



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Metabolit- och hormonnivåer som tidiga markörer för fruktsamhet och produktionsstörningar

Karin Johansson



Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik,
369

Uppsala 2012

Examensarbete, 15 hp
– Kandidatarbete (Litteraturstudie)

Agronomprogrammet–Husdjur



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik

Metabolit- och hormonnivåer som tidiga markörer för fruktsamhet och produktionsstörningar

Metabolite and hormone levels as early markers for fertility and production disturbances in dairy cattle

Karin Johansson

Handledare:

Karl-Johan Petterson, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Examinator:

Britt Berglund, SLU, Institutionen för husdjursgenetik

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Kandidatarbete i husdjursvetenskap

Kurskod: EX0553

Program: Agronomprogrammet–Husdjur

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2012

Omslagsbild: Sara Johansson

Serienamn, delnr: Examensarbete / SLU, Institutionen för husdjursgenetik, 369

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: metaboliter, fruktsamhet, brunstkontroll, energibalans, mjölkcor

Keywords: hormones, metabolites, fertility, estrous detection, energy balance, dairy cows

Sammanfattning

Under de senaste decennierna har fruktsamheten hos mjölkkor minskat i takt med att avkastningen har ökat. Detta beror bland annat på den negativa genetiska korrelationen mellan mjölkavkastning och fruktsamhet, minskat brunstbeteende och metaboliska problem hos kon. Syftet med denna litteraturstudie var att utreda metaboliters och hormoners funktion som markörer för fruktsamhets-, hälso- och produktionsstörningar hos mjölkkor. Flertalet metaboliter föreslås som indikatorer på kons energibalans. De metaboliter vars koncentrationer har ett samband med energibalans uppges vara betahydroxybutyrat (BHB), aceton, omättade fettsyror (NEFA), urea samt glukos. BHB, NEFA och urea kan även ha ett samband med fruktsamhet. Det har även föreslagits att använda hormoner som indikatorer på energibalans. Insulin och insulinlikt tillväxthormon som tagits upp i denna studie har dock endast svaga samband till energibalans. Genom att använda endokrina parametrar för fruktsamhet och brunstkontroll skulle kons fruktsamhet kunna förbättras. Progesteron kan användas för att mäta endokrina parametrar såsom intervall från kalvning till påbörjad luteal aktivitet samt för att upptäcka brunst. Östradiol kan användas till att upptäcka brunst och anti-Mülleriskt hormon har i en undersökning föreslagits kunna användas för att avgöra det unga djurets reproduktiva livslängd. De hormoner och metaboliter som idag används som indikatorer på fruktsamhet och metaboliska störningar är progesteron, BHB och urea. Enligt denna studie är vissa metaboliter och hormoner mer lämpade som indikatorer än andra. BHB kan användas som indikator för både rubbningar i energibalans och fruktsamhet. Även urea har flera användningsområden då det kan användas för att kontrollera protein/energi-balans i fodret men även fruktsamhet. Det hormon som passar bäst för mätningar av fruktsamhetsparametrar är progesteron då detta kan användas för brunstkontroll men även för att upptäcka flertalet störningar och problem. Alla dessa ämnen kan mätas i mjölken direkt på gården vilket är en förutsättning för att man enkelt ska kunna använda dessa indikatorer.

Abstract

During the last decades the fertility of dairy cows has declined in the same rate as the milk yield has increased. This is a result of the negative genetic correlation between milk yield and fertility, failure to show estrous signs and metabolic problems in the cow. The purpose of this review was to investigate the function of metabolites and hormones as markers for disturbances in fertility, health and production in the dairy cow. There are several metabolites that are suggested to indicate the cow's energy balance. β -hydroxybutyrate (BHB), acetone, nonesterified fatty acids (NEFA), urea and glucose are metabolites that have been found to have connections to the energy status of the cow. BHB, NEFA and urea also is related to fertility. There are also some hormones that have been suggested to indicate energy status. Insulin and insulin-like growth factor-1 is mentioned in this study but have been found to have only weak connections to energy balance. By using endocrine parameters for fertility measures and estrous control the cow fertility may improve. Progesterone can be used for measurements of endocrine parameters such as interval from calving to commencement of luteal activity and also for detection of estrous. Estradiol can be used for estrous detection and anti-Müllerian hormone has been proposed for determining the young animal's reproductive longevity. Progesterone, BHB and urea are used as indicators already today. According to this study some metabolites and hormones are more useful as indicators than others. BHB can be used as an indicator for both energy balance and fertility. Urea has more than one area of use as well, e.g. control of the protein/energy balance in the feed and indicator of fertility status. The hormone best suited for measures of fertility parameters is progesterone which can be used both for estrous control and detection of fertility disturbances. All these substances can be measured in the milk which is a requisite for using them on the farm.

Introduktion

Under de senaste decennierna har avkastningen hos våra mjölkkor ökat dramatiskt samtidigt som fruktsamheten har minskat. Denna minskning beror på många saker, bland annat den negativa genetiska korrelationen mellan mjölkavkastning och fruktsamhet (Pryce *et al.*, 1998; Veerkamp *et al.*, 2000), minskat brunstbeteende (Boer *et al.*, 2010) och metaboliska problem hos våra mjölkkor (Roche, 2006; Dobson *et al.*, 2007). För att komma till rätta med dessa fruktsamhetsproblem behövs dels breda avelsmål men också skötselrutiner som är anpassade till de högvastande mjölkorna (Pryce *et al.*, 2004).

Det finns flera metaboliska störningar som kan drabba den högvastande mjölkkon, exempelvis acetonemi, löpmagsomvridning och viktnedgång. Dessa kan relateras till kons energimetabolism (Stengärde *et al.*, 2011). Störningar i energimetabolismen kan ha en negativ inverkan på fruktsamhet (Pryce *et al.*, 2001; Patton *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2007). Det finns flera metaboliter som kan användas som biomarkörer för energimetabolismen hos den lakterande kon, till exempel ketonkroppar såsom aceton och betahydroxybutyrat (BHB) (Enjalbert *et al.*, 2001; Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005). Det finns individuella skillnader i koncentration av dessa metaboliter i mjölken hos kor. Genom att mäta de olika metaboliterna i mjölken skulle det kunna fastställas vilka individer som hanterar den metaboliska stress som kon utsätts för i början av laktationen bättre än andra (Klein *et al.*, 2010).

Traditionella parametrar för fruktsamhet, såsom tid till första inseminering, antal seminerings per dräktighet och kalvningsintervall, påverkas i stor grad av skötselrutiner vid brunst. Exempel på problem i skötselrutiner kan vara brunstkontroll och inseminering i rätt tid (Darwash *et al.*, 1999). Eftersom brunstbeteendet hos våra mjölkkor har minskat i styrka i takt med den allt högre mjölkproduktionen kan det vara svårt att upptäcka brunst (Boer *et al.*, 2010). Genom att istället använda sig av endokrina parametrar för fruktsamhet och brunstkontroll finns möjlighet att förbättra fruktsamheten hos kon (Petersson *et al.*, 2008). Exempel på endokrina parametrar är intervall från kalvning till påbörjad luteal aktivitet (CLA) och procent prov över gräns för luteal aktivitet de första 60 dagarna efter kalvning (PLA) (Petersson *et al.*, 2008). Royal *et al.* (2002) fann att endokrina parametrar för fruktsamhet har en högre arvbarhet än de traditionella fruktsamhetsparametrarna. Endokrina parametrar skulle kunna användas som tidiga markörer vid utslagning av kor med försämrad fruktsamhet och vid utvärdering av tjurar vid avkommeprövning och på så sätt användas i avelsarbetet för förbättrad fruktsamhet (Royal *et al.*, 2002).

Syftet med denna litteraturstudie är att utreda metaboliters och hormoners funktion som markörer för fruktsamhets-, hälso- och produktionsstörningar hos mjölkkor. Detta behövs som ett hjälpmedel för att förbättra kons fruktsamhet och hälsa både genom skötsel och avelsarbete. Arbetet kommer främst inrikta sig på fruktsamhet men eftersom fruktsamhet påverkas i stor grad av metaboliska störningar (Dobson *et al.*, 2007) kommer även detta tas upp. Eftersom både försämrad fruktsamhet och metaboliska störningar påverkar produktionen negativt (Dobson *et al.*, 2007) finns ett stort behov av att reda ut hur det enkelt går att upptäcka och arbeta förebyggande med dessa problemområden.

Metaboliter relaterade till fruktsamhet och produktionsstörningar

Samband mellan energibalans, fruktsamhet och metaboliter

En producerande mjölkko kräver ett tillräckligt energiintag för att stödja fysiologiska funktioner såsom mjölkproduktion och reproduktion. Kon går in i negativ energibalans när energiintaget inte möter behovet (Banos *et al.*, 2006). Mjölkkavkastning och torrsubstansintag är de huvudsakliga faktorerna som påverkar kons energibalans (Westwood *et al.*, 2002). Negativ energibalans kan orsaka förändringar i kropps massa. Högavkastande kor har lägre hull (body condition score; BCS) och förlorar mer kropps massa i tidig laktation jämfört med medelavkastande kor (Pryce *et al.*, 2001). Negativ energibalans kan även leda till acetonemi (Enjalbert *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005) som är ansamling av ketonkroppar i vävnader och mjölk hos kon (Sjaastad *et al.*, 2010). Detta sker när stora mängder fettsyror mobiliseras från fettvävnad, exempelvis vid negativ energibalans. Ketonkropparna bildas i citronsyrcykeln i levern där levercellernas begränsade förmåga att oxidera fettsyror till CO₂ och H₂O gör att ketonkroppar bildas istället för dessa (Sjaastad *et al.*, 2010). Acetonemi kan vara antingen klinisk eller subklinisk (Enjalbert *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005). Patton *et al.* (2007) fann att energibalans är kopplad till fruktsamhet i tidig laktation. I studien gav en positiv energibalans en högre sannolikhet för tidigare återgång till normal cyklicitet och en tidigare dräktighet efter kalvning. Även nedgång i BCS och acetonemi påverkar kons reproduktiva förmåga negativt (Pryce *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 2007). Det finns flertalet metaboliter som har föreslagits att användas som indikatorer på negativ energibalans, acetonemi och även försämrad fruktsamhet. De som tas upp här är BHB, aceton, omättade fettsyror (NEFA), urea och glukos. Dessa anses frisättas vid mobilisering av kroppsreserver (Clark *et al.*, 2005). Tiden för provtagning av ketonkroppar och glukos i förhållande till utfodring kan vara viktig för att undvika påverkan av fodrets kolhydratstatus. Ett prov för nära efter utfodring skulle kunna ge ett osäkert resultat (Clark *et al.*, 2005).

BHB

BHB är en ketonkropp som bildas i levercellerna vid mobilisering av fettsyror. Clark *et al.* (2005) fann i en studie på mjölkkor med bete som främsta energikälla att plasma-BHB var signifikant korrelerat med kons energistatus. I studien ökade koncentrationen av BHB i blodet vid negativ energibalans. I ett tidigare försök fann även Reist *et al.* (2002) en signifikant negativ korrelation mellan BHB i blodplasma och energibalans de första 10 veckorna efter kalvning. Dessa korrelationer kan ses i Tabell 1.

Tabell 1. Metaboliters fenotypiska korrelation med energibalans de första 10 veckorna efter kalvning (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005)

Metabolit	Mättningsmetod	Fenotypisk korrelation med energibalans
BHB	Plasma	-0,46 till -0,76
Aceton	Mjölk	-0,41 till -0,64
NEFA	Plasma	-0,56 till -0,59
Urea	Mjölk	0,10
Glukos	Plasma	0,46 till 0,79

Walsh *et al.* (2007) fann att kor som inte lyckades bli dräktiga på första insemination hade högre koncentrationer av BHB i blodet två veckor efter kalvning än de kor som blev dräktiga. Sannolikheten för dräktighet minskade med 3 % för varje ökning med 100 µmol BHB per liter serum. Serum-BHB i vecka 3, 6 och 9 var dock inte signifikant relaterade till dräktighetsresultat (Walsh *et al.* 2007). Wathes *et al.* (2007) skiljde på förstakalvare och äldre kor. De kom dock fram till att BHB koncentrationen i blod var positivt korrelerad till intervall till CLA för båda åldersgrupperna, vilket innebar att höga BHB koncentrationer i blodet gav ett längre CLA oberoende av ålder.

Enligt Clark *et al.* (2005) kan metabolitnivåer i blodet användas vid avelsarbete men är olämpligt för arbete på gården. Ett bättre alternativ är att mäta metaboliter i mjölken. Enligt Clark *et al.* (2005) är mjölk-BHB inte signifikant korrelerat med vare sig energibalans eller plasma-BHB. Dock fann både Enjalbert *et al.* (2001) och Samiei *et al.* (2010) en signifikant korrelation mellan BHB i mjölk och i blod. Det finns dessutom en korrelation mellan mjölkacetone och plasma-BHB (Enjalbert *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005). Nielsen *et al.* (2005) utvecklade en matematisk modell för att tidigt upptäckt av acetonemi där mjölk-BHB användes. Modellen visar hur flera riskfaktorer för acetonemi ändras i kon i relation till dagliga värden av BHB, dagar in i laktation och sjukdomsförekomst.

Aceton

På samma sätt som BHB bildas i levern så bildas även ketonkroppen aceton. Som tidigare nämnts bildas ketonkroppar när höga koncentrationer av fettsyror passerar levern vid hög energimobilisering (Sjaastad *et al.*, 2010). Det finns en signifikant negativ korrelation mellan mjölkacetone och energibalans (Tabell 1) (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005) och även en signifikant positiv korrelation mellan mjölkacetone och plasma-BHB (Enjalbert *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2005). Dessa korrelationer innebär att acetonhalten i mjölk stiger när kons energibalans går ner och BHB koncentrationen i plasma går upp. Clark *et al.*, (2005) föreslår att använda mjölkacetone som indikator på negativ energibalans som en enkel metod på gårdsnivå.

NEFA

NEFA kommer först och främst från triglycerider i fettvävnad. Dessa transporteras vid energimobilisering till levern där de oxideras helt eller delvis, alternativt mättas. Det är vid den ofullständiga oxideringen som ketonkroppar bildas (Stengärde, 2010). Det finns enligt flera studier en negativ korrelation mellan blod-NEFA och energibalans, vilket framgår av Tabell 1 (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005). Den negativa korrelationen innebär att det finns höga koncentrationer av NEFA i blodet vid negativ energibalans. I studien av Clark *et al.* (2005) användes dock inte NEFA i modellen för att förutsäga energibalansen trots korrelationen, då både plasma-BHB och plasmaglukos hade en högre korrelation med energibalans. I studien av Reist *et al.* (2002) hade däremot NEFA en högre korrelation med energibalans än både BHB och glukos. Höga serumkoncentrationer av NEFA sänker sannolikheten att kon blir dräktig fram till dag 150 efter kalvning. Detta tros reflektera mobiliseringen av fettreserver i kroppen och den följande rubbningen i leverfunktion (Westwood *et al.*, 2002).

Urea

Urea är en kvävekälla som tillhör gruppen "non-protein nitrogen" (NPN). Idisslare kan utnyttja denna kvävekälla för proteinsyntes så länge tillräckligt mycket energi finns för våmmikroberna att syntetisera protein (Sjaastad *et al.*, 2010). Proteinet bryts sedan ned i tunntarmen och det kväve som djuret inte använder kan sedan recirkuleras genom att urea åter

bildas i levern och transporteras via blod till andra delar av kroppen och utsöndras bland annat i saliven (Sjaastad *et al.*, 2010). Frand *et al.* (2003) föreslog att ureakoncentrationen i mjölk kan användas som en indikator på protein/energi förhållandet i fodret. Resultaten för urea mätt i mjölk är något osäkra vad det gäller sambandet med kons energibalans. Clark *et al.* (2005) kunde inte finna någon signifikant korrelation mellan mjölkurea och energibalans. Däremot fann Reist *et al.* (2002) att ureakoncentrationen i mjölk sjönk vid negativ energibalans de första tio veckorna efter kalvning. Denna korrelation var signifikant men svag (Tabell 1). Det finns dock samband mellan ureakoncentrationen i mjölken och kons fruktsamhet. Ureakväve koncentrationer högre än 19 mg/dl mjölk har visat sig ge sämre dräktighetsresultat (Butler *et al.*, 1996). I en studie av Larson *et al.* (1997) kunde ureakvävekoncentrationer i mjölk över 21 mg/dl kopplas till att kon åter visade brunst 21 dagar efter insemination. Genom att övervaka ureahalten i mjölken skulle fruktsamhetsproblem kunna reduceras i besättningen genom att anpassa proteinet i fodret för optimalt kväveutnyttjande för mjölkproduktion (Butler *et al.*, 1996).

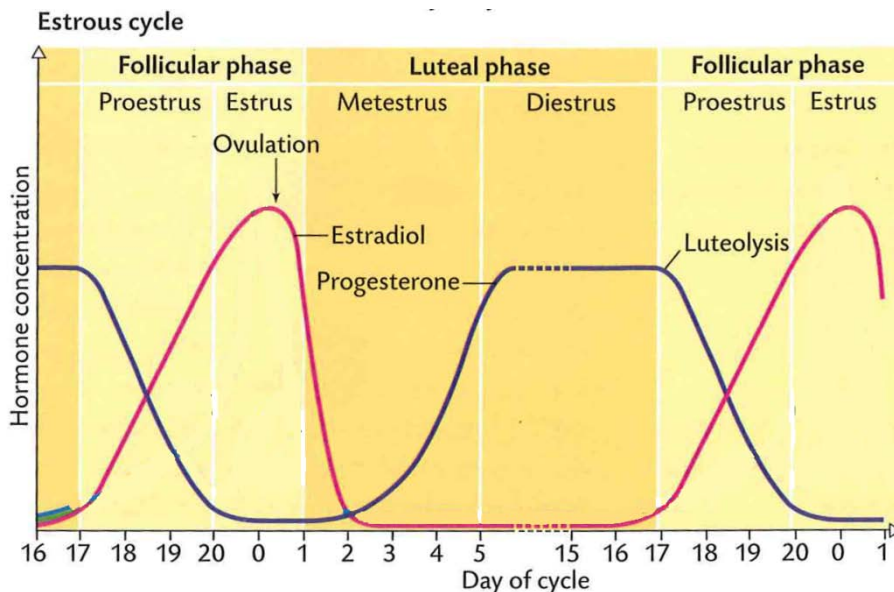
Glukos

Glukos används hos kon som energisubstrat och till laktosproduktion (Sjaastad *et al.*, 2010). Glukoneogenesen i levern, där främst propionat från våmmens kolhydratmetabolism används som substrat, förser kon med glukos (Young, 1977, citerat av Stengärde, 2010). I tidig laktation sker ofta en kraftig energimobilisering under vilken plasmaglukosnivåerna är låga (Ingvarsen *et al.*, 2003). Kon kan då även använda aminosyror från nedbrytning av muskler som glukossubstrat (Young, 1977, citerat av Stengärde, 2010). Enligt Clark *et al.*, (2005) finns en relativt hög positiv korrelation mellan blodglukos och energibalans. Även Reist *et al.* (2002) fann en signifikant positiv korrelation mellan dessa två. Dessa korrelationer framgår av Tabell 1. I modellen av Clark *et al.* (2005) användes glukos tillsammans med BHB för att uppskatta kons energibalans. Eftersom båda metaboliter i detta fall mäts i blodet kan det vara svårt att använda modellen på gårdsnivå.

Hormoner relaterade till fruktsamhet och produktionsstörningar

Hormonell reglering av reproduktionscykeln

Kons reproduktionscykel kan delas in i två faser: follikelfas och lutealfas. Under follikelfasen anses östradiol vara det dominerande hormonet medan det under den luteala fasen är progesteron som dominerar. Dessa faser kan i sin tur delas upp ytterligare, follikelfasen i proöstrus och östrus, den luteala fasen i metöstrus och diöstrus (Sjaastad *et al.*, 2010). Under follikelfasen mognar folliklarna i äggstocken. Folliklarna utsöndrar östradiol i ökande mängd under proöstrus tills brunst och ägglossning sker. Under metöstrus utvecklas en gulkropp som sedan under diöstrus producerar progesteron. Om kon inte blir dräktig genomgår gulkroppen luteolys och dess progesteronproduktion upphör. Förändringarna i hormonkoncentrationer illustreras i Figur 1. Kons brunstcykel varar i ca 21 dagar och själva brunsten under ca 18 h (Sjaastad *et al.*, 2010). Både progesteron och östradiol kan användas för att mäta kons reproduktiva status (Lopez *et al.*, 2002; Petersson *et al.*, 2008). Progesteron kan användas för att mäta endokrina parametrar för fruktsamhet såsom CLA och PLA (Petersson *et al.*, 2008). Östradiol har visat sig vara användbart vid kontroll av brunst (Lopez *et al.*, 2002).



Figur 1. Variationer i progesteron- och östradiolkoncentrationer under kons brunstcykel (efter Sjaastad *et al.*, 2010).

För utveckling av follikeln spelar anti-Mülleriskt hormon stor roll. Detta hormon är en slags tillväxtfaktor och en negativ regulator i de tidiga stadierna av follikelns utveckling (La Marca & Volpe, 2006). I den senare delen av follikelutvecklingen bildas antrala folliklar som kan utvecklas vidare till dominant folliklar. Flera folliklar utvecklas samtidigt och bildar follikelkvågor. Hos en ko förekommer ofta tre follikelkvågor men endast en resulterar i att en antral follikel utvecklas till en dominant follikel, som mognar ytterligare och ovulerar (Sjaastad *et al.*, 2010). Det finns forskning som visar på kopplingar mellan koncentrationen anti-Mülleriskt hormon i blodet och antralt follikelantal vid follikelkvågen, vilket uppges kunna användas för att avgöra djurets reproduktiva status (Ireland *et al.*, 2008).

Progesteron

Progesteronets främsta roll är att skapa en miljö som är fördelaktig för tillväxt och utveckling av fostret, vilket bland annat innebär att det motverkar brunstbeteende (Sjaastad *et al.*, 2010). Royal *et al.* (2000) fann att mjölkornas försämring i fruktsamhet var sammankopplad med en ökad förekomst av onormala progesteronmönster. I studien konstaterades det att de kor som hade svårigheter att bli dräktiga också var de kor som hade upprepade onormala progesteronmönster.

Progesteronmönster

Vid normala förhållanden är progesteronnivåerna låga under brunsten men höjs efter bildandet av gulkroppen, för att sedan sjunka igen förutsatt att kon inte är dräktig. Detta mönster illustreras i Figur 1. Det finns flertalet störningar i progesteronmönstret som kan definieras på olika sätt och som i många fall kan kopplas till de olika fruktsamhetsparametrarna. Fördröjd cyklicitet är en störning där kon har en låg progesteronnivå i minst 56 dagar efter kalvning (Peterson *et al.*, 2008). Detta kallas även sen cykelstart (Gustafsson, *et al.*, 2008). Upphörande av cyklicitet är när en normal start av reproduktionscykeln sker men cykliciteten avbryts genom att progesteronhalten sjunker i minst 14 dagar (Pettersson *et al.*, 2006). Det finns även en störning där det sker en normal start av brunstcykeln men förlängda perioder av högt progesteron förekommer i minst 19 dagar. Detta kallas förlängd lutealfas (Kafi & Mirzaei, 2010). Dessa definitioner kan se olika ut i

olika studier, det som främst skiljer studiernas definitioner åt är antalet dagar för själva störningen (Petersson *et al.*, 2006).

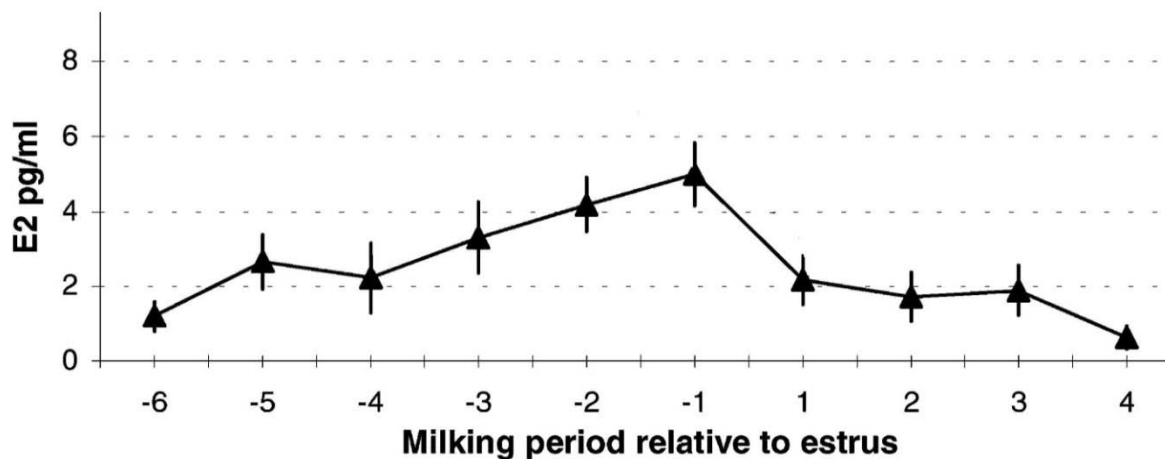
Kopplingar till endokrina parametrar

I en studie av Petersson *et al.*, (2006) var CLA kopplat till fördröjd cyklicitet. I studien var medelvärdet för CLA hos individer med fördröjd cyklicitet 76,3 dagar. Detta kan jämföras med medelvärdet för CLA hos individer med normal cyklicitet som i samma studie var 28,8 dagar. Genom att använda CLA och PLA i modellen för att förutse fördröjd cyklicitet kan en hög säkerhet uppnås (Petersson *et al.*, 2008). I studien kunde en säkerhet på 0,85–0,88 för upptäckt av individer med fördröjd cyklicitet inom 60 dagar efter kalvning uppnås, genom att mäta progesteron i mjölken en gång per månad. Vid mätningar två till tre gånger per vecka uppnåddes en säkerhet på 0,94–0,99 (Petersson *et al.*, 2008). Kafi och Mirzaei (2010) fann att en förlängd lutealfas kan kopplas till tidig ägglossning och tidig progesteronhöjning efter kalvning. Det innebär att vid en tidigare ägglossning och alltså ett kortare CLA finns högre risk för förlängd lutealfas. Kor som mjölkar mer hade även en signifikant högre förekomst av störningar i progesteronmönstret. Sannolikheten för att kon drabbades av förlängd luteal aktivitet ökade med 1,1 % för varje kg ökad toppavkastning för kor med luteal aktivitet på dag 24 efter kalvning (Kafi & Mirzaei, 2010).

Östradiol

Östradiol gör djuret mottagligt för befruktning (Sjaastad *et al.*, 2010) och har en stor roll i djurets förmåga att visa brunst (Lopez *et al.*, 2002; Pfaff, 2005). Den lakterande mjölkkons första brunst efter kalvning är ofta så kallad "tyst", vilket innebär att ägglossning sker men ingen brunst visas (Allrich, 1994). Enligt Allrich (1994) så beror detta på att kons hypotalamus misslyckas att reagera på de östradiolkoncentrationer som uppkommer vid ägglossning. Detta sägs bero på de höga östradiolkoncentrationerna i sen dräktighet. Efter inverkan av progesteron som efter ägglossning produceras av corpus luteum blir hypotalamus åter igen mottaglig för östradiol, vilket gör att följande brunst uppträder normalt (Allrich, 1994). Även stress kan orsaka samma oförmåga att visa brunst (Allrich, 1994). Enligt Lopez *et al.* (2004) finns ett samband mellan mjölkavkastning vid brunst och brunstens varaktighet. I studien visade sig ökad avkastning ha negativ effekt på brunstvisningsförmågan och kunde även kopplas samman med låga östradiolkoncentrationer. Östradiolkoncentrationerna vid brunstillfället var dessutom positivt korrelerade med brunstens varaktighet. Högvastande kor uttryckte kortare och svagare brunstbeteende än kor med lägre produktionsnivå (Lopez *et al.*, 2004).

Lyimo *et al.* (2000) fann att östradiolnivåerna i blodet är korrelerade med hur mycket brunstbeteende kon visade. I försöket togs blodprov fyra gånger per dag vid beräknad tid för brunst. Även registreringar av visat brunstbeteende gjordes. Försöket visade att högsta östradiolkoncentrationerna sammanföll med tiden för starkast visat brunstbeteende (Lyimo *et al.*, 2000). Lopez *et al.* (2002) genomförde en studie där östradiolkoncentrationerna mättes i mjölken vid mjölkning med 12 h intervall. I studien ökade östradiolhalten i mjölken signifikant från den fjärde mjölkningen fram till den närmaste mjölkningen innan visat brunstbeteende. Vid mjölkningen närmast efter visat brunstbeteende hade östradiolkoncentrationen återigen sjunkit signifikant. Detta illustreras i Figur 2. Det fanns dock individuella skillnader i hur lång tid innan visat brunstbeteende som högsta östradiolkoncentrationen i mjölk uppmättes (Lopez *et al.*, 2002).



Figur 2. Östradiolhalten i mjölk vid olika mjölkningstillfällena relaterat till visat brunstbeteende (efter Lopez *et al.*, 2002).

Anti-Mülleriskt hormon

Ireland *et al.* (2008) fann att koncentrationen av cirkulerande anti-Mülleriskt hormon och antal friska äggceller och folliklar i äggstockarna är korrelerade till antralt follikelantal vid follikelvågen. Ett lågt antal friska äggceller och folliklar samt en låg koncentration cirkulerande anti-Mülleriskt hormon hade i studien ett samband med lågt antal antrala folliklar i follikelvågen. Ireland *et al.* (2008) föreslår att använda anti-Mülleriskt hormon som indikator på den unga individens reproduktiva livslängd och med hjälp av det selektera de bästa, mest fertila individerna för fortsatt avel. Det behövs dock mer forskning för att utröna om det finns en koppling mellan antralt follikelantal under follikelvågen och antal semineringar per dräktighet. En sådan koppling skulle kunna göra att anti-Mülleriskt hormon även skulle kunna användas som indikator på djurets nuvarande reproduktiva förmåga (Ireland *et al.*, 2008).

Hormoner relaterade till energibalans

Det finns hormoner som har föreslagits ha en koppling till kons energibalans. Koncentrationer av insulin och insulinlikt tillväxthormon (IGF-1) i förhållande till energibalansen hos kon har studerats (Lucy *et al.*, 1992; Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005). Utsöndringen av dessa hormoner styrs bland annat av koncentrationen av glukos, fria fettsyror och aminosyror i blodet (Sjaastad *et al.*, 2010).

Insulin

Insulin är ett anabolt hormon vars utsöndring främst triggas av glukos- och aminosyrakoncentrationerna i blodet men även av hormoner från tunntarmen. Det produceras av β -cellerna i bukspottkörteln och har som uppgift att öka cellers upptag av glukos och aminosyror, öka syntes av glykogen, triglycerider och proteiner samt minska glukoneogenes och lipolys (Sjaastad *et al.*, 2010). Låga koncentrationer av insulin i plasma gör att lipolys i fettvävnader och koncentrationen av fria fettsyror i plasma ökar (Brockman, 1979). Insulinkoncentrationen blir lägre i blodet efter kalvning (van Knegsel *et al.*, 2007). Lucy *et al.*, (1992) utfodrade en grupp med lakterande mjölkkor med energirikt foder och en grupp med energifattigt foder. Till följd av detta skiljde sig energibalansen mellan dessa grupper. Den grupp som fick energirikt foder hade en energibalans på 5,2 Mcal/dag medan gruppen som utfodrades med energifattigt foder hade en energibalans på -7,0 Mcal/dag. Insulinkoncentrationen i blodet var dock lika för båda energinivåerna (Lucy *et al.*, 1992).

Reist *et al.* (2002) gjorde också mätningar av insulin i blodet. I försöket var insulin signifikant korrelerat till energibalans, dock svagt (0,23). Av denna anledning användes insulin inte i någon av modellerna för uppskattning av energibalans.

IGF-1

IGF-1 produceras i flertalet vävnader men främst i levern genom stimulering av tillväxthormon (GH). IGF-1 har som uppgift att stimulera tillväxt i kroppen och kan vara en indikator på hur mycket GH som utsöndras. GH frisätts när glukos- och aminosyrakoncentrationerna i blodet är höga och koncentrationen av fria fettsyror är låg (Sjaastad *et al.*, 2010). Det finns tendenser till lägre koncentrationer av IGF-1 i plasma hos kor med negativ energibalans. I en studie av Lucy *et al.* (1992) var dock inte resultatet signifikant ($P < 0,08$). Reist *et al.* (2002) fann en signifikant positiv korrelation mellan IGF-1 koncentrationen i plasma och energibalans som var något högre (0,32) än för insulin.

Verktyg för mätning av metaboliska och endokrina parametrar

Herd Navigator är ett verktyg för mätningar av metaboliska och endokrina parametrar på gården. Detta har utvecklats av DeLaval och FOSS, ett danskt företag för analysinstrument. Det har även skett samarbete med Faculty of Agricultural Sciences vid Aarhus University och Danish Cattle Federation (DeLaval, 2012a). Herd Navigator mäter parametrar i mjölken som sedan används i biologiska modeller för beräkning av risken att kon drabbas av störningar i viktiga fysiologiska processer som rör fruktsamhet, hälsa och produktion (Gustafsson, *et al.*, 2008). De parametrar som mäts är progesteron, laktatdehydrogenas (LDH), urea och BHB. Progesteron är indikator för brunst, dräktighet, cystor i äggstockarna och fördröjd cyklicitet. Detta gör att bland annat "tysta brunster", om kon kastar och störningar i kons reproduktionscykel kan upptäckas (Gustafsson *et al.*, 2008). LDH används som indikator för mastit, juverhälsoaspekter tas dock inte upp i detta arbete. Urea används för uppskattning av protein-energibalans och egenskaper hos proteinet i fodret (Gustafsson *et al.*, 2008). Urea mäts även regelbundet i kokontrollen på individnivå vid provmjölkning samt på besättningsnivå i tankmjölken vid varje hämtning till mejeriet (Swensson & Folkesson, 2006). I Herd Navigator används BHB för att upptäcka klinisk och subklinisk acetonemi samt sekundära metaboliska störningar (Gustafsson *et al.*, 2008).

Diskussion

Med tidiga indikatorer på olika störningar och sjukdomar skulle man kunna förhindra att sjukdomen utvecklas och på så sätt skapa en bättre djurvälstånd. Det skulle även kunna ha positiva ekonomiska effekter med lägre veterinärkostnader, bättre dräktighetsresultat och bättre foderstatsoptimering. Det finns många olika metaboliter och hormoner som har föreslagits för användning som markörer för både fruktsamhet och energibalans. Dessa två områden hänger även tätt samman då fruktsamheten påverkas i hög grad av kons energibalans (Pryce *et al.*, 2001; Patton *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2007). I verktyget Herd Navigator används olika metaboliter och hormoner som parametrar för fruktsamhet och metaboliska störningar (Gustafsson *et al.*, 2008). Om en metabolit kunde användas till flera riskbedömningar skulle tid och pengar kunna sparas då färre analyser skulle behövas. Det som mäts bör även vara enkelt att mäta och ge en hög säkerhet i sitt resultat. Detta gör att parametrar som endast kan mätas i blodet är olämpliga för analyser på gården. Detta innefattar metaboliterna NEFA och glukos samt hormonerna insulin och IGF-1.

Metaboliter

Clark *et al.* (2005) var tydlig med att tiden för provtagning relativt till utfodring spelade stor roll vid mätning av ketonkroppar och glukos i blodet. Detta skulle kunna vara en del i förklaringen till varför olika studier har fått olika resultat. Ett utfodringssystem som ger tillgång till foder större delen av dygnet kan tyckas ge en mindre påverkan på metaboliterna i kon då ett jämnare foderintag skulle ge en jämnare nivå av näringsämnen och metabolismrelaterade ämnen i kroppen.

Energibalans

Det finns motsägelsefulla resultat vad det gäller att använda BHB mätt i mjölk som ett verktyg. Clark *et al.*, (2005) fann ingen korrelation mellan mjölk-BHB och energibalans. Däremot fann både Enjalbert *et al.* (2001) och Samiei *et al.* (2010) en positiv korrelation mellan mjölk-BHB och plasma-BHB. Det kan alltså trots resultat från Clark *et al.* (2005) att finnas möjligheter att använda mjölk-BHB som indikator på negativ energibalans och sjukdomar relaterade till detta, exempelvis acetoniemi. Dessutom användes i dag mjölk-BHB som en parameter i Herd Navigator (Gustafsson *et al.*, 2008), vilket ytterligare styrker att BHB i mjölk kan vara ett sätt att kontrollera kons energistatus.

Clark *et al.* (2005) har föreslagit att använda mjölkacetone som indikator på negativ energibalans då denna enligt försöket är starkt korrelerad med plasma-BHB ($r = 0,89$). Även Enjalbert *et al.* (2001) fann en korrelation mellan dessa två parametrar. Mjölket har dessutom en negativ korrelation med energibalans (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005). Enligt dessa resultat skulle i så fall mjölkacetone kunna vara en god kandidat som indikator på negativ energibalans hos kon och på så sätt användas vid riskbedömning för de sjukdomar som kan kopplas till energibalans.

Urea mätt i mjölk har funnits ha en svag korrelation med energibalans (Reist *et al.*, 2002). Frand *et al.* (2003) har istället föreslagit att använda urea som ett mått på protein/energi förhållandet i fodret. Detta synsätt används även i verktyget Herd Navigator. Urea skulle alltså vara ett bättre hjälpmedel för att kontrollera att utfodringen är korrekt än för att förutse problem i energibalans. Urea mäts idag på alla gårdar vid hämtning av mjölk till mejeriet samt vid provmjölkning för kokontrollen (Swensson & Folkesson, 2006). Det är alltså ett hjälpmedel som är lättillgängligt och används i stor utsträckning i dagens produktion.

Även att man funnit korrelationer till energibalans både för NEFA (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005) och glukos (Reist *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005) utgör dessa inte lämpliga indikatorer på energibalans då de endast mäts i blod. Enligt den forskning som sammanfattats i denna studie framkommer det inte om det är möjligt att mäta dessa i mjölk. Däremot har det föreslagits att använda glukos i avelsarbete genom att se vilka individer som bättre hanterar metabolisk stress i tidig laktation (Klein *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2005). Enligt denna litteratursammanställning skulle alltså BHB och acetone vara de metaboliter som bäst förutser energibalans på ett enkelt sätt, genom mätningar i mjölk. Det faktum att BHB redan används för riskbedömning av metaboliska störningar (Gustafsson *et al.*, 2008) kan styrka detta. Som vidare utveckling finns anledning till att även studera huruvida acetone kan öka säkerheten och exaktheten i bedömningen.

Fruksamhet

Höga BHB koncentrationer i blodet har en koppling till försämrade fruktsamhet hos kon i tidig laktation (Walsh *et al.*, 2007; Wathes *et al.*, 2007). Det kan alltså vara möjligt att titta på BHB inte bara för att förutse energibalans utan även för att övervaka kons reproduktiva förmåga.

Ureahalten i mjölken har också betydelse för kons fruktsamhet. Höga koncentrationer ger en försämrad fruktsamhet (Butler *et al.*, 1996; Larson *et al.*, 1997). Butler *et al.* (1996) föreslår att övervaka ureahalten i mjölken för att undvika fruktsamhetsproblem. Urea är en av de metaboliter som mäts med Herd Navigator (Gustafsson *et al.*, 2008). Det finns alltså redan tillgängligt och skulle vara enkelt att använda sig av som hjälpmedel för att motverka försämrad fruktsamhet i besättningen. Dock är urea som tidigare nämnts ett hjälpmedel för kontroll av foderstaten och troligtvis uppkommer andra problem såsom höga foderkostnader tidigare än påverkan på fruktsamhet. Vid tillfällen då fruktsamheten uppfattas som försämrad skulle man dock kunna kontrollera ureavärdet extra i besättningen för att se om detta kan vara en del av orsaken till fruktsamhetsproblemen.

BHB och urea skulle enligt denna studie vara goda kandidater till att användas som indikatorer på kons fruktsamhet. Då dessa redan används i dag med verktyget Herd Navigator skulle man alternativt även kunna använda dem som ett verktyg för kontroll av fruktsamhet, inte bara metaboliska störningar.

Hormoner

Energibalans

De hormoner som tagits upp som indikatorer för energibalans är insulin och IGF-1. Eftersom inget av dessa två hormoner mäts i mjölken passar dessa inte in i arbete på gården. Resultaten för kopplingar till energibalans var heller inte speciellt starka jämfört med de korrelationer som fanns mellan flertalet metaboliter och energibalans. För att fastställa om dessa hormoner har en betydelse som indikatorer på energibalans skulle mer forskning behöva göras. Frågan är dock om detta skulle vara nödvändigt när det finns andra alternativ till indikatorer.

Fruktsamhet

Progesteron föreslås som en indikator på onormala progesteronmönster hos kon (Petersson *et al.*, 2008). Petersson *et al.* (2008) fastslog att mätningar av progesteron kan göras både med korta intervall och med längre, en gång per månad, för att upptäcka onormala proesteronmönster. Det skulle alltså vara möjligt att använda detta även utan en speciell enhet på gården, då man skulle kunna göra progesteronmätningar vid provtagning för kokontrollen. Herd Navigator använder idag progesteronnivåerna i mjölken för bland annat brunstkontroll, fördröjd cyklicitet och dräktighetskontroll (Gustafsson *et al.*, 2008). Det finns många användningsområden för progesteron vilket gör det lämpligt att ha som indikator för fruktsamhet.

Östradiolkoncentrationerna i både mjölk och blod är korrelerade med hur starkt brunstbeteende kon visar (Lyimo *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2002). Lopez *et al.* (2002) fastslog att östradiolkoncentrationen kan användas för att upptäcka brunst vid mjölkning med 12 h intervall. Nackdelen med att använda östradiolkoncentrationen som indikator är att endast ett användningsområde finns för den, jämfört med progesteron som kan användas för flera egenskaper.

Anti-Mülleriskt hormon föreslås som indikator på det unga djurets reproduktiva livslängd. Detta skulle därför kunna användas i avelsarbete för att selektera de mest fertila individerna (Ireland *et al.*, 2008). För att kunna användas för djurets nuvarande reproduktiva förmåga skulle dock mer forskning behövas för att fastställa om det finns kopplingar mellan anti-Mülleriskt hormon och dräktighetsresultat (Ireland *et al.*, 2008). Det är alltså inte aktuellt att

använda detta hormon på gården, men eftersom fruktsamheten påverkas i stor grad av avelsarbetet kan det ändå vara ett hjälpmedel för att förbättra kornas fruktsamhet i framtiden. Mer forskning behövs dock innan några slutsatser kan dras.

Av de hormoner som har tagits upp här är progesteron det som har mest lovande egenskaper som indikator på fruktsamhet. Det har ett brett användningsområde och kan mätas i mjölk. Det kan även mätas med längre intervall vilket gör det möjligt att mäta det på samma sätt som urea på individnivå vid provmjölkning för kokontrollen (Swensson & Folkesson, 2006; Petersson *et al.*, 2008).

Slutsats

Enligt denna litteraturstudie finns det flertalet metaboliter och hormoner som kan användas som indikatorer för fruktsamhet och produktionsstörningar. Vissa är mer lämpade än andra på grund av mätmetod och användningsområden. BHB kan användas som indikator både för rubbningar i energibalans och fruktsamhet. Även urea har flera användningsområden då det kan användas för att kontrollera protein/energi-balans i fodret men även fruktsamhet. Det hormon som passar bäst för mätningar av fruktsamhetsparametrar är progesteron då detta kan användas för brunstkontroll men även för att upptäcka flertalet reproduktionsstörningar och problem. Alla dessa ämnen kan mätas i mjölken direkt på gården vilket gör dem till bra kandidater som indikatorer för fruktsamhet och produktionsstörningar.

Litteraturförteckning

- Allrich, R. D. 1994. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77, 2738–2744. Abstract.
- Banos, G., Coffey, M. P., Wall, E., Brotherstone, S. 2006. Genetic relationship between First-lactation body energy and later-life udder health in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86, 2222-2232.
- Boer, H. M. T., Veerkamp, R. F., Beerda, B., Woelers, H. 2010. Estrous behavior in dairy cows: identification of underlying mechanisms and gene functions. *Animal* 4:3, 446-453.
- Butler, W. R., Calman, J. J., Beam, S. W. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy tare in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74, 858-865.
- Brockman, R. P. 1979. Roles for insulin and glucagon in the development of ruminant ketosis – A Review. *The Canadian Veterinary Journal* 20, 121-126.
- Clark, C. E. F., Fulkerson, W. J., Nandra, K. S., Barchia, I., Macmillian, K. L. 2005. The use of indicators to assess the degree of mobilization of body reserves in dairy cows in early lactation on a pasture-based diet. *Livestock Production Science* 94, 199-211.
- Darwash, A. O., Lamming, G. E., Woolliams, J. A. 1999. The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in post-partum dairy cows. *Animal Science* 68, 33-347.
- DeLaval. Mars 2012a. <http://www.delaval.se/-/Produkt-Information/Management/Systems/Herd-navigator/>
- DeLaval. Mars 2012b. <http://www.delaval.se/-/Produkt-Information/Management/Systems/Herd-navigator/Hur-Herd-Navigator-fungerar/>
- Dobson, H., Smith, R. F., Royal, M. D., Knight, C. H., Sheldon, I. M. 2007. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals* 42, 17-23.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R. 2001. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science* 84, 583-589.

- Frand, X., Froidmont, E., Bartiaux-Thill, N., Decruyenaere, V., Van Reusel, A., Fabry, J. 2003. Utilization of milk urea concentration as a tool to evaluate dairy herd management. *Animal Research* 52, 543-551.
- Gustafsson, H., Gustafsson, A. H., Andersson, I., Persson, Y. Svensk mjölk. 2008. Så fungerar de biologiska modellerna i Herd Navigator. *Forskning Special* 19.
- Ingvartsen, K. L., Dewhurst, R. J., Friggens, N.C. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that causes production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science* 83, 277-308.
- Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Perez, G. I., Evans, A. C. O., Ireland J.J. 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction* 79, 1219-1225.
- Kafi, M., Mirzaei, A. 2010. Effect of first postpartum progesterone rise, metabolites, milk yield, and body condition score on the subsequent ovarian activity and fertility in lactating Holstein dairy cows. *Tropical Animal Health and Production* 42, 761-767.
- Klein, M. S., Almsetter, M. F., Schlamberger, G., Nürnberger, N., Dettmer, K., Oefner, P. J., Meyer, H. H. D., Wiedemann, S., Gronwald, W. 2010. Nuclear magnetic resonance and mass spectrometry-based milk metabolomics in dairy cows during early and late lactation. *Journal of Dairy Science* 96, 1539-1550.
- La Marca, A., Volpe, A. 2006. Anti-Müllerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulation AMH a useful tool?. *Clinical Endocrinology* 64, 603-610.
- Larson, S. F., Butler, W. R., Currie, W. B. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science* 80, 1288-1295.
- Lopez, H., Satte, L. D., Wiltbank, M. C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 81, 209-223.
- Lopez, H., Much, T. D., Shipka, M. P. 2002. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 72, 37-46.
- Lucy, M. C., Beck, J., Staples, C. R., Head, H. H., De La Sota, R. L., Thatcher, W. W. 1992. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. *Reproduction Nutrition Development* 32, 331-341.
- Lyimo, Z. C., Nielen, M., Ouweltjes, W., Kruip, T. A. M., van Eerdenburg, F. J. C. M. 2000. Relationship among estradiol cortisol and intensity of estrous behaviour in dairy cattle. *Theriogenology* 53, 1783-1795.
- Nielsen, I. N., Friggens, N. C., Chagunda, M. G. G., Ingvartsen, K. L. 2005. Predicting risk of ketosis in dairy cows using in-line measurements of β -hydroxybutyrate: a biological model. *Journal of Dairy Science* 88, 2441-1453.
- Patton, J., Kenny, D. A., McNamara, S., Mee, J. F., O'Mara, F. P., Diskin, M. G., Murphy, J. J. 2007. Relationship among milk production, energy balance, plasma analytes, and reproduction in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* 90, 649-658.
- Petersson, K.-J., Gustafsson, H., Stradnberg, E., Berglund, B. 2006. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 2529-2538.
- Petersson, K.-J., Strandberg, E., Gustafsson, H., Royal, M. D., Berglund, B. 2008. Detection of delayed cyclicity in dairy cows based on progesterone content in monthly milk samples. *Preventive Veterinary Medicine* 86, 153-163.
- Pfaff, D. 2005. Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviours. *Journal of Endocrinology* 184, 447-453.
- Pryce, J. E., Coffey, M. P., Simm, G. 2001. The relationship between body condition score and reproductive performance. *Journal of Dairy Science* 84, 1508-1515.

- Pryce, J. E., Esslemont, R. J., Thompson, R., Veerkamp, R. F., Kossaibati, M. A., Simm, G. 1998. Estimation of genetic parameters using health, fertility and production data from a management recording system for dairy cattle. *Animal Science* 66, 577-584.
- Pryce, J. E., Royal, M. D., Gransworthy, P. C., Mao, I. L. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86, 156-135.
- Reist, M., Erdin, D., von Euw, D., Tschuemperlin, K., Leueberger, H., Chilliard, Y., Hammon, H. M., Morel, C., Philipona, C., Zbinden, Y., Kuenzi, N., Blum, J. W. 2002. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 3314-3327.
- Roche, J. F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96, 282-296.
- Royal, M. D., Darwash, A. O., Flint, A. P. F., Webb, R. Woolliams, J. A., Lamming, G. E. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science* 70, 487-501.
- Royal, M. D., Flint, A. P. F., Woolliams, J. A. 2002. Genetic and phenotypic relationships among endocrine and traditional fertility traits and production traits in Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science* 85, 958-967.
- Samiei, A., Liang, J. B., Ghorbani, G. R., Hirooka, H., Yaakub, H., Tabatabaei, M. 2010. An evaluation of beta-hydroxybutyrate in milk and blood for prediction of subclinical ketosis in dairy cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 13, 349-356. Abstract.
- Sjaastad, Ø. V., Sand O., Hove, K. 2010. *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition, 236-749. Scandinavian Veterinary press, Oslo, Norway.
- Stengårde, L. 2010. Displaced abomasum and ketosis in dairy cows. Doctoral thesis. Dept. of Clinical Science, Swedish University of Agricultural Science. *Acta Universitatis agriculturae Sueciae*, vol 2010:56.
- Stengårde, L., Holtenius, K., Emanuelsson, U., Hultgren, J., Niskanen, R., Tråvén, M. 2011. Blood parameters in Swedish dairy herds with high or low incidence of displaced abomasum or ketosis. *The Veterinary Journal* 190, 124-130.
- Swensson, C., Folkesson, P. 2006. Uppföljning av Greppa rådgivning på mjölkgårdar – grepparådgivningen sänker mjölkens ureahalt? *Svensk Mjölk Forskning Rapport 7055*, 1-20.
- Van Knegsel, A. T. M., van den Brand, H., Graat, E. A. M., Dijkstra, J., Jorritsma, R., Decuypere, E., Tamminga, S., Kemp, B. 2007. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: metabolites and metabolic hormones. *Journal of Dairy Science* 90, 1477-1485.
- Veerkamp, R. F., Oldenbroek, J. K., Van Der Gaast, H. J., Van Der Werf, J. H. J. 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. *Journal of Dairy Science* 86, 577-583.
- Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Duffield, T. F. 2007. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum, dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 2788-2796.
- Wathes, D. C., Mourne, N., Cheng, Z., Mann, G. E., Taylor, V. J., Coffey, M. P. 2007. Multiple correlation analyses of metabolic and endocrine profiles with fertility in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1310-1325.
- Westwood, C. T., Lean, I. J., Garvin, J. K. 2002. Factors influencing fertility of Holstein dairy cows: a multivariate description. *Journal of Dairy Science* 86, 3225-3237.