi för få kor för en definitiv bestämning av dessa mått. Men våra försök indikerar att ekogena strukturer av okänd natur i livmodern kan leda till att man tidigt förleds att lägga metallstavens läge till livmodern och underlåter att undersöka hela organet. Som ultraljudsoperatör är det därför viktigt att man konsekvent enligt fastställd procedur undersöker hela könsapparaten i ordningen vagina-cervix – corpus – livmoderhorn. Vid flera ekogena strukturer är det viktigt att man undersöker och jämför deras ljusintensitet. Man kan i vissa fall ha hjälp av att identifiera nylonlinan (figur 14).

För att erhålla goda dräktighetsresultat är det viktigast att kunna avgöra om deponering har skett i livmodern eller inte, eftersom chansen för dräktighet är störst då deponeringen sker någonstans i livmodern (corpus alt. livmoderhorn)

kontra i cervix. Av den anledningen lades störst vikt vid att kunna bedöma om deponeringen skett i livmodern eller i cervix. I det avseendet fungerade metoden relativt väl även på levande djur. I utbildningssyfte kan det emellertid vara till nytta att kunna få en mer exakt bedömning (vilket livmoderhorn, corpus eller cervix etc.), för att kunna förbättra sin teknik. Bedömningen av metallstavarnas läge skedde via bilden på ultraljudsmonitorn i kombination med det som kunde palperas rektalt under proben. Denna sammanvägning krävs ofta på grund av att det enbart med ultraljud är svårt att kunna lokalisera corpus.

Vad gäller de olika stegen i den här studien finns det ett antal felkällor som bör nämnas. Bedömningen av synbarhet i de olika stegen har framförallt varit subjektiv. I det inledande försöket kompletterades bedömningen med en enkel mätning av ljusintensitet i ett bildbehandlingsprogram för att kunna erhålla jämförbara numeriska värden. Vid analysen måste dock det område i bilden som ska mätas anges, vilket gör att metoden förlorar något i objektivitet.

Vid organförsöken förelåg en viss risk att det som deponerats ändrade läge inuti livmodern vid förflyttningen ner i vattenbadet. Under organförsöken och kanske framförallt i samband med försöken på levande djur var det viktigt att tänka på att undvika kontakt med nylonlinan så att deponeringsläget inte förändrades. Med tanke på att linan veks dubbel då metallstavarna laddades i pistoletten, fanns en liten, potentiell risk att den extra biten lina, ca 2,5 cm, skulle medföra att metallstavarna kunde glida iväg en aning från deponeringsplatsen.

Den omständighet som hade störst inverkan på resultatet i försöken på levande djur var den stora individuella variationen mellan korna. Hos vissa kor fanns strukturer inuti livmodern som uppvisade stark ekogenitet och gav artefakter som var förvillande lika metallstavarna. De kor som hade stora, fyllda urinblåsor, försvårade ultraljudsundersökningen på så vis att livmodern hade en tendens glida runt ovanpå urinblåsan. Två av korna var av olika anledningar svåra att inseminera, vilket medförde att seminören inte kunde vara helt säker på exakt deponeringsplats. Flera av korna var dock lättundersökta och oproblematiske att inseminera samt gav tydliga ultraljudsbilder utan störningar. För att undvika felkällor som härrör i den individuella variationen hos korna skulle det ha varit lämpligt att välja djur ur den lättundersökta gruppen och upprepa de olika deponeringsförsöken enbart på dessa individer. Nackdelen är naturligtvis risk för ökat slitage i tarmen, speciellt om det är frågan om träning av helt orutinerade seminörelever.

Förslag på förbättringar av metoden skulle kunna vara att tillverka en slät metallstav i ett stycke, med en diameter på 2-3 mm och längd strax över en centimeter. I ena änden på metallstaven gjuts en ståltråd in så att den bildar en liten ögla som går att fästa en lina i. Alternativt att fästansordningen är integrerad i formen som staven tillverkas i. Huvudsaken är att fästansordningen inte sticker ut, så att staven kan förflyttas smidigt ut ur pistolett och plaststrumpa, samt genom kons könsvägar. I det utförda försöket var det vid ett par tillfällen svårt att dra ut metallstavarna ur cervix, detta hade sannolikt att göra med att öglan på hattnålen var lite för hög på dessa exemplar och därför hade böjt sig en aning. En alltför stor ögla orsakade även att metallstavarna ibland fastnade i mynningen på plaststrumpan trots att denna var vidgad. Vidare skulle änden på pistongen kunna modifieras till en större diameter så att den inte hamnar på sidan om metallstaven

när den skjuts in, vilket kan orsaka att även metallstaven hamnar snett och fastnar i mynningen på plaststrumpan. Om man gör dessa förändringar borde det inte vara några problem att ladda metallstaven med öglan vänd inåt, vilket är det enklaste sättet att ladda på. Laddar man på det viset blir det även ett litet stycke lina till godo som gör att man undviker dragningar i lina i samband med att pistoletten förs in. Plaststrumporna bör även förändras så att mynningen blir lagom stor för att låta metallstaven passera utan problem. Att modifiera plaststrumporna en i taget inför övning är både tidskrävande och tveksamt ur hygienisk aspekt.

Slutsatser

Våra resultat pekar på att identifiering med ultraljud av inseminerade metallstavar mycket väl skulle kunna användas som hjälpmedel i samband med seminträning. Den främsta begränsningen i metoden ligger i att den kräver en rutinerad ultraljudsoperatör. Det behövs även förbättringar i utformningen av utrustningen och metallföremålet för att metoden ska vara praktisk och användbar i utbildningsverksamheten.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Beal, W. E., Edwards, R. B., Kearnan, J. M. (1989) Use of B-Mode, Linear Array Ultrasonography for evaluating the Technique of Bovine Artificial Insemination. *Journal of Dairy Science* 72, 2198-2202.
- Einarsson, Stig *et al.* (1987) *Artificiell insemination och reproduktion*. Meddelande nr 149 Svensk Husdjurskötsel ek.för. Hållsta, Eskilstuna. 13-14, 23-24, 78, 81-82.
- Gallagher, G. R., Senger, P. L. (1989) Concentrations of Spermatozoa in the Vagina of Heifers after Deposition of Semen in the Uterine Horns, Uterine Body or Cervix. *Journal of Reproduction and Fertility* 86, 19-25.
- Goddard, P. J. (1995) *Veterinary Ultrasonography*. Cambridge: Cab international. 4-6.
- Gustafsson, Hans (2006) *Handledning i insemination av nötkreatur för djurägare*. Kompendium, Svensk Mjölk. 8-9, 11-12, 17, 19-21.
- Hafez, E. S. E. & Hafez, B. (2000) *Reproduction in Farm Animals*. 7ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins. 164
- Howells, H. M. J., Davies, D. A. R., Dobson, H. (1997) Do-It-Yourself Artificial Insemination: The Influence of the Number of Training Days Spent in an Abattoir with Access to Live Cows. *Cattle Practice* 5, 381-385.
- Hunter, R. H. F. (2003) Advances in Deep Intrauterin Insemination: A Fruitful Way Forward to Exploit New Sperm Technologies in Cattle. *Animal Reproduction Science* 79, 157-170.
- Kealy, Kevin J. & McAll, Hester (2005) *Diagnostic Radiology & Ultrasonography of the Dog and Cat*. 4ed. St. Louis, MO: Saunders Elsevier. 8-9, 19.
- Larsson, Birgitta (2009) *Nötkreaturens Reproduktion*. Kompendium, Avdelningen för reproduktion, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU. Kap 4.
- López-Gatius, F. (2000) Site of Semen Deposition in Cattle: A Review. *Theriogenology* 53, 1407-1414.
- McPherson, J.W. (1968) Semen Placement Effects on Fertility in Bovines. *Journal of Dairy Science* 51(5), 807-808.
- Mills, Lisa D., Butts, Christy (2009) Capturing Elusive Foreign Bodies With Ultrasound. *Emergency Medicine* [online] 41(6), 36. Tillgänglig: < <http://www.emedmag.com/html/pre/uce/uce/041060036.asp> > [2010-09-24]
- Momont, H. W., Seguin, B. E., Singh, G., Stasiukynas, E (1989) Does Intrauterine Site of Insemination in Cattle Really Matter? *Theriogenology* 32(1), 19-26.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (2009) *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 9ed. Edinburgh: Saunders Elsevier. 767-768.
- Nyland, Thomas G. & Mattoon, John, S. (2002) *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. 2ed. Philadelphia, PA: Saunders. 10-12.
- Peters, J. L., Senger, P. L., Rosenberger, J. L., O'Connor M. L. (1984) Radiographic Evaluation of Bovine Artificial Inseminating Technique among Professional and Herdsmen-inseminators Using .5- and .25-ml French Straws. *Journal of Animal Science*, 59(6), 1671-1683.
- Statens jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet med nötkreatur (SJVFS 2004:41 Saknr M 26).
- Svensk Mjölk. (2009/2010) Redogörelse för husdjursorganisationens djurhälsovård.

Svensk Mjök (2010) Seminstatistik [online] Tillgänglig:

< <http://www.svenskmjolk.se/Mejerimarknad/Seminstatistik/> > [2010-09-13]

Williams, B. L., Gwazdauskas, F. C., Whittier, W. D., Pearson, R. E., Nebel, R. L. (1988)
Impact of Site of Inseminate Deposition and Environmental Factors That Influence
Reproduction of Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 71, 2278-2283.