



Sveriges Lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och Husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Utvärdering av kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) hos friska hästar

Kristin Alvarsson

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697, Löpnr: 2011:62
Examensarbete 2011*

Utvärdering av kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) hos friska hästar

Kristin Alvarsson

Handledare: Johan Bröjer, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för Kliniska Vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och Husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 22,5 hp*

Nyckelord: Insulinresistens, Ekvint Metaboliskt Syndrom, Fång, CGIT, Kombinerat glukos- och insulintoleranstest

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697, löpnr: 2011:62
Examensarbete 2011*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
ABSTRACT	2
INLEDNING	3
Tester	3
<i>Fasteprovinsulin och fasteprovglukos</i>	3
<i>Dynamiska tester</i>	4
<i>Oralt glukostoleranstest (OGTT)</i>	4
<i>Intravenöst glukostoleranstest (IVGTT)</i>	4
<i>Insulintoleranstest (ITT)</i>	4
<i>Kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT)</i>	5
SYFTE	6
MATERIAL OCH METODER	6
Experimentell design	6
Hästar	6
Utförande	8
Blodanalyser	9
Dataanalys	10
RESULTAT	10
DISKUSSION	15
KONKLUSION	17
KÄLLFÖRTECKNING	18

SAMMANFATTNING

Insulinresistens hos hästar har i senare tids forskning visat sig ha stor betydelse för hur benägen en häst är att utveckla sjukdomen fång. Fång är en mycket smärtsam sjukdom för hästen och den skördar ett stort antal dödsoffer varje år. Insulinresistens är en komponent i Ekvint Metaboliskt Syndrom (EMS), som är en relativt nyupptäckt sjukdom (introducerades inom veterinärmedicinen 2002). Förutom insulinresistens kännetecknas hästar med ekvint metaboliskt syndrom av fetma (generell eller lokal) och att de har lättare för att utveckla fång än andra hästar. För att kunna ställa diagnosen insulinresistens och EMS finns ett flertal metoder. Den idag mest betrodda metoden är ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT). I denna studie har en utvärdering av detta test utförts, dels med fokus på testets reproducerbarhet och dels för att undersöka om det finns någon betydande rasvariation.

I försöket ingick 18 kliniskt friska hästar (nio svenska varmblodstravare och nio islandshästar). Samtliga individer fick genomgå ett CGIT två gånger vardera, med 3 veckors intervall. Samtliga individer genomgick försöket i sin hemmiljö som eftersträvades att hållas så konstant som möjligt, vilket även gjordes vad gäller foder och hästarnas hull.

Studien visar att reproducerbarheten hos ett CGIT vid avläsningen av glukoskurvan (koncentrationen av plasmaglukos) är för dålig för att helt kunna lita på slutresultatet. Reproducerbarheten visade sig vara sämst vid de tidpunkter då glukoskurvan läses av för att ställa diagnosen insulinresistent eller inte (tidpunkter omkring 45 minuter efter glukos- och insulininfusion). Reproducerbarheten för avläsning av koncentration plasmainsulin i blodet hos ett CGIT (avläsning för vilken tidpunkt som hästens insulinkurva når en koncentration av 100 mU/l, DIK₁₀₀), visade sig vara mycket god vid de kliniskt relevanta tidpunkterna. Vid undersökning av eventuell skillnad i hur olika raser svarade på CGIT visade det sig att islandshästarna signifikant skiljer sig från varmblooden i glukoskurvan. Det tar betydligt längre tid för islandshästarna att skära sin baslinje än vad det gör för varmbloodstravarna. Det förekom ingen skillnad mellan de båda raserna vad gäller insulinkurvans utseende i ett CGIT.

Slutsatsen blir att det inte är en godtagbar och säker metod att använda 45 minuter efter glukos- och insulininfusion som parameter vid avläsning av glukoskurvan hos ett CGIT. Detta eftersom reproducerbarheten hos testen vid denna tidpunkt är för stor. Att använda insulinkoncentrationen vid avläsningen av ett CGIT tycks, enligt denna studie, vara mer lovande då reproducerbarheten i de kliniskt relevanta tidpunkterna (DIK₁₀₀) är mycket goda. Dock krävs större studier (både på friska och på insulinresistenta hästar) för att säkerställa detta. Studien har också visat på en betydande rasvariation vad gäller glukoskurvan i ett CGIT, varför det är felaktigt att tolka en glukoskurva i ett CGIT hos en islandshäst på samma sätt som för en varmbloodstravare. För att testet skall kunna vara tillförlitligt måste en parameter med bättre reproducerbarhet fastställas, rasvariationen måste utvärderas djupare och avläsningen av testet måste rasanpassas för att kunna ge rättvisande resultat.

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) has in recent studies been shown to be associated with laminitis in horses. Laminitis is a very painful condition and reaps a large number of victims every year. Insulin resistance is one component of the Equine Metabolic Syndrome (EMS), a relatively newly discovered disease (introduced in veterinary medicine in 2002). Apart from insulin resistance horses with Equine Metabolic Syndrome are characterized by obesity (general or localized) and develop laminitis easier than other horses. There are several methods to diagnose IR and EMS. The most trusted method today is a combined glucose and insulin tolerance test (CGIT). The object of the study was to evaluate the inter day variation and breed differences of calculated variables derived from the CGIT glucose and insulin curves in horses.

In the study, 18 clinically healthy horses (nine Swedish Standardbreds and nine Icelandic horses) participated. All horses underwent the CGIT on two occasions, with three weeks between the tests. All horses underwent the study in their home environment, which was kept as constant as possible. The study shows that the inter day variation of the CGIT glucose curve and the calculated values obtained from the curve such as the positive phase duration (PFD_{glu}), are not sufficient to yield reliable results for a diagnosis of IR. On the other hand, the inter day variation of the CGIT plasma insulin curve and the time point when the horse's insulin curve reached a concentration of 100 mU/l (DIK_{100}), gave results with high reproducibility.

There was an effect of breed on the CGIT glucose curve but not on the insulin curve.. It took significantly longer time for the Icelandic horses' glucose curve to cross the base line of resting glucose concentrations compared to the Standardbreds.

In conclusion, when the CGIT is used as a diagnostic test to evaluate insulin resistance, the patient is considered to be insulin resistant when the $PFD_{glu} > 45$ min or the insulin concentration > 100 mU/L at 45 min. However, the large CV for PFD_{glu} in the present study suggests that normal or impaired insulin sensitivity should not be defined solely on this parameter.

The study has also demonstrated a considerable variation between results obtained from the CGIT glucose curve for different breeds (Standardbreds vs Icelandic horses) suggesting the importance of different reference values for different breeds.

INLEDNING

Benämningen ekvint metaboliskt syndrom (EMS) introducerades till veterinärmedicinen år 2002 av Johnson. Johnson ansåg att fetma, insulinresistens och fång var gemensamma komponenter hos ett kliniskt syndrom bland hästar och ponnyer. Dessa hästar beskrivs ofta vara ”lättfödda” av sina ägare och kan klara sig på ett lägre antal kalorier utan att tappa i vikt. Ponnyraser, Morganhästar och Paso Finos är exempel på raser som har lättare att utveckla EMS. Hålls hästarna på ett korrekt sätt och med en korrekt diet kan sjukdomens inträdande i stor utsträckning förhindras. Överutfodring, riklig tillgång till gräs (bete) och bristande motion är tre faktorer som har stor betydelse för om en häst utvecklar EMS eller inte. Hästar med insulinresistens löper en större risk att utveckla fång (Frank, 2009; Frank, *et al.*, 2010; Raymond, 2008; Harris *et al.*, 2006).

Majoriteten av hästar med EMS inkluderar följande fenotyper:

- Fettdepåer lokaliserade till särskilda områden (till exempel omkring nackligamentet, ovanför svansfästet, bakom skuldrorna och i juverregionen hos ston) eller generell fetma
- Insulinresistens
- Predisponering att utveckla fång som kan vara både av klinisk eller subklinisk form

Diagnosen EMS kan ställas genom en kombination av en för syndromet typisk historia (ofta en bakgrund involverande fång), en klinisk undersökning (som inkluderar att man undersöker om regionala fettdepåer eller generell fetma förekommer) och att man kan detektera insulinresistens hos hästen (Frank *et al.*, 2010).

Tester

För att kunna ställa diagnosen EMS bör man således kunna påvisa insulinresistens hos individen. Nedan visas exempel på vilka tekniker som idag används kliniskt för att diagnosticera insulinresistens hos hästar (Firshman *et al.*, 2007; Frank, 2009).

Fastprovinsulin och fastprovglukos

Genom att mäta plasmakoncentrationen av glukos och insulin i blodet på fastande häst kan en indikation erhållas om hästen faller inom ramen för vad som är normalt eller om misstanke för insulinresistens föreligger. Metoden är enkel och överlägset snabbast, men har inte så hög säkerhet (Firshman *et al.*, 2007., Frank *et al.*, 2010). Det är relativt få insulinresistenta hästar som lider av hyperglykemi. Konstant hyperglykemi uppstår framförallt när insulinresistensen har pågått under en längre period (och eventuell pankreasinsufficiens har utvecklats). Hyperinsulinemi är dock relativt vanligt hos en insulinresistent häst eftersom bukspottkörtelns insulinsekretion ökar för att kompensera den minskade känsligheten mot insulin som råder ute i hästens vävnader. Det finns tre situationer där detta test inte ger oss korrekt information; (1) hästar som är stressade och/eller upplever smärta (till exempel om den har pågående fång), (2) vid tillfällen där insulinresistensen är mild och insulinkoncentrationerna då hamnar inom referensmarginalen, och (3) när en insulinresistens har pågått så länge att en pankreasinsufficiens har utvecklats. Hos hästar med en fasteglukoskoncentration > 6,1 mmol/l

och/eller fasteinsulinkoncentration > 20 mU/l kan insulinresistens misstänkas (Firshman *et al.*, 2007; Frank, 2009; Frank *et al.*, 2010).

Dynamiska tester

Dynamiska tester anses vara säkrare på att detektera insulinresistens då den nedsatta vävnadskänsligheten för insulin eventuellt endast blir uppenbar då hästen är hyperglykemisk (Frank *et al.*, 2010). Om en häst med stark insulinresistensmisstanke har normala fastevärden på plasmainsulin och glukos bör hästen genomgå ett dynamiskt test för att få mer information (Firshman *et al.*, 2007; Frank, 2009; Frank *et al.*, 2010). Nedan beskrivs de i praktiken vanligaste dynamiska testerna för att detektera insulinresistens:

Oralt glukostoleranstest (OGTT)

Det orala glukostoleranstestet (OGTT) går ut på att hästen som skall provtas fastar över natten. Följande morgon tas blodprover för analys av glukos vid 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, och 360 minuter efter tillförsel av glukos (1 g/kg kroppsvikt) via en nässvalgsond. Hos en frisk häst bör en topp i glukoskoncentration i blodet ses vid 90-120 min efter glukosgiva och blodglukosvärdet skall vara nere på basnivå efter 4-6 timmar (Kaneko, 1989; Ralston, 2002; Firshman *et al.*, 2007). En minskad glukosrespons kan tyda på försenad magsäckstömning, reducerad tarmabsorption eller ökad insulinkänslighet. En större glukosrespons än normalt kan tyda på en reducerad pankreasfunktion eller insulinresistens (Ralston, 2002).

Intravenöst glukostoleranstest (IVGTT)

I ett intravenöst glukostoleranstest (IVGTT) ges glukos intravenöst varför ingen hänsyn behöver tas till variation gällande mag-tarmsystemet (Kronfeld *et al.*, 2005). Hästen som skall genomgå försöket skall hållas fastande i 12-24 timmar innan glukosinjektionen samt under själva försöket. Via en intravenös kateter ges 0,5 g glukos/kg kroppsvikt. Prover för analys av glukoskoncentration i blodet tas vid 0, 5, 15, 30, 60, 90 minuter samt därefter en gång varje timme under 5-6 timmar efter injektion. En frisk häst skall omedelbart öka i blodglukos och nå en topp i blodglukoskoncentration vid 15 minuter efter injektion och därefter gå ned till sitt individuella basalvärde inom en timme (basalvärdet, nollprovet, tas innan glukosinfusionen och på fastande häst). En häst med insulinresistens får en topp i blodglukoskoncentration efter cirka 30 minuter efter glukosinjektion (Garcia *et al.*, 1986; Ralston, 2002; Firshman *et al.*, 2007). Med hjälp av detta test kan även en halveringstid för glukos beräknas (Kaneko, 1989).

Insulintoleranstest (ITT)

Ett insulintoleranstest (ITT) mäter hur hästens blodglukoskoncentration svarar på en insulininjektion. Insulindosen som administreras varierar i olika studier mellan 0,2-0,6 iu/kg kroppsvikt. Normalt (beroende på insulindosen) skall glukosvärdena sjunka 50 % av basvärdet inom 20-30 minuter för att sedan återgå till basvärdet vid 1,5-2 timmar efter insulininjektionen (Firshman *et al.*, 2007; Kaneko, 1989).

Kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT)

Det kombinerade glukos- och insulintoleranstestet (CGIT) är det idag mest använda dynamiska testet för att diagnosticera insulinresistens. CGIT är i grunden en kombination av IGTT och ITT. Detta test gör det möjligt att följa hur den tillförda mängden glukos och insulin metaboliseras i kroppen. Inför testet skall hästarna vara fastade från och med kvällen före, dock får de ha fri tillgång till vatten. Innan testet startas tas blodprover för att få ett nollvärde (ett basvärde) på hästarnas glukosvärde. Nollvärdet kommer sedan att utgöra en så kallad baslinje, som är av stor vikt vid avläsning av själva testet. Glukos i doseringen 150 mg/kg (50 % lösning) injiceras intravenöst varefter blodprover (för analys av glukos) tas efter 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 och 150 minuter. När analyserna är gjorda matas resultaten in i ett grafprogram och man kan med hjälp av de kurvor som ritas se när hästens glukoskurva korsar sin baslinje. Om hästen skär sin baslinje inom 45 minuter anses hästen ha normal insulinkänslighet (inte insulinresistent). Ett annat alternativ är att även analysera insulinkoncentrationen vid blodprovstagningarna och se om insulinkoncentrationen är över 100 mU/l vid 45 minuter. Om hästens glukoskurva korsar sin baslinje efter 45 minuter eller har en insulinkoncentration över 100 mU/l vid 45 minuter klassas den som insulinresistent (Frank, 2011; Frank *et al.*, 2010; Frank, 2009).

Generellt anses de dynamiska testerna mer tillförlitliga, och CGIT är den mest betrodda metoden eftersom både hästens glukos- och insulinsvar kan studeras i detta test (Frank *et al.*, 2010; Firshman *et al.*, 2007; Eiler *et al.*, 2005). Gemensamt för de dynamiska testerna är att det saknas tillförlitliga studier på reproducerbarhet och säkra utvärderade avläsningsparametrar. I en studie av Eiler och medarbetare (2005) utfördes CGIT på sex friska ston (utan tecken på insulinresistens). Samtliga hästar i studien fick genomgå testet tre gånger med två veckors intervall. Resultatet visade på en bra reproducerbarhet hos fyra av de sex kliniskt friska hästarna. Varför de övriga två hade en avvikande reproducerbarhet framgår inte.

I den enda studie där reproducerbarheten hos CGIT har studerats har det inte tagits hänsyn till reproducerbarheten i varje enskild provtagningstidpunkt (Eiler *et al.*, 2005). Istället har hela glukoskurvans reproducerbarhet studerats. Att endast studera reproducerbarheten hos hela glukos- eller insulinkurvan säger inte så mycket om testets reproducerbarhet då det i teorin kan vara så att spridningen vid upprepade tester hos samma individ (variationen mellan testomgångar) är mycket stor vid de provtagningstillfällena, som är mest kliniskt relevanta (tidpunkter runt 45 minuter). Om reproducerbarheten är mycket låg vid vissa provtagningstidpunkter (i sämsta fall de mest kliniskt relevanta) och mycket god vid andra tidpunkter kan glukos- eller insulinkurvans sammantagna reproducerbarhet bli relativt bra. Testet kan på detta vis anses ha en god reproducerbarhet trots en låg reproducerbarhet kring de kliniskt relevanta tidpunkterna. Om reproducerbarheten är låg vid de kliniskt relevanta tidpunkterna (tidpunkter runt 45 minuter) hos glukos- och insulinkurvan vid CGIT innebär det en stor risk för att en felaktig diagnos ställs.

Studien rörande reproducerbarheten hos CGIT har varit på ett för lågt antal individer för att vara tillförlitlig. Det saknas också studier på om det finns rasvariationer som påverkar tolkningen av CGIT, vilket är av stor relevans då ponnyer har naturligt nedsatt

insulinkänslighet jämfört med många större hästraser (Jeffcott *et al.*, 1986). Då ponnyer i grunden har en lägre insulinkänslighet finns misstankar om att de felaktigt skulle klassas som insulinresistenta vid användandet av dynamiska tester.

SYFTE

Då insulinresistens är en vanlig orsak till att hästar idag utvecklar fång är det av stor vikt att hitta ett tillförlitligt sätt att kunna diagnosticera insulinresistens. Syftet med denna studie var att studera reproducerbarheten av CGIT hos kliniskt friska hästar och jämföra resultaten av CGIT mellan två olika raser, kliniskt friska svenska varmblodstravare och kliniskt friska islandshästar.

MATERIAL OCH METODER

Försöket ägde rum under våren 2011 och var godkänd av centrala försöksdjursnämnden, diarienummer C27/11 Uppsala djurförsöksetiska nämnd.

Experimentell design

För att undersöka och utvärdera rasvariationen hos CGIT utfördes försöket på två olika hästraser: islandshästar och svenska varmblodstravare. Varje rasgrupp innehöll nio kliniskt friska individer. Varje häst undersöktes kliniskt kvällen innan försökstillfällena. För att ytterligare minimera risken att en icke frisk häst skulle genomgå försöket togs även fasteglukos samt fasteinsulinvärden för varje häst i god tid innan försöket ägde rum. Detta skulle ge en möjlighet att kunna utesluta en häst om den visade sig ha avvikande värden. Då syftet med studien bland annat var att undersöka reproducerbarheten hos CGIT fick samtliga hästar genomgå ett CGIT två gånger var, med tre veckors intervall. På så vis testades totalt 18 individer två gånger vardera, vid två olika tillfällen. Vid andra försökstillfället gjordes en förlängning av försöket (195 minuter istället för 150 minuter) för att på ett bättre sätt kunna utvärdera eventuella rasskillnader då islandshästarnas glukoskurva inte återvände till baslinjen inom testets standardiserade provtagningstid på 150 minuter. Miljön och förhållandena runt omkring hästarna eftersträvades att vara så identiska som möjligt vid de båda försökstillfällena. Samtliga individer testades i sin hemmiljö.

Hästar

Varmblodstravarna

Försöksgruppen utgjordes av nio svenska varmblodstravare (två valacker och sju ston). Medelåldern på hästarna i försöket var 13 år (med en spridning på 6-20 år).

De varmblodiga travarna ägs av Institutionen för Kliniska Vetenskaper, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), där de verkar som försöksdjur inom institutionen. Detta innebär att hästarna är vana vid olika typer av provtagning. Hästarna utför normalt ingen form av motion annat än utevistelse i små rasthagar under dagtid. De utfodras med hö tre gånger om

dagen och kraftfoder en gång per dag. Under försöket stod varmblodstravarna uppstallade i sina boxar, vilket de är vana vid att göra.

Vid första försökstillfället var medelvikten hos varmblodstravarna 506 kg (429-586 kg) och vid det andra försökstillfället var medelvikten 505 kg (425-586 kg). Vid båda försökstillfällena bedömdes även alla hästar med avseende på *Body Condition Score*, BCS, (Henneke *et al.*, 1983) och *Cresty Neck Score*, CNS, (Carter *et al.*, 2008). Medelvärdet för BCS på de varmblodiga travarna var 5,2 (5-6) vid båda försökstillfällena och medelvärdet för CNS var 1,9 (1-2) vid båda försökstillfällena. Vid första försökstillfället hade varmblodstravarna en medelplasmaglukoskoncentration (fastevärde) på 4,4 mmol/l (3,4-5,0) mmol/l) och vid det andra försökstillfället var medelvärdet för plasmaglukoskoncentrationen 4,6 mmol/l (4,1-5,1 mmol/l). Medelplasmainsulinkoncentrationen i fasta var 8,4 mU/l (3,4-15,6 mU/l) i första försöksomgången och 7,2 mU/l (4,7-10,0 mU/l) i andra försöksomgången (tabell 1).

Islandshästarna

Försöksgruppen utgjordes av nio islandshästar (två valacker och sju ston). Medelåldern på islandshästarna var 13,6 år (10-18 år).

Islandshästarna ägs av ett företag som bedriver turridding och är således inte kopplat till SLU. Hästarna hålls normalt i lösdrift och rids i genomsnitt 4 dagar i veckan (0-5 dagar). Varje ridpass omfattar 1-1,5 timmar lättare ridning. Hästarna utfodras tre gånger om dagen med hösilage. Efter hårda ridpass får hästarna en extra fodergiva bestående av havre och betfor. Under försöket var islandshästarna uppstallade i sina boxar där de normalt vistas före och efter turridding.

Vid första försökstillfället hade islandshästarna en medelvikt på 379 kg (328-445 kg) och vid andra försökstillfället låg medelvikten på 381 kg (333-444 kg). På islandshästarna utfördes bedömning av BCS och CNS på motsvarande sätt som för varmblodstravarna. Medelvärdet på islandshästarna för BCS vid första försökstillfället var 5,9 (5-7) och vid andra försökstillfället var medelvärdet för BCS 5,7 (5-7). Medelvärdet för CNS var 2,7 vid första försökstillfället och 2,8 (2-3) vid andra försökstillfället. Vid första försökstillfället var islandshästarnas medelvärde för plasmaglukoskoncentrationen (fastevärde) 4,3 mmol/l (3,8-5,0 mmol/l) och vid det andra försökstillfället 4,4 mmol/l (3,9-5,2 mmol/l). Plasmainsulinkoncentrationen i fasta var i medeltal 10,2 mU/l (4,7-16,2 mU/l) i första försöksomgången samt 12,9 mU/l (3-37,9 mU/l) i andra försöksomgången (se tabell 1).

Tabell 1. Grunddata för de 18 hästar (nio varmblodstravare och nio islandshästar) som deltog i ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) vid två försökstillfällena med tre veckors mellanrum.

Variabler	Varmblodiga travare (n=9)		Islandshästar (n=9)	
	Testomgång 1	Testomgång 2	Testomgång 1	Testomgång 2
Medelålder (år)	13,3 ± 4,6	13,3 ± 4,6	13,6 ± 2,7	13,6 ± 2,7
Vikt (kg)	506 ± 46,3	505 ± 47,7	379 ± 36,7	381 ± 34,7
BCS (1-9)	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,9 ± 0,8	5,7 ± 0,7
CNS (1-5)	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,3	2,7 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Fasteglukos (mmol/l)	4,4 ± 0,64	4,6 ± 0,29	4,3 ± 0,47	4,4 ± 0,47
Fasteinsulin (mU/l)	8,4 ± 4,45	7,2 ± 2,03	10,2 ± 4,17	12,9 ± 10,51

Medelvärde ± standardavvikelse på alla hästar som deltog i studien. Body Condition Score, BCS, bedöms enligt en skala på 1 (mager) – 9 (fet). Cresty Neck Score, CNS, bedöms enligt en skala på 0 (ingen palperbar vävnad ovanför nackbandet) – 5 (mankam så stor att den faller över på den ena sidan).

Utförande

Dagen före försöket

Dagen före försöket undersöktes hästarna kliniskt (med avseende på kroppstemperatur, cirkulation, respiration, tarmljud, digitalpuls och palperbara lymfknotor) för att minimera risken att en häst som inte var fullt frisk skulle ingå i försöket. Förutom klinisk undersökning vägdes och rakades samtliga hästar över varderas sidas jugularven. Detta gjordes dagen innan försöket ägde rum för att minimera alla tänkbara stresskällor, som skulle kunna ge missvisande resultat. Hästarna fick sin sista ranson med mat klockan 17 dagen innan försöket. Därefter var de fastande hela natten, dock hade de fri tillgång till vatten.

Försöksdagen

Samtliga hästar var fastande under hela försökets gång, men de hade fri tillgång till vatten.

På försöksdagens morgon applicerades EMLA-kräm¹ över området där de intravenösa katetrarna skulle placeras på samtliga hästar. När EMLA-krämen hade verkat i cirka 15 minuter påbörjades instrumenteringen. Området över jugularvenerna, som blivit rakat och fått EMLA-kräm påstruket, tvättades med hibiscrub varefter området sprittvättades och fick lufttorka. En kateter² placerades i vardera jugularvenen. Varje kateter fick en förlängning³ för att underlätta provtagning och infusioner. Katetrarna märktes tydligt upp (med färgkoder och text) så att provtagningskatetern inte skulle blandas ihop med infusionskatetern. Om dessa skulle förväxlas skulle värdena kunna bli mycket missvisande då det kan finnas spår av glukos och insulin kvar i själva infusionskatetern. Efter instrumenteringen togs fyra nollprover; vid 60, 40, 20 samt 2 minuter innan glukos- och insulininfusionen. Ett medelvärde av dessa fyra nollprover beräknades för varje enskild häst för att få en så representativ baslinje av plasmaglukos som möjligt.

¹ 25 mg/g, AstraZeneca AB, Södertälje, Sverige

² Intranule 2,0x105 mm, Vygon, Ecoen, Frankrike

³ Discofix, B. Braun Medical AG, Schweiz

CGIT-testet

Glukoslösning⁴ administrerades intravenöst under 45 sekunder varefter katetern snabbt sköljdes med fyra ml NaCl-lösning⁵. I samma kateter gavs därefter omedelbart insulininfusionen⁶, som var utspädd med tre ml NaCl. Doseringen av glukos och insulin kontrollerades för varje individ av tre olika personer innan den administrerades. Dosen beräknades genom följande formler:

Hästens vikt (kg) x (150 mg/kg) / (500 mg/ml) = ml 50 % glukoslösning

Hästens vikt (kg) x (0,1 IE/kg) / (100 IE/ml) = ml Humulin Regular

Efter glukos- och insulininfusionerna togs upprepade blodprover för analys av insulin och glukos vid 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, och 150 minuter. Vid försökstillfälle två gjordes en förlängning av försöket för att på ett mer tillförlitligt sätt kunna utvärdera den eventuella rasvariationen. Prover togs då vid 1, 5, 15, 25, 35, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 och 195 minuter. Samtliga blodprover togs genom provtagningskatetern. Innan varje prov togs aspirerades cirka åtta ml blod som sedan kastades. I möjligaste mån undveks turbulens i katetern. Efter varje provtagning spolades provtagningskatetern med 15 ml NaCl-lösning. När det sista blodprovet var taget avlägsnades katetrarna. Hästarna utfodrades och återgick därefter till normal verksamhet.

Blodanalyser

Samtliga prover överfördes omedelbart efter provtagningen till Litium-heparinrör⁷ och kylades snabbt ned med hjälp av isbad varefter de centrifugerades (906 g) inom fem minuter i kyla (+4 °C) under 10 minuter. Plasman överfördes till eppendorfrör och frystes ned till -80°C i väntan på analys av koncentration plasmaglukos samt plasmainsulin.

Vid de tidpunkter där hästarna misstänktes ligga extra lågt i glukos (35, 45, 60, 75 minuter), analyserades glukos på helblod med hjälp av en portabel glukometer för att snabbt kunna sätta in behandling vid behov.

För samtliga prover analyserades plasmaglukoskoncentrationen med automatisk analysator⁸. Analyserna utfördes inom en vecka på Akademiska sjukhusets klinisk-kemiska laboratorium⁹. Plasmainsulinkoncentrationen analyserades i duplikat med hjälp av ELISA¹⁰.

⁴ Glucose 500mg/ml, Fresenius Kabi AB, Uppsala, Sverige

⁵ 0,9 %, B. Braun Medical AB, Danderyd, Sverige

⁶ 0,1 IE/kg, HumulinRegular 100 IE/ml, Eli Lilly Sverige AB

⁷ BD Vacutainer, 10 ml, BD Plymouth PI 6, 78 P, Storbritannien

⁸ Architect ci8200, Abbott Scandinavia AB Diagnostics, Solna Sverige

⁹ Uppsala Akademiska sjukhus, Uppsala, Sverige

¹⁰ Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sverige

Dataanalys

Alla data sammanställdes och matades in i ett dataprogram¹¹. Kurvor för plasmaglukos- och plasmainsulinkoncentrationerna över tid utfärdades för samtliga individer. En baslinje för glukos beräknades som medelvärdet av de fyra nollproverna (60, 40, 20 och 2 min innan CGIT utfördes). Med hjälp av glukos och insulinkurvorna beräknades durationen när insulinkurvan, i minuter, når koncentrationen 100mU/l (DIK₁₀₀) samt vid vilken tidpunkt, i minuter, glukoskurvans positiva fas skär baslinjens plasmaglukoskoncentration (PFD_{min}). AUC_{ins} (area under kurvan för insulin) och AUC_{glu} (area under kurvan för glukos) beräknades med hjälp av trapetzoidmetoden genom kalkylering i ett dataprogram¹¹.

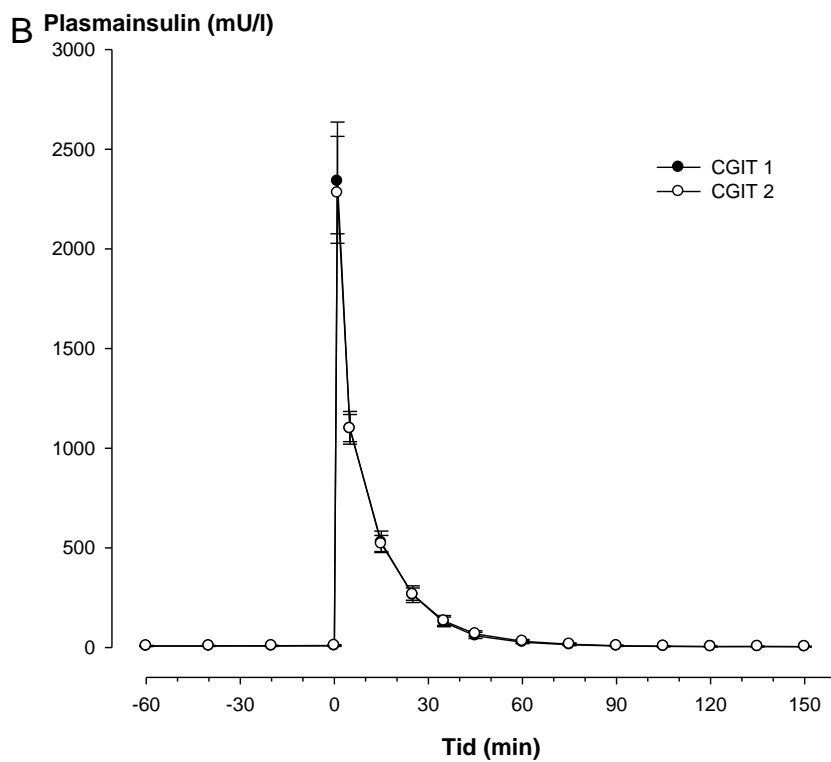
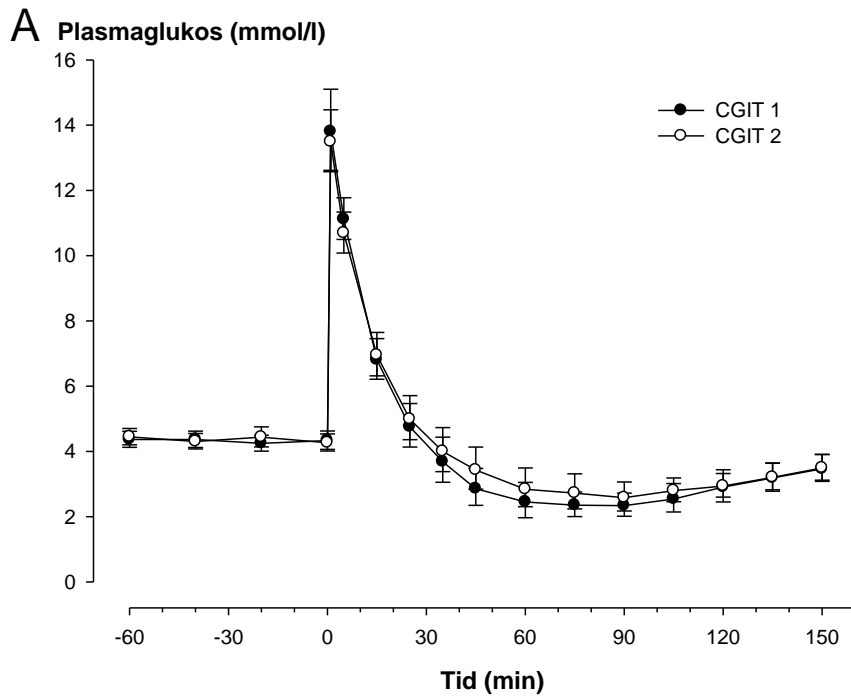
Skillnader i medelvärden för plasmaglukos och plasmainsulin mellan teststillfälle ett och två samt mellan raser (islandshäst/varmblodig travare) analyserades med hjälp av ANOVA för upprepade mätningar med två faktorer (tid och teststillfälle alternativt tid och ras)¹¹. Skillnader i medelvärde för AUC_{ins}, AUC_{glu}, DIK₁₀₀, och PFD_{min} mellan provtagningstillfällena eller raser analyserades med hjälp av parat t-test respektive t-test. Reproducerbarheten hos CGIT-testet (testomgång 1 och 2) utvärderades med hjälp av att variationskoefficienten (CV-värdet) beräknades vid varje provtagningstidpunkt och för AUC_{ins}, AUC_{glu}, DIK₁₀₀, och PFD_{min}. För att erhålla normalfördelade data för glukos- och insulinkoncentrationerna under CGIT testet logtransformerades dessa värden. För logtransformerade data redovisas det geometriska medelvärdet ± konfidensintervallet. För normalfördelade data redovisas medelvärdet ± standardavvikelsen (SD). Signifikansen (P-värde) sattes till < 0,05.

RESULTAT

Vid de kliniska undersökningarna hittades inga onormala fynd på hästarna varför alla fick vara med i studien. Medelvärdena för fasteinsulin och fasteglukos i blodplasma hos varmblodstravarna var inom referensmarginalerna (Frank, 2011). Hos islandshästarna var medelvärdet för fasteglukos och fasteinsulin också inom referensmarginalen (Frank, 2011). En av islandshästarna hade vid försökstillfälle två, en insulinkoncentration på > 20 mU/l (37,9 mU/l) i fasta, vilket skulle kunna tyda på insulinresistens. Denna häst uteslöts inte från studien eftersom; (1) den hade normal insulinkoncentration i fasta (16 mU/l) vid första försökstillfället, (2) hästen korsade sin baslinje < 45 minuter vid försökstillfälle två (vilket en insulinresistent häst inte förväntas att göra), och (3) ingen klinisk misstanke om insulinresistens förelåg (med avseende på bedömning av BCS och CNS samt ingen bakgrundshistoria med fång). De allra flesta hästarna tolererade CGIT-testet mycket bra, med undantag av en häst som i första försöksomgången blev så hypoglykemisk att den fick avbryta försöket och behandlas med glukos intravenöst.

Medelvärdena för glukos- och insulinkoncentrationerna i blodplasma hos alla 18 hästarna under CGIT vid försökstillfälle ett och två redovisas i figur 1. Plasmaglukos- och plasmainsulinkoncentrationerna skiljde sig inte åt mellan de båda testerna vid någon tidpunkt.

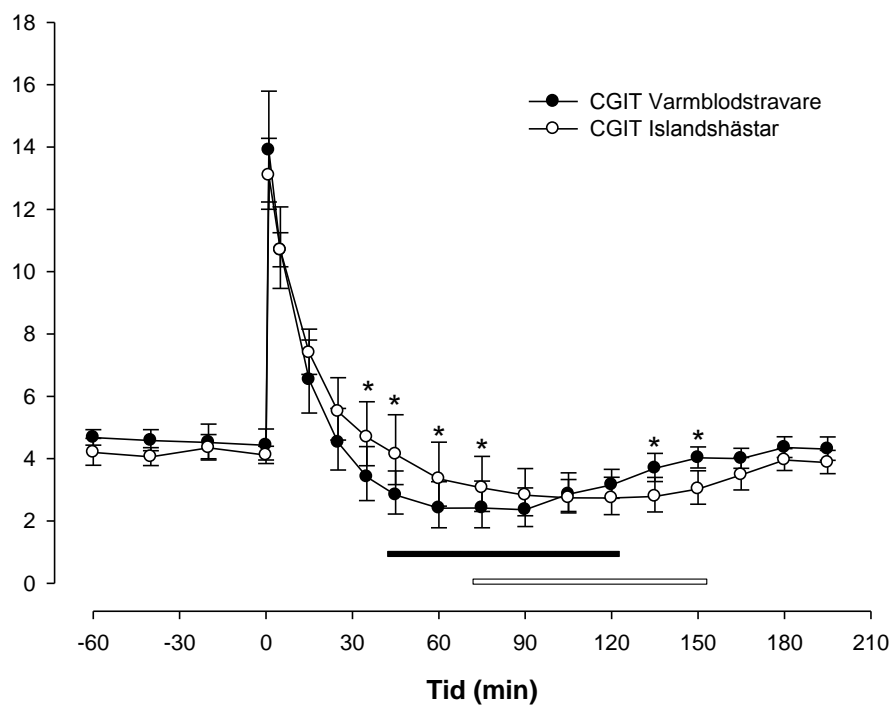
¹¹ Sigma Plot 11,0, Systat Software UK Limited, London, Storbritannien

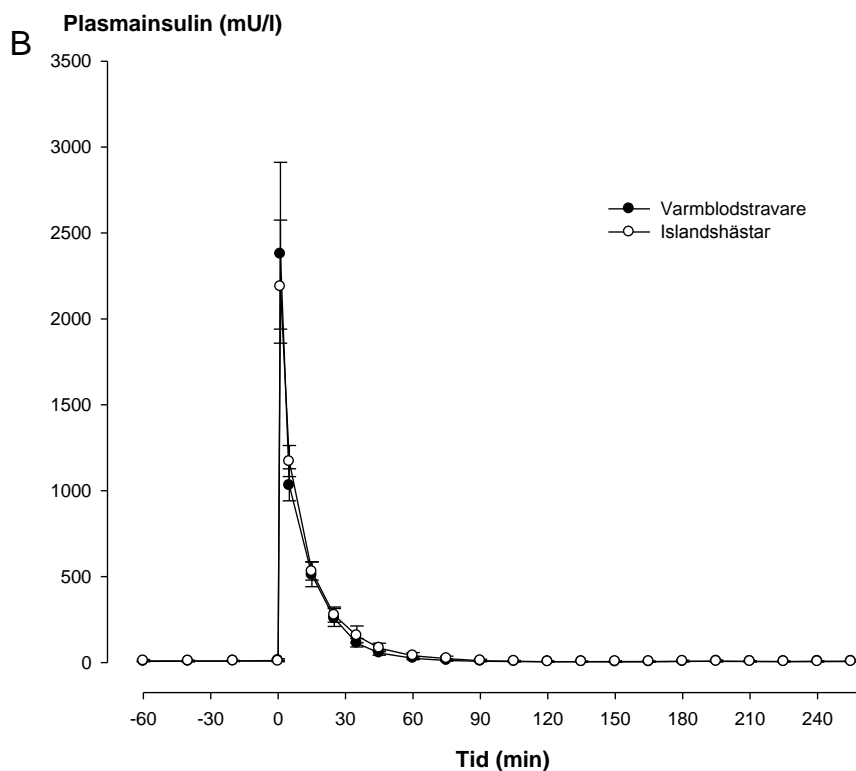


Figur 1. Tidskurvor för plasmaglukoskoncentrationer (**A**) och plasmainsulin koncentrationer (**B**) för två upprepade kombinerat glukos- och insulintolerans test (CGIT). Data är baserat på medelvärdet \pm konfidensintervall för 18 hästar (nio svenska varmblodstravare och nio islandshästar). Plasmaglukos- och plasmainsulinkoncentrationerna skiljde sig inte åt mellan de båda testerna vid någon tidpunkt.

Eventuell rasvariation undersöktes och beräknades i andra försöksomgången eftersom denna testomgång var förlängd till 195 minuter (jämfört med CGIT standardduration på 150 minuter). Islandshästarnas plasmaglukoskurva var signifikant förskjuten till höger jämfört med varmblodstravarna (figur 2). Det betyder att det tar betydligt längre tid för en kliniskt frisk islandshäst att skära sin baslinje än vad det gör för en kliniskt frisk varmblodstravare (tabell 1). Det förekom ingen skillnad i plasmainsulinkoncentrationerna mellan de båda raserna vid någon tidpunkt (se figur 2 och tabell 1).

A Plasmaglukos (mmol/l)





Figur 2. Plasmaglukoskoncentration (A) and plasmainsulinkoncentration (B) hos nio varmbloodstravare och nio islandshästar under ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT). Data är baserat på medelvärdet av samtliga hästar \pm konfidensintervall. De tidpunkter markerat med en * visar de provtagningstidpunkter där medelkoncentrationen av plasmaglukos hos travarna skiljer sig signifikant ($p < 0,05$) från islandshästarna. Datapunkter för varmbloodstravarna som är lokaliserade över den horisontella svarta linjen är signifikant lägre ($p < 0,05$) jämfört med deras baslinje (-60 – 0 min). Datapunkter för islandshästarna lokaliserade över den vita horisontella linjen är signifikant lägre ($p < 0,05$) jämfört med deras baslinje (-60 – 0 min). Det var ingen skillnad i plasmainsulinkoncentrationen vid någon tidpunkt mellan de två olika hästraserna.

Tabell 1. Medelvärde \pm standardavvikelse för beräknade variabler för det förlängda (195 minuter) kombinerade glukos- och insulintoleranstestet (CGIT) hos nio varmbloodstravare och nio Islandshästar.

Variabel	Varmbloodstravare (n=9)	Islandshästar (n=9)
PFD _{min}	26,8 \pm 7,3	53,6 \pm 24,1*
AUC _{gluc} (mmol/l · min)	592,5 \pm 108,0	641,7 \pm 118,4
DIK ₁₀₀	38,1 \pm 4,3	43,3 \pm 7,0
AUC _{ins} (mU/l · min)	24145 \pm 4217	26429 \pm 3703

PFD_{min} tidpunkt för när glukoskurvans positiva fas skär baslinjen; AUC_{gluc} area under kurvan för glukos vs. tid; AUC_{ins} area under kurvan för insulin vs. tid; DIK₁₀₀, duration till insulinkurvan når en koncentration av 100 mU/l. * $p < 0,05$.

För att på ett korrekt och tillförlitligt sätt utvärdera reproducerbarheten hos CGIT undersöktes CV-värdet vid varje provtagningstidpunkt för både glukos och insulinkurvan. I plasmaglukoskoncentrationskurvan ökar CV värdet från < 14 % till närmare 30 % då kurvorna skär baslinjen. Detta betyder att CV värdet för provtagningstidpunkterna blir som högst när skärningspunkten skall avläsas. I plasmainsulinkurvan är CV värdet som lägst mellan 1-45 minuter efter försöket inträdande (tabell 2).

Tabell 2. Mätningar reproducerbarhet i plasmaglukos och plasmainsulin vid olika provtagningstidpunkter under ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) utfört på 18 friska hästar (nio varmblodstravare och nio islandshästar). Medelvärdena av glukos och insulinkoncentrationerna vid de olika tidpunkterna för CGIT utfört vid två olika tillfällen ses i figur 1.

Provtagnings- tidpunkt	Plasmaglukos	Plasmainsulin
	CV (%)	CV (%)
-60 min	9,1	50,2
-40 min	8,1	60,0
-20 min	11,7	37,0
0 min	10,8	46,0
1 min	13,0	18,8
5 min	8,1	7,0
15 min	14,0	10,0
25 min	17,1	16,4
35 min	24,7	19,6
45 min	29,7	22,6
60 min	31,9	32,1
75 min	31,9	43,1
90 min	26,0	54,0
105 min	20,1	69,5
120 min	18,5	58,9
135 min	16,8	50,6
150 min	12,0	72,0

I tabell 3 ses en sammanställning av resultatet av medelvärdet \pm standardavvikelsen samt CV-värde i testomgång ett och två för; AUC_{glu} , AUC_{ins} , DIK_{100} och PFD_{min} . AUC_{glu} , AUC_{ins} , DIK_{100} och PFD_{min} skiljde sig inte åt mellan testomgångarna.

Tabell 3. Medelvärde \pm standardavvikelse för beräknade variabler samt beräkningar av reproducerbarheten av ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) hos 18 friska hästar (nio varmblodstravare och nio islandshästar).

Variabel	Test 1 (n=18)	Test 2 (n=18)	CV %
PFD_{min}	33,9 \pm 14,7	40,2 \pm 22,1	44,9
AUC_{glu} (mmol/l \cdot min)	591,6 \pm 93,1	617,1 \pm 112,8	14,6
DIK_{100}	40,3 \pm 7,8	40,7 \pm 6,2	7,0
AUC_{ins} (mU/l \cdot min)	25230 \pm 4193	25287 \pm 4025	7,7

PFD_{min} tidpunkt för när glukoskurvans positiva fas skär baslinjen; AUC_{glu} , area under kurvan för glukos vs. tid; AUC_{ins} , area under kurvan för insulin vs. tid; CV, variationskoefficienten.

DISKUSSION

I denna studie undersöktes reproducerbarheten samt eventuell rasvariation inom ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest (CGIT) hos friska hästar. I studien ingick totalt 18 individer (nio svenska varmblodstravare och nio islandshästar) som fick genomgå ett CGIT två gånger vardera med tre veckors intervall. Samtliga hästar testades i sin hemmiljö.

Hästarnas tolerans av testet

CGIT-testet tolererades mycket bra av majoriteten av hästarna. En av hästarna fick tydliga symtom på hypoglykemi i första försöksomgången, men klarade andra försöksomgången besvärsfritt. Hästen fick symtom på hypoglykemi 45 minuter efter att testet startades. Eftersom hästen hade fullföljt 45 minuter innan den togs ur första försöksomgången kunde det mesta av denna hästs data användas i de statistiska beräkningarna. Hästens symtom bestod av vinglighet, muskeldarrningar och svettningar. Dessa symtom avtog mycket snabbt efter behandling med glukos intravenöst. Vid andra försökstillfället klarade sig denna häst bra och kunde genomgå hela försöket. Samtliga hästar övervakades med stor noggrannhet och extra blodprover togs (snabb-glukos med hjälp av glukometer) när de var i den negativa fasen av kurvan (när glukosvärdet var lägre än nollprovet) för att snabbt upptäcka om fler hästar riskerade att bli så hypoglykemiska att behandling skulle kunna bli nödvändigt. Glukoslösning för intravenös injektion fanns hela tiden lätt tillgänglig ifall någon häst skulle behöva behandlas. Ytterligare hästar fick mycket lindriga symtom på hypoglykemi. De började blinka oregelbundet och okontrollerat under en kort period (minuter), men symtomen övergick aldrig till vinglighet eller muskeldarrningar likt den häst som fick avbryta försöket. Eftersom symtomen endast var lindriga fick dessa hästar genomgå hela försöket.

Fasteglukos och fasteinsulin

Medelvärdena för fasteglukos- och fasteinsulinkoncentrationerna var inom normalvariationen hos både varmbloodstravarna och islandshästarna med undantag av en islandshäst, som hade ett fasteinsulinvärde på 37,9 mU/l i ett nollprov. Varför denna häst hade så höga insulinvärden vid detta testtillfälle är oklart, men den fick fullfölja studien trots detta eftersom ingen misstanke om insulinresistens förelåg då; (1) hästen hade normal fasteinsulinkoncentration i första försöksomgången, (2) hästen korsade sin baslinje vid 26 minuter i testomgång två (tydligt under 45 minuter, vilket inte förväntas av en insulinresistent häst) samt (3) ingen klinisk misstanke om insulinresistens då BSC och CNS var inom normalvariationen samt att hästen enligt uppgift från ägaren aldrig haft problem med fång.

Vid beräkning av eventuell skillnad mellan försökstillfälle ett och två visade det sig att det inte var någon statistisk skillnad mellan försöksomgångarna, varken vad gäller plasmaglukoskoncentration eller plasmainsulinkoncentration (se figur 1). Detta indikerar att inget metodfel ägde rum. Dock kan det anas en tendens till att plasmaglukoskoncentrationen generellt ligger lite högre vid försökstillfälle två, än vid försökstillfälle ett. Det skulle kunna förklaras av att hästarna var lite mer stressade vid andra försöksomgången eftersom de då kan ha anat vad som väntade dem.

Rasvariation

Det förekom ingen skillnad mellan raserna vad gäller plasmainsulinkoncentrationen, vilket innebär att varmbloodstravarna och islandshästarna metaboliserar det exogent tillförda insulinet på likvärdigt sätt. I plasmaglukoskoncentrationen skiljer sig islandshästarna statistiskt från varmbloodstravarna vid specifika tidpunkter (se figur 2). Resultatet visar att islandshästarnas kurva är signifikant förskjutet till höger eftersom det tar en betydligt längre tid för dem att korsa sin baslinje jämfört med varmbloodstravarna. Detta stödjer tidigare studier (Jeffcott *et al.*, 1986) där en generell lägre insulinkänslighet hos ponnyraser jämfört med större hästraser har detekterats. Denna något lägre insulinkänslighet finns naturligt (genetiskt) hos vissa raser, utan att behöva innebära att de är sjuka (Jeffcott *et al.*, 1986). Om ingen hänsyn tas till denna rasskillnad är det stor risk att bedömningen av ett CGIT blir felaktig och att normala ponnyer klassas som insulinresistenta trots att de för rasen har en normal insulinkänslighet.

Reproducerbarhet

Vid beräkning av testets reproducerbarhet ses att CV-värdet för plasmaglukoskoncentrationen är över 20 % i tidpunkterna 35 minuter - 105 minuter (tabell 2). Detta innebär att spridningen är relativt stor (>20 %) i dessa tidpunkter. Ett CGIT avläses vanligen genom att undersöka vid vilken tidpunkt (efter glukos- och insulininfusionen) hästen skär sin baslinje i en glukoskurva. Sker detta inom 45 minuter bedöms hästen inte lida av insulinresistens. Tillförlitligheten av denna parameter har i studien visat sig vara begränsad, vilket avspeglas i ett högt CV-värde (45 %) för den kliniskt viktiga parametern PFD_{min} . Förutom att undersöka hästens glukoskoncentration vid 45 minuter kan tidpunkten för när insulinkoncentrationen når 100 mU/l (DIK_{100}) användas som parameter för att undersöka insulinkänsligheten. Om hästen har en insulinkoncentration över 100 mU/l vid 45 minuter klassas den som insulinresistent (Frank, 2011). Variationskoefficienten för insulin vid tidpunkten 45 minuter är 23 % och vid

tidpunkterna 15-35 minuter ligger CV-värdet under 20 %, vilket talar för en relativt god reproducerbarhet vid dessa tidpunkter. Den kliniska parametern DIK_{100} har ett CV-värde på 7 %, vilket måste anses vara mycket bra för den här typen av diagnostisk test. Den här studien visar att det är en mycket mer tillförlitlig metod att använda sig av DIK_{100} vid avläsning av ett CGIT än att läsa av tidpunkten för när glukoskurvan skär sin baslinje (PFD_{min}).

Svälts inverkan på försöket

I denna studie valdes att låta hästarna svälta under försökets gång. I en studie av Frank (2011) rekommenderas det att hästarna skall svälta under försökets gång, men att de får ett par kilo hö omkring klockan 22:00 kvällen innan försöket. Det skall beaktas att hästar som svälter kan bli stressade, vilket skulle kunna påverka testets resultat. Det finns studier som rekommenderar att inte ha hästarna fastande med hänsyn till detta (Geor, 2008). Vidare finns en studie (utförd på åsnor) där misstanke uppstår om att själva utfodringstillfället i sig kan ge upphov till stressreaktioner, vilket ger upphov till ökade halter av kortisol i blodet (Forhead *et al.*, 1995). Det förekom ingen uppenbar stressreaktion hos hästarna som deltog i denna studie. De stod relativt lugnt hela tiden med undantag av ett par hästar som vid något tillfälle skrapade lite med framhovarna när de befann sig i den negativa fasen. Detta skulle kunna tolkas som att dessa hästar var hungriga på grund av sin hypoglykemi och därav något stressade.

Brunsts inverkan på försöket

Det utfördes ingen brunstkontroll på hästarna i studien. I teorin kan tänkas att ett brunstigt sto är mer stressad och att insulin- och glukosnivåerna därför ligger lite högt i fasta. Försöket ägde rum i mars-april, vilket talar emot att hästarna skall ha befunnit sig i brunst. Islandshästarna hade inga tecken på att befinna sig i brunst (dock gjordes ingen undersökning av äggstockarna per rektum). Universitetets varmbloodstravare går dock på ljusprogram, vilket betyder att de i praktiken kan vara brunstiga året runt. Det var ett varmbloodssto som visade symtom på brunst och hon brunstade både i försökstillfälle ett och i försökstillfälle två. Hon fick dock vara med i studien eftersom; (1) hennes fastevärden i både plasmaglukos och plasmainsulin var inom referensmarginalen vid båda försökstillfällena, (2) hennes kurvor skiljde sig inte betydande från de andra varmbloodstravarnas kurvor.

KONKLUSION

- Att använda tiden för då hästens glukoskurva skär baslinjen är ingen bra parameter vid avläsning av plasmaglukoskoncentrationen i ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest är ingen tillförlitlig metod.
- Det finns betydande rasskillnader som måste utvärderas mer och testet måste rasanpassas om det skall kunna användas på ett tillförlitligt sätt.
- Att använda DIK_{100} som en parameter vid avläsning av insulinkoncentrationen i ett kombinerat glukos- och insulintoleranstest har en mycket bra reproducerbarhet. Dock krävs ytterligare studier, både på friska och insulinresistenta hästar, innan detta med säkerhet kan fastställas.

KÄLLFÖRTECKNING

Firshman, A. M., Valberg, S. J. (2007) Factors affecting clinical assessment of insulin sensitivity in horses. *Equine veterinary journal*, 39, (6), 567-575

Forhead A. J., Smart D., Smith R. F., Dobson H. (1995) Transport-induced stress responses in fed and fasted donkeys. *Research in Veterinary Science*, 58, 144-151

Geor R. J. (2008) Metabolic Predispositions to Laminitis in Horses and Ponies: Obesity, Insulin Resistance and Metabolic Syndromes. *Journal of Equines Veterinary Science*, Vol 28, No 12, 753-759

Frank, N. (2009) Equine Metabolic Syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol 29, No 5, 259-267

Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E., and Johnson P. J. (2010) Equine Metabolic Syndrome, ACVIM Consensus Statement, *J Vet Intern Med* 2010;24:467-475

Frank, N. (2011) Equine Metabolic Syndrome. *Vet Clin Equine* 27 (2011) 73-92

Garcia, M.C. and Beech, J. (1986) Equine intravenous glucose tolerance test: glucose and insulin responses of healthy horses fed grain or hay and of horses with pituitary adenoma. *Am. J. vet. Res.* 47, 570-572.

Geor, R. J (2008) *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol 28, No 12, 753-759

Harris, P. (2006) Countermeasures for Pasture-Associated Laminitis in Ponies and Horses. *The WALTHAM International Nutritional Sciences Symposia*, 2114-2121

Jeffcott, L. B., Field, J.R., McLean, J. G., Kerin O’dea (1986) Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity in Ponies and Standardbred Horses, *Equine Veterinary Journal*, Volume 18, Issue 2, pages 97-101

Kaneko, J.J. (1989) Carbohydrate metabolism and its diseases. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 4th edn [online] San Diego. Tillgänglig: ebrary [2011-12-16], sid 44-81

Kronfeld, D.D., Treiber, K.H. and Geor, R.J. (2005) Comparison of nonspecific indications and quantitative methods for the assessment of insulin resistance in horses and ponies. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 226, 712-719.

Ralston, S.L. (2002) Insulin and glucose regulation. *Vet Clin. N. Am.:Equine Pract* 18, 295-304