



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

**SPÄDNINGSVÄTSKANS PÅVERKAN PÅ VAGINAS MIKROBIOLOGISKA
NORMALFLORA HOS STO I SAMBAND MED INSEMINATION**

Karin Danielsson

Uppsala

2010

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:29*

**SPÄDNINGSVÄTSKANS PÅVERKAN PÅ VAGINAS MIKROBIOLOGISKA
NORMALFLORA HOS STO I SAMBAND MED INSEMINATION**

Karin Danielsson

*Handledare: Anne-Marie Dalin, Institutionen för kliniska vetenskaper SLU
och Christina Greko, Statens veterinärmedicinska anstalt*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

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

Nyckelord: gentamicin, normalflora, INRA96^R, vagina, sto, häst, inseminering, antibiotikaresistens

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
EXAMENSARBETE 2010:29*

INNEHÅLL

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY.....	2
Inledning.....	3
Betäckningssäsong och brunst hos sto	3
Artificiell inseminering	3
Samling och hantering av sperma	4
Vaginal bakterieflora hos häst.....	4
Förekomst av Streptococcus equi subsp zoepidemicus i reproduktionsorganen (Str.zoepidemicus).....	5
Förekomst av E.coli i reproduktionsorganen	5
Normalflora som infektionsorsak.....	5
Antibiotikas påverkan på normalflora.....	6
Antibiotikas påverkan på tarmfloran hos häst.....	6
Antibiotikas påverkan på vaginal E.coli kolonisering	7
Resistensläget hos bakterier från häst i Sverige	7
Streptococcus zoepidemicus.....	7
Escherichia coli	8
Meticilinresistenta Staphylococcus aureus (MRSA).....	8
Spädningsvätskans påverkan på vaginas mikrobiologiska normalflora hos sto i samband med insemination.....	8
SYFTE	8
Material och Metoder	9
Förstudie 1.....	9
Förstudie 2.....	9
Pilotstudie.....	9
RESULTAT	11
Koloniantal	11
DISKUSSION	14
Referenser	17

SAMMANFATTNING

Frågan om multiresistenta bakterier hos djur och människa har aktualiserats de senaste åren. Den ökade resistensproblematiken beror bland annat på en alltför omfattande användning av antibiotika inom både human- och veterinärmedicin.

Antibiotika är en beståndsdel i de spädningssvtskor som används vid inseminering. Idag insemineras majoriteten av svenska ston med spädningssvtska innehållande bland annat gentamicin (INRA96^R).

Syftet med föreliggande pilotstudie var att undersöka om spädningssvtskan påverkar normalfloran i vagina hos ston som inseminerats med sperma spädd med spädningssvtskan INRA96^R (innehållande *gentamicin*, penicillin och amphotericin B).

Materialet samlades på två stuterier från totalt 17 ston. Prover togs i bakre delen av vagina på ston före och efter inseminering och odlades sedan ut på tre olika medier: ett icke-selektivt medium (blodagar), ett selektivt medium för koliforma bakterier (MacConkey) samt, för att direkt kunna avgöra om andelen antibiotikaresistenta bakterier ökade, också på blodagar med tillsatt gentamicin (4mg/L). Därefter avlästes plattorna avseende bakterietillväxt (antal kolonier) och morfologiskt överensstämmande bakterietyper. För varje sto jämfördes prover tagna före respektive efter inseminering.

Resultaten visade att antalet bakteriekolonier på det icke selektiva mediet efter inseminering var något lägre hos 5 ston, högre hos 3 ston och samma hos 6 ston jämfört med före inseminering. Den vanligast förekommande bakterien var morfologiskt överensstämmande med β -hemolyserande streptokocker. Antalet kolonier på det gentamicintillsatta mediet var efter inseminering lägre hos 4 ston, högre hos 4 ston och oförändrat hos 6 ston jämfört med före inseminering. Det var ingen klar skillnad, vare sig på det selektiva eller icke selektiva medierna, gällande bakteriemorfologi före eller efter inseminering.

Sammantaget kunde i denna pilotstudie inte visas någon förändring i bakteriefloran i vagina hos sto före och efter inseminering med INRA96^R avseende bakterietillväxt och diversitet samt selektion för gentamicinresistens. Antalet ston var dock få och frågeställningen bör därför belysas ytterligare.

SUMMARY

The discussion about multi-drug resistant bacteria in animals and human has been intensified in recent years. The increased problem of antibiotic resistant bacteria is probably related to a too high use of antibiotics in both human and veterinary medicine.

Extenders for stallion semen contain antibiotics. Nowadays, a majority of Swedish mares are inseminated with extender containing gentamicin (INRA96^R).

The purpose of this pilot study was to examine whether the extender INRA96[®], containing gentamicin, penicillin and amphotericin B, affects the vaginal microbiota in inseminated mares. The material was collected on two stud farms from a total of 17 mares. One sample from vestibulum for culture was taken before and another sample was taken after insemination. The samples were cultured on three different media, a non-selective medium (blood agar), a selective medium for coliform bacteria (MacConkey) and a selective medium for gentamicinresistant bacteria (blood agar with the addition of gentamicin (4mg/L)). After a 24 hour incubation period in 37 degrees Celsius the samples were examined for bacterial growth and morphology. For every individual mare a comparison between samples taken before and after insemination was made. Samples taken after insemination (non-selective medium) showed a slightly lower number of bacterial colonies in 5 mares, a higher number in 3 mares and unchanged number in 6 mares. The most commonly observed colony type was morphologically consistent with β -haemolytic streptococci. The number of bacterial colonies growing on the medium with gentamicin was lower in 4 mares, higher in 4 mares and unchanged in 6 mares after insemination compared with before insemination. When comparing the selective and non-selective media, no clear morphological difference was found.

To sum up, this pilot study did not show any change in the vaginal micro flora in mares after insemination with semen containing the extender INRA96[®] concerning bacterial growth, diversity and selection of gentamicin resistant bacteria. The number of mares was however low and further studies are therefore needed.

INLEDNING

Betäckningssäsong och brunst hos sto

Ston är säsongsmässigt polyöstrala, vilket innebär att de har en ovulatorisk och en anovulatorisk period under året. Betäckningssäsongen är därför begränsad från mitten av mars till mitten av augusti, med den mest aktiva perioden från maj till mitten av juni. Faktorer som påverkar ett stos säsongsmässighet är bland annat ras, ålder och miljö (Kindahl, 2000).

En brunstcykel är vanligen 21 dagar och delas in i proöstrus, östrus, metöstrus och diöstrus. Ovulation sker 1-2 dygn före brunstens slut. Unikt för ston är att ovulation kan förekomma under progesteronfasen, s.k. diöstrusovulation. Ovulationen leder till bildande av en gulkropp, corpus luteum. Livslängden för corpus luteum hos ett icke dräktigt sto är 14-15 dagar. Luteolys sker till följd av produktion av prostaglandin från endometriet. Är stoet dräktigt kommer embryot att skicka signaler, s.k. maternal recognition of pregnancy, så att dräktigheten kvarstår. (Kindahl, 2000)

Artificiell inseminering

Artificiell inseminering (AI), började användas i Sverige under slutet av 1970- på varmblodiga travare (Söderquist, 2000). AI hos häst har genom åren fått en ökad popularitet tack vare dess fördelar jämfört med naturlig betäckning. År 2008 betäcktes 97 % travare och 94 % svenskt halvblod genom artificiell inseminering (Svenska Travsportens Centralförbund, STC, resp. Avelsföreningen för Svenska Varmblodiga Hästen, ASVH; Anne-Marie Dalin pers. meddelande).

Fördelar med AI jämfört med naturlig betäckning är till exempel att sto och hingst ej behöver vara på samma plats, det går att använda ett ejakulat till flera ston och risken för skador hos hingst och sto minskar. Dessutom minskar risken att sprida veneriska sjukdomar och det går att bedöma spermakvalitet hos hingsten. Det finns även nackdelar med artificiell insemination, bland annat kan sperma sprida virusmitta till flera ston (Söderquist, 2000).

Insemination av ston ska enligt svenska föreskrifter ske på en seminestation (SJVFS 1999:113). Där undersöks stoet först gynekologiskt med rektalisering och ultraljud av livmoder och äggstockar för att fastställa att hon är frisk samt för att beräkna ovulationstidpunkt. Optimal tid för inseminering är så nära inpå ovulation som möjligt. Oftast insemineras ett sto mer än en gång i en brunst .

Samling och hantering av sperma

Hingsten som skall samlas på sperma bestiger vanligen en fantom och ejakulatet samlas upp med hjälp av en artificiell vagina. Därefter filtreras gelfraktionen i ejakulatet bort och volym, densitet och spermamotilitet (rörelse) kontrolleras. För att spermerna skall överleva tillsätts spädningssväska. Spädningssvätskan har flera uppgifter. Den skall öka volymen, buffra, ge näring (energi) och bidra med ett pH där spermerna trivs. Till spädningssvätskan sätts även antibiotika i syfte att hämma bakterieväxt i sperman (Söderquist, 2000).

Idag uppskattas att ca 80 % av svenska ston insemineras med spädningssvätskan INRA96^R och de flesta övriga med spädningssvätskan enligt Kenney (Dalin, personligt meddelande). INRA96^R utvecklades till att börja med för användning till kyld sperma (mellan 4°C till 15°C) och har varit på marknaden sedan år 2000. Innehållet i INRA96^R är bl.a. rena fraktioner av mjölkprotein (kasein) samt antibiotika; gentamicin, penicillin och en fungicid (amphotericin B). Det finns inga uppgifter om koncentrationen av antibiotika i INRA96^R. Kenney's innehåller fettfritt mjölkprotein, glukos, streptomycin och penicillin (Kenney et al., 1975).

Inseminationsdosen av färsk eller kyld sperma är ca 10-20 ml i volym. Andelen motila spermier i en dos bör överstiga 50 %. En inseminations dos ska innehålla minst 500 miljoner motila spermier vid färsk sperma och 1000 miljoner motila spermier ifall sperman inte skall användas direkt utan istället kylas. Sänkning av temperaturen hos sperman ger en ökad överlevnadstid. Rekommenderad kvot mellan spädningssväska och ejakulat är minimum 1:1 (Söderquist, 2000).

Vaginal bakterieflora hos häst

Studier över vaginas normalflora hos ston visar olika resultat, vilket sannolikt beror på skillnader i material och metoder. Scot och medarbetare (1971) tog vaginala bakterieprover från slaktade ston (100 st.), medan Hinrichs och medarbetare (1988) och Ricketts och medarbetare (1993) provtog levande ston (48 respektive 1000 st.). Scot och medarbetare (1971) tog bakterieprover från vagina, portio, cervix och uterus, medan Hinrich och medarbetare (1988) tog bakterieprover från andra delar av könsorganet, nämligen uterus, vagina, vestibulum och fossa klitoris. Ricketts och medarbetare (1993) i sin tur tog rutinmässiga bakterieprover enbart från fossa klitoris.

En annan skillnad är att Hinrichs och medarbetare (1988) hade med kliniskt friska ston utan några dokumenterade reproduktionsproblem, medan Scot och medarbetare (1971) inte gjorde något urval bland stona innan de slaktades. Istället utförde Scot och medarbetare (1971) en makroskopisk och histologisk undersökning av slaktmaterialet. Ricketts och medarbetare (1993) angav inte om de provtagna stona var gynekologiskt friska eller ej. Ytterligare en faktor som skiljer studierna åt är att Hinrichs och medarbetare beskrev när i brunstcykeln proverna togs, vilket varken angavs av Scott och medarbetare (1971) eller

Ricketts och medarbetare (1993). Till detta kommer att studierna hade olika metoder för provhantering, odling och identifiering av bakterier.

Trots skillnader mellan dessa studier framgår att bakteriefynd i genitalia hos ston generellt utgörs av en blandflora med kommensaler och eventuellt omgivningsbakterier (Scot et al 1971, Ricketts et al., 1993; Hinrichs et al 1988). Vanligt förekommande aeroba bakterier är bland annat β -hemolyserande streptokocker, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.* m.m. (Ricketts et al 1993; Hinrichs et al 1988; Scot et al 1971). Bakteriearter och antal bakterier varierar inom den tubulära delen (Hinrichs et al 1988; Scot et al., 1971; Newcombe, 1978), ju längre in i tubulära organet desto färre bakterier. Uterus är vanligen steril (Hinrichs et al., 1988).

Förekomst av *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* i reproduktionsorganen (*Str.zooepidemicus*)

Scot och medarbetare (1971) påvisade *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* (*Str. zooepidemicus*) i 66 % av prover från vagina. Detta resultat står i motsats till Hinrichs och medarbetare (1988) som inte detekterade *Str. zooepidemicus* i de vaginala proverna. Hinrichs och medarbetare (1988) hittade däremot *Str. zooepidemicus* i 42 % av proverna från fossa klitoris samt i 14 % av prover från vestibulum. Resultat varierade även mellan studierna gällande prover tagna i uterus. Där rapporterade Scott och medarbetare (1971) en 10 % förekomst av *Str. zooepidemicus* medan Hinrichs och medarbetare (1971) inte påträffade streptokocker. Båda studierna visade dock att vid bakterieförekomst i uterus påvisas vanligen samma typ av bakterie i vagina. Liknande resultat rapporteras av Newcombe (1978).

Förekomst av *E.coli* i reproduktionsorganen

Scot och medarbetare (1971) rapporterade växt av *E. coli* i ca 60 % av vaginala bakterieprover, medan Hinrichs och medarbetare (1988) inte påträffade *E. coli* i vagina, men däremot i vestibulum och fossa klitoris (29 %). Ricketts och medarbetare (1993) rapporterade förekomst av *E. coli* i 72 % av prover från fossa klitoris. De olika resultaten kan bero på ovannämnda skillnader i studiernas upplägg.

Normalflora som infektionsorsak

Det är väl känt att bakteriella infektioner i reproduktionsorganen kan orsaka fertiletetsproblem hos sto. Opportunistiska patogener i vaginas normalflora i är bl.a. *Str. equi subsp zooepidemicus* och *E. coli* (Casey et al., 2006). Dessa är de vanligast förekommande bakterierna i samband med reproduktionsproblem hos sto. Vid endometrit hos häst förekommer bakterier oftast i renkultur (Wittenbrink et al, 2008). Le Blanc och medarbetare

(2007) rapporterade om förekomst av *E.coli* och *Str. equi subsp zooepidemicus* i uterusprover hos ston med reproduktionsproblem. Albihn och medarbetare (2003) visade att *E. coli* var den vanligast förekommande bakterien som isolerades från uterusprover hos sto med reproduktionsproblem. Studien visade dessutom att *E.coli* i första hand förknippas med omlöp och i andra hand med klinisk endometrit. Den näst mest förekommande bakterien i samma studie var β -hemolyserande streptokocker, som främst sågs vid fall av klinisk endometrit (Albihn et al., 2003).

Antibiotikas påverkan på normalflora

Det är väl etablerat att en individs normalflora fungerar som en skyddsbarriär mot opportunistiska bakterier genom att konkurrera om bland annat utrymme och näring. Den kontroll som normalfloran utövar på opportunisterna benämns på engelska "*colonialisation resistance*", motstånd mot kolonisering (Sullivan et al 2001).

Studier inom humanmedicin har visat att antibiotikas påverkan på normalfloran är beroende av antibiotikas spektra, administrering, dos samt farmakokinetik och farmakodynamik (Sullivan et al 2001). Oralt administrerad antibiotika som inte absorberas fullständigt kan leda till störningar i tarmfloran (Floor et al 1994; Edlund et al 1994; Brismar et al 1993). Elimineras antibiotikan ur kroppen i aktiv form via njurarna kan en liknande störning ske i den vaginala normalfloran (Sullivan et al 2001). En konsekvens av störd normalflora till följd av antibiotikabehandling är att resistenta bakterier får möjlighet att etablera sig och konkurrera ut känsliga bakterier. Detta kan leda till en ökning av andelen antibiotikaresistenta mikroorganismer (Ohm-Smith et al 1986; Austin et al 2005).

Vad gäller djur har studier som visar att antibiotika påverkar den vaginala normalfloran utförts på bland annat apor (Herhtelius et al 1989) och hundar (Ström och Linde-Forsberg 1993). Publicerade studier om antibiotikas påverkan på vaginas normalflora hos häst har inte påträffats vid litteratursökning. Däremot förekommer studier som visar att den intestinala normalfloran hos häst påverkas av antibiotika (Ensink et al., 1996; Gustafsson et al., 1997).

Antibiotikas påverkan på tarmfloran hos häst

Hästar som behandlas med antibiotika kan drabbas av en störd tarmflora med diarré som följd (Ensink et al., 1996; Båveryd et al., 1998). I vilken utsträckning tarmens normalflora påverkas av antibiotika är bland annat beroende av vilken sorts antibiotika som används (Ensink et al., 1996).

Antibiotikas påverkan på vaginal *E.coli* kolonisering

I slutet av 1980- och början på 1990-talet utfördes studier på apor för att utröna hur olika antibiotika påverkar risken för *E. coli* kolonisation av vaginalslemhinnan. Samtliga studier utfördes på ett liknande sätt genom att 4-5 apor vid upprepade tillfällen först sköljdes vaginalt med en lösning innehållande *E. coli*. Sedan togs bakteriesvabbar med hjälp av en provpinne som rullades mot vaginalslemhinnan, och det undersöktes ifall det skett en kolonisering med *E. coli*. Därefter sköljdes aporna dagligen vaginalt med en lösning innehållande antibiotika under ungefär en veckas tid. När aporna sköljts med antibiotika i några dagar så sköljdes de ytterligare en gång med *E. coli* lösningen. Därefter togs ytterligare vaginalprover för att undersöka om *E. coli* bakterier koloniserat vaginal slemhinnan.

De olika typer av antibiotika som studerades i försöken var; amoxicillin (Herthelius et al., 1988), trimetoprim och nitrofurantoin (Herthelius-Elman et al., 1991) och cefadroxil (Gezelius et al., 1993). Koncentrationen i vagina låg för samtliga studerade antibiotika något över den koncentration som kan uppmätas i urin vid per oral behandling med respektive substans (Gezelius et al., 1993).

Sammantaget visade ovanstående studier att *E. coli* vanligen inte kunde återisoleraras från försöksdjuren innan antibiotikaexponering, men väl efter. Detta tolkas som att vaginalt administrerad antibiotika kunde leda till minskat motstånd mot kolonisering av vaginalfloran. Spontan *E. coli* kolonisering av vaginalslemhinnan hos ett fåtal individer i samband med antibiotika behandling finns också rapporterad (Sullivan et al., 2005; Herthelius-Elman et al., 1991; Herthelius et al., 1989). Möjligheten för *E. coli* att kolonisera vaginalslemhinnan var beroende av vilken antibiotika som användes. (Herthelius et al., 1988; Herthelius-Elman et al., 1991; Gezelius et al., 1993).

Resistensläget hos bakterier från häst i Sverige

I den svenska övervakningen av antibiotikaresistens sammanställs bl.a. resultat av diagnostiska prover som sänts till SVA för bakteriologisk undersökning. Årligen rapporteras, från häst, resultat av bakteriers antibiotikakänslighet avseende *Str. equi subsp zooepidemicus* från luftvägarna och *E. coli* från reproduktionsorganen (SVARM 2008).

Streptococcus equi subsp zooepidemicus

Str. equi subsp zooepidemicus är fortfarande genomgående känslig mot penicillin. Resistens mot kombinationen trimetoprim-sulfonamid hos *Str. equi subsp zooepidemicus* har ökat i takt med den ökade användningen av kombinationspreparat med dessa substanser. (SVARM 2008).

Escherichia coli

Resistens hos *E. coli* från häst mot trimetoprim-sulfonamid och streptomycin är relativt vanligt. Gentamicinresistenta *E. coli* har däremot inte ökat hos häst under det senaste decenniet. År 2008 var endast 2 % (3st) av de prover som skickats till SVA gentamicinresistenta. Intressant är att gentamicinresistens hos häst i Sverige enbart påträffats hos multiresistenta isolat (SVARM, 2004; 2008). Andelen multiresistenta isolat hos häst 2008 var 5 %, varav ett var resistent mot tredje generationens cefalosporiner genom produktion av s.k. ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase)(SVARM, 2008).

Meticilinresistenta Staphylococcus aureus (MRSA)

MRSA är ett problem över hela världen. Tidigare påvisades meticilinresistenta stafylokocker enbart inom humanmedicin, men förekommer idag också i varierande omfattning hos djur. Det första fallet hos djur i Sverige konfirmerades 2006 och sedan dess har ett 20-tal fall påvisats hos djurslagen hund, katt och häst. I detta sammanhang är det viktigt att vara medveten om att MRSA kan smitta mellan djur och människa, vilket fordrar ett noggrant handhavande när det gäller smittade djur. Inom humanmedicinen är MRSA kategoriserat som allmänfarlig och anmälningspliktig enligt smittskyddslagen. Avseende djur gäller anmälningsplikt för MRSA sedan 1 januari 2008 (SVARM 2008: SJVFS 2002:16).

SPÄDNINGSVÄTSKANS PÅVERKAN PÅ VAGINAS MIKROBIOLOGISKA NORMALFLORA HOS STO I SAMBAND MED INSEMINATION

Användningen av antibiotika påverkar utvecklingen av resistent bakterier (Sullivan 2001). Idag används antibiotika i spädningvätskan vid AI för att hämma bakterieväxt i sperman. INRA96^R som är den vanligast förekommande spädningvätska innehåller både penicillin och gentamicin. Det kan inte uteslutas att dessa antibiotika kan komma i kontakt med stoets vaginala normalflora och orsaka en störning. Studier som belyser ämnet har dock inte påträffats vid litteratursökning. Det behövs därför mer kunskap om hur de antibiotika som används i dagsläget påverkar normalfloran med eventuell resistensutveckling till följd.

SYFTE

Syftet med denna pilotstudie var att undersöka om normalfloran i vagina (vestibulum) hos ston påverkades efter insemination med sperma spädd med en spädningvätska innehållande gentamicin, penicillin och amphotericin B.

MATERIAL OCH METODER

Förstudie 1

För att optimera provtagningsmetoden provtogs ston vid avdelning för reproduktion, institutionen för kliniska vetenskaper. Prover togs från tre ston ca 10 cm lateralt in i vestibulum. Varje sto provtogs två gånger vid samma tillfälle; ena provet togs med fuktad provpinne och det andra med en torr. Proverna odlades på icke-selektiv blodagar vid enheten för Djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA. Endast ett av proverna var positivt avseende bakterieväxt. Fem ston provtogs därefter med fuktad provpinne ca 3 respektive 6 cm in i vestibulum. Odlingar visade att de prover som togs mer kaudalt oftare gav bakterieväxt jämfört med prover tagna mer kranialt.

Förstudie 2

För att jämföra odlingsresultat från prover tagna från samma häst togs fem prover från ett och samma sto. Tre prover togs på kvällen med ca 10 sekunders mellanrum och två prover togs morgonen därpå med samma tidsintervall. Stoet inseminerades ej mellan provtagningsomgångarna. Proverna odlades enligt metoden som beskrivs för pilotstudien nedan. Resultaten bedömdes genom okulär jämförelse av odlingar från de olika provtagningsomgångarna. Kolonier bedömdes makroskopiskt avseende antal och morfologiskt utseende. Bäst överensstämmande var de prover som tagits vid samma provtagningsstillfälle, men växten var sammantaget liknande vid båda provtagningsstillfällena.

Pilotstudie

Försöksgruppen bestod av totalt 17 varmbloodsston som inseminerades på två stuterier (A & B) i Mellansverige, 10 ston provtogs från stuteri A och 7 ston från stuteri B. Ston vid stuteri A provtogs i början på juni, medan provtagningen av stona vid stuteri B skedde i slutet av juli.

Inkluderade ston i försöket skulle vara av rasen varmbloodig travare. Första provtagningen skulle ske innan stoet inseminerats på gällande brunst. Det gjordes däremot inget urval ifall stona inseminerats under tidigare brunst samma säsong.

Exklusionskriterier var att inga prover togs från fölbrunsten utan tidigast 30 dagar efter fölning. Varken ston eller deras föl fick behandlas med antibiotika under provtagningen.

Med ledning av resultat i de båda förstudierna togs prov 3-6 cm in i vestibulum. För att minska risken för kontamination fördes svansen åt sidan, svanslinda användes på stuteri A, men ej på stuteri B. Sedan tvättades yttre genitalia med vatten och mildtvål. På stuteri A användes dusch, medan rengöringen på stuteri B utfördes med hjälp av en tvättlapp som

doppades i en hink med vatten och tvål. Varje sto fick en ny tvättdopp, men hinken med tvättvatten var densamma. Därefter fuktades en provpinne genom att den doppades i sitt transportmedium (Codan Amiers). Vulvaläpparna särades och provpinnen fördes in 3-6 cm i vestibulum. Provpinnen rullades med hårt tryck i cirka 10 sekunder mot vaginalslemhinnans vänstra sida på ett område av 2-4 cm och återfördes därefter till transportmediet.

Varje sto provtogs två gånger. Det första provet (kontroll) togs inom 24 timmar före insemination och det andra provet inom 40 – 60 timmar efter inseminering.

Efter provtagning förvarades proverna kylt och odlades inom 12 timmar. Odlingen gjordes vid enheten för Djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA. Tre olika medier inköpta från SVA användes för utodling av proverna. Ett medium var icke-selektivt (blodagar), det andra mediet var selektivt för koliforma bakterier (MacConkey) och det tredje var selektivt för gentamicinresistenta bakterier (blodagar tillsatt med 4mg/L gentamicin). Efter ett dygns inkubation i 37 grader avlästes odlingarna eller förvarades i kyl i väntan på avläsning.

Avläsning skedde genom okulär inspektion av odlingarna avseende antal kolonier samt makroskopiskt utseende hos de kolonier som växt ut. Antalet kolonier kategoriserades enligt följande:

- 0= ingen växt
- 1= enstaka kolonier (1-5 kolonier)
- 2= sparsam växt (6-25 kolonier)
- 3= måttlig växt (26-75 kolonier)
- 4 = riklig växt(>75 kolonier.)

Koloniernas morfologi bedömdes enligt gängse kriterier (Krieg och Holt, 1984). Kolonier av samma morfologiska typ (morfovarer) antogs tillhöra samma artgrupp t.ex. liten vit med hemolys, liten vit utan hemolys. Kolonier med morfologi överensstämmande med beta-hemolyserande streptokocker eller α -hemolyserande streptokocker grupperades som sådana. Det utfördes ingen identifiering därutöver. Resultaten antecknades i ett avläsningsprotokoll och överfördes till en datafil. Ingen statistisk bearbetning gjordes.

RESULTAT

Av 17 provtagna ston uteslöts 3 ston ur pilotstudien. 2 av 10 ston uteslöts (stuteri A) på grund av att de ovulerat innan inseminering och 1 av 7 (stuteri B) på grund av insatt antibiotikabehandling. Åldern för provtagna ston var 4 till 17 år (stuteri A) och 4 till 15 år (stuteri B). Medianåldern var 9 år för både stuteri A och stuteri B. Sex av stona vid stuteri A hade föl vid sidan jämfört med två ston vid stuteri B. På stuteri A hade ett sto inseminerats vid tre tidigare brunster innan provtagningstillfället. Övriga ston på samma stuteri provtogs i samband med deras första inseminering för säsongen. På stuteri B var det bara ett sto som provtogs i samband med hennes första inseminering för säsongen. Av de övriga fem hade tre ston inseminerats vid två tidigare brunster och två ston vid en tidigare brunst med utebliven dräktighet.

För 11 ston skedde första provtagning samma dag som de inseminerades, övriga ston (3st) provtogs dagen innan inseminering. Tiden som gick mellan första provtagning och inseminering varierade från ca 22 timmar till ett par minuter. Den andra provtagningen skedde ungefär 47 till 52 timmar efter inseminering. På stuteri A varierade inseminerad dosvolym från 12 ml till 60 ml och spädningsgraden mellan sperma och spädningvätska från 1:1 till 1:3. Volymen INRA96^R som inseminerades varierade från 9 ml INRA96^R till 30 ml (stuteri A). På stuteri B användes spädningsgrad 1:2 och volymen INRA96^R varierade från 10 ml till 16 ml.

Ett sto på stuteri A inseminerades med transportsperma, medan övriga ston på stuteri A och stuteri B inseminerades med färsk sperma. Volymen antibiotika som administrerats per sto kan inte beräknas på grund av att det ej går att få information om koncentrationen gentamicin i INRA96^R.

Koloniantal

Icke selektivt medium (hästblod)

Det var stor variation gällande hur många bakteriekolonier som växte på ett icke selektivt medium. Före inseminering varierade koloniantalet från ingen (0) till riklig (4) växt. De flesta proverna visade sparsam (2) till måttlig (3) växt. Efter inseminering var koloniantalet något lägre för prover från 3 ston, högre från 5 ston och samma från 6 (Tabell 1).

Den vanligast förekommande bakterietypen på icke selektivt medium var morfologiskt överensstämmande med β -hemolyserande streptokocker. Antalet morfologiskt olika bakterietyper varierade mellan 1 till 7 (före inseminering) och 1 till 4 (efter inseminering). Efter inseminering var antalet bakterietyper oförändrat hos ett sto, ökat hos 4 och minskat hos 9 ston (Tabell 1).

- **Tabell 1:** Skillnad före och efter inseminering i koloniantal och antal kolonityper hos sto 1-14 på ett icke selektivt medium (blodagar). ↑= ökning; ↓= minskning: *Koloniantal 0= ingen växt, 1= enstaka kolonier (1-5 kolonier); 2= sparsam växt (6-25 kolonier), 3= måttlig växt (26-75 kolonier), 4 = riklig växt (>75 kolonier.)

Sto 1-14	Koloniantal* före inseminering	Koloniantal* efter inseminering	Antal kolonityper före inseminering	Antal kolonityper efter inseminering
Stall A				
1	3	3	4	2 ↓
2	0	2 ↑	0	1 ↑
3	3	3	2	4 ↑
4	1	2 ↑	3	4 ↑
5	2	2	3	2 ↓
6	2	1 ↓	4	1 ↓
7	1	1	3	1 ↓
8	0	0	0	0
Stall B				
9	4	4	7	3 ↓
10	3	4 ↑	4	3 ↓
11	3	4 ↑	6	3 ↓
12	0	3 ↑	0	4 ↑
13	3	2 ↓	2	1 ↓
14	2	1 ↓	2	1 ↓

Selektivt medium med gentamicintillsats

På det selektiva mediet med gentamicintillsats varierade koloniantalet från ingen till måttlig växt avseende prover tagna före inseminering. För prover tagna efter inseminering varierade koloniantalet från ingen till riklig växt. Efter inseminering var koloniantalet oförändrat för prover från 6 ston, något lägre för prover från 4 och högre för prover från 4 ston (tabell 2).

Den vanligast förekommande bakterietypen var morfologiskt överensstämmande med α -hemolyserande streptokocker. Efter inseminering var antalet bakterietyper oförändrat för prover från 7 ston, ökat hos 4 och minskat hos 3 ston (Tabell 2).

- **Tabell 2:** Skillnad före och efter inseminering i koloniantal och antal kolonityper hos sto 1-14 på blodagar tillsatt gentamicin. ↑= ökning ; ↓= minskning. *Koloniantal: 0= ingen växt, 1= enstaka kolonier (1-5 kolonier); 2= sparsam växt (6-25 kolonier), 3= måttlig växt (26-75 kolonier), 4 = riklig växt (>75 kolonier.)

Sto 1-14	Koloniantal* före inseminering	Koloniantal* efter inseminering	Antal kolonityper efter inseminering	Antal kolonityper före inseminering
Stall A				
1	3	1 ↓	4	1 ↓
2	0	0	0	0
3	3	1 ↓	1	1
4	0	0	0	0
5	2	1 ↓	2	1 ↓
6	1	1	1	1
7	1	0 ↓	1	0 ↓
8	0	1 ↑	0	1 ↑
Stall B				
9	2	4 ↑	2	4 ↑
10	2	3 ↑	1	2 ↑
11	1	4 ↑	1	2 ↑
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	0	0	0

MacConkey

Före inseminering växte det på selektivagar för Gram-negativa bakterier (MacConkey agar) koliforma bakterier från endast 6 av 14 prover (2 från stuteri A och 4 från stuteri B). Efter inseminering växte det från 4 av 14 prover (2 från stuteri A och 2 från stuteri B). Andelen prover med växt var numerärt lägre vid stuteri A (2 av 8) jämfört med stuteri B (4 av 6). Efter inseminering var skillnaden i koloniantal oförändrat hos 6 ston, ökad hos 3 ston och minskad hos 5. Den vanligast förekommande bakterietypen var koliformer.

DISKUSSION

En störd normalflora till följd av antibiotikabehandling kan leda till att resistent bakterier får möjlighet att konkurrera ut känsliga bakterier och etablera sig (Ohm-Smith et al 1986; Austin et al 2005).

Studier på tikar (Ström och Linde-Forsberg 1993) och apor (Herthelius et al., 1988) har visat att antibiotikabehandling påverkar den vaginala normalfloran, vilket kan leda till kolonisering av *E.coli* (Kurowski et al 2000; Gezelius et al., 1993; Herthelius et al., 1988). Jag har vid litteratursökning inte funnit några studier gällande antibiotikas påverkan på den vaginala normalfloran hos sto. Däremot finns flertalet studier som visar att antibiotikabehandling av häst kan påverka tarmens normalflora och leda till överväxt av patogena bakterier (Gustafsson et al., 1997, Båverud et al., 1998). I pilotstudien behandlades inte stona med antibiotika systemiskt eller lokalt på grund av sjukdom utan exponerades för antibiotika lokalt i genitalia via spädningvätskan i samband med insemination.

Den vaginala normalfloran hos ston anses bestå av en blandflora med kommensaler och eventuellt omgivningsbakterier (Scot et al 1971, Rickets et al., 1993; Hinrichs et al 1988). I denna studie var den vanligast förekommande bakterien morfologiskt överensstämmande med β -hemolyserande streptokocker. Detta stämmer väl överens med andra studier där *Str zooepidemicus* dominerar. (Hinrichs et al., 1988; Scot et al 1971). Ytterligare en bakterie som förekommer i den vaginala normalfloran är *E. coli* (Scot et al 1971 Rickets et al., 1993). Även detta stämmer överens med bakterieförekomsten i föreliggande studie.

Resultaten från förstudie 1, visade att det växte fler bakterier från prov tagna 3 - 6 cm in i vagina jämfört med prov tagna 10 cm in. Dessa resultat stämmer överens med Hinrichs och medarbetare (1988), d.v.s. att antalet bakterier hos ston minskar ju längre kranialt i tubulära delen av reproduktionsorganen som provet tas. Anledningar till den högre bakterieförekomsten i den kaudala delen kan vara miljöbetingade, fekala föroreningar och att bakterier vandrat in från vulvaöppningen.

Resultaten från förstudie 2 visar att prover tagna från samma ston överensstämmer makroskopiskt gällande koloniantal och morfologi.

I pilotförsöket provtogs 10 ston i början av juni (stuteri A) och 7 ston i slutet av juli (stuteri B). Det var ingen skillnad före och efter inseminering mellan stuterierna avseende koloniantal från de prover som odlades ut på icke selektivt medium. Ingen skillnad sågs heller avseende prover som odlades på medium innehållande gentamicin. Däremot växte det fler koliforma bakterier på prover från stuteri B jämfört med stuteri A. Det kan inte uteslutas att detta förklaras av skillnader i rengöring och provtagningsteknik mellan stuterierna. En alternativ förklaring är att stona vid stuteri B hade seminerats vid flera tidigare tillfällen utan att bli dräktiga, vilket kan ha påverkat resultatet.

I denna pilotstudie, där stona provtogs efter första inseminering i respektive brunst kunde ingen selektion för gentamicinresistenta bakterier påvisas. Studier av Herthelius och medarbetare (1988, 1989, 1992, 1993), där apor sköljdes vaginalt med antibiotika, överensstämmer till viss del förfarandet vid insemination med sperma spädd med antibiotikatillsatt spädningssväska. En skillnad är att aporna tillfördes antibiotika upprepade gånger.

Utebliven dräktighet i samband med inseminering kan vara till följd av en *E. coli* orsakad subklinisk endometrit. (Albihn et al 2003). Huruvida ingående ston i studien hade en subklinisk endometrit går inte att fastställa eftersom inga uterusprover togs för bakteriell odling och/eller cytologi. Hos ston som insemineras på nytt pga. att de inte blivit dräktiga efter tidigare insemineringar borde risken att utveckla resistens öka i och med den upprepade kontakten med spädningssväska innehållande antibiotika.

Fyra ston hade löpt om minst två gånger. Sto nr 8 (stuteri A) hade inseminerats vid tre tidigare brunster innan provtagning och var därför ett så kallat problemsto. Från hennes prover växte det dock ingenting på det oselektiva mediet och enbart en koloni på mediet med gentamicintillsatts. Av de tre ston (stuteri B) som inseminerats vid två tidigare brunster innan provtagning inseminerades två ston, (nr 11 och 13) med fryst sperma innan de slutligen inseminerades med färsk sperma i samband med provtagning. Båda stona blev dräktiga vid första försöket med färsksperma. Det är därför troligt att orsaken till den uteblivna dräktigheten var att stona inte var lämpade AI för fryst sperma. Återstående sto (nr 9) inseminerades vid två tidigare brunster innan provtagning och var bland de ston som hade högst antal bakterier växande på icke selektivt medium. För prover tagna efter inseminering hade antalet koliformer samt gentamicinresistenta bakterier ökat i antal. Detta sto följer därmed ett mönster som skulle kunna tolkas som att selektion för gentamicinresistenta bakterier skett. Det hade varit intressant att jämföra resistensmönstret för de bakterier som växte före och efter inseminering. Detta är dock bara ett sto, vilket gör det omöjligt att dra några slutsatser.

Provtagningsstället i genitalia kan ha påverkat att inga tydliga resultat kunde ses i pilotstudien. I denna studie valdes vestibulum som provtagningsställe för att provtagningen skulle vara så lite invasiv som möjligt. Enligt Hinrichs och medarbetare (1988) är vestibulum inte optimalt som provtagningsställe för att påträffa *E.coli* hos friska ston, men förekommer

däremot i högt antal i fossa klitoris (Hinchichs et al 1988, Rickets et al 1993). Fossa klitoris är dock inget bra provtagningsställe om avsikten, som i denna studie, var att spegla en flora som koloniserar stoet, eftersom risken för kontaminering från omgivningen är stor. Bättre vore om prover togs mer kranialt i reproduktionsorganen, förslagsvis vid fornix där eventuella bakteriefynd troligen väl överensstämmer med vad som förekommer eller kan förekomma i uterus hos det provtagna djuret (Newcombe, 1978). För att öka möjligheten att vid provtagning hitta tillräcklig mängd bakterier bör problemstom med misstänkta subkliniska endometriter provtas. Det vore även önskvärt med ett större antal provtagna ston i studien. Detta var från början planerat men kunde inte genomföras av olika skäl.

I dagsläget har gentamicinresistenta *E. coli*, enligt SVARM (2008), inte ökat på över 10 år. Grunden för materialet i SVARM är uterusprover tagna av praktiserande veterinärer som skickats till SVA. Det är troligt att många av dessa prover tagits i samband med omlöpning, dvs. från ston som tidigare betäckts eller inseminerats men inte blivit dräktiga. År 2008 betäcktes 97 % travare och 94 % Svenska halvblod genom inseminering (STC resp. ASVH, Dalin pers meddelande). Användningen av INRA96^R har ökat kraftigt de senaste två åren och uppskattas förekomma i ca 80 % av inseminationsdoserna från svenska stuterier (Dalin pers meddelande). Detta innebär att många av proverna som skickas till SVA idag troligen kommer från ston inseminerade med ovannämnda spädningssväska. Skulle selektion för gentamicinresistenta *E.coli* öka i och med den ökade användningen av INRA96^R kan det inte uteslutas att det kommer att kunna avläsas i SVARM statistiken framöver.

Sammanfattningsvis så har föreliggande studie inte visat på någon selektionseffekt efter inseminering med sperma spädd med INRA96[®]. Antalet ston som ingick i studien var dock få. Frågeställningen bör därför belysas ytterligare.

TACK!

Jag vill rikta ett stort tack till mina handledare Ann-Marie Dalin och Christina Greko för att ni inspirerat och hjälpt mig forma detta arbete. Ytterligare tack till Margareta Horn af Rantzien och Oskar Nilsson vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt för ovärderlig hjälp i laboratoriet. Vill även tacka min familj för hjälp och uppmuntran. Slutligen riktas ett tack till hästar och människor vid bägge stuterierna.

REFERENSER

- Adamsson, J., Edlund, C., Sjöstedt, S., Nord C.E. (1992). Comparative effects of cefadroxil and phenoxymethylpenicillin on the normal oropharyngeal and intestinal microflora. *Infection*, 25, 154-158.
- Albihn, A., Båverud, V., Magnusson, U. (2003). Uterine Microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44, 121-129.
- Alison A. Moore Keir, A.A., Stämpfli, H.R., Crawford, J. (1999). Outbreak of acute colitis on a horse farm associated with tetracycline-contaminated sweet feed. *Canadian veterinary journal*, 40, 718-720.
- Austin, M.N., Beigi, R.H., Meyn, L.A., Hillier, S.L. (2005). Microbiologic response to treatment of bacterial vaginosis with topical clindamycin or metronidazole. *Journal of clinical microbiology*, 43, 4492-4497.
- Bjurström, L., Linde-Forsberg, C. (1992). Long term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches. *American journal of veterinary research*, 53, 665-669.
- Brismar, B., Edlund, C., Nord, C.E. (1993). Effect of ceftibuten on the normal intestinal microflora. *Infection*, 21, 373-375.
- Båverud, V., Franklin, A., Gunnarsson, A., Gustafsson, A., Hellander-Edman, A. (1998). *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine veterinary journal*, 30, 482-488.
- Casey, R.R. (2006). Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance, review. *The Veterinary Journal*, 172, 405-421.
- Edlund, C., Stark, C., Nord, C.E. (1994). The relationship between an increase in β -lactamase activity after oral administration of three new cephalosporins and protection against intestinal ecological disturbances. *Journal of Antimicrobial chemotherapy*, 34, 127-138.
- Ensink, J.M., Klein, W.R., Barneveld, A., van Miert, A.S.J.P.A.M., Vulto A.G. (1996). Side effects of oral antimicrobial agents in the horse: a comparison of pivampicillin and trimethoprim/sulphadiazine. *The veterinary record*, 16, 253-256.
- Floor, M., van Akkeren, F., Rozenberg-Arska, M, Visser, M., Kolsters, A., Beumer, H., Verhoef, J. (1994). Effect of loracarbef and amoxicillin on the oropharyngeal and intestinal microflora of patients with bronchitis. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 26, 191-197.
- Freeman, J., Wilcox, M.H. (1999). Antibiotics and *Clostridium difficile*. *Microbes and infection*, 1, 377-384.
- Gezelius, L., Guldevall, L., Möllby, R., Winberg, J. (1993). Cefadroxil promotes vaginal colonization with *Escherichia coli*. *Infection*, 21, 201-205.
- Gustafsson A., Båverud V., Gunnarsson A., Horn af Rantzien M. Lindholm A., Franklin A. (1997). The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine veterinary journal*. 29, 314-318
- Herthelius B. M. , Hedström K. G., Möllby R., Nord C. E., Pettersson L., Winberg J. (1988). Pathogenesis of urinary tract infections- amoxicillin induces genital *Escherichia coli* colonization. *Infection*, 16, 263-266.

- Herthelius B. M., Möllby R., Nord C. E., Winberg J. (1989). Amoxicillin promotes vaginal colonization with adhering *Escherichia coli* present in faeces. *Pediatric nephrology*, 3, 443-447.
- Herthelius B. M. Möllby R., Nord C. E., Winberg J. (1992). Lack of effect of Trimethoprim and nitrofurantoin on colonization resistance in the vagina of monkeys. *Infection*, 20, 105-110.
- Herthelius B. M., Möllby R., Nord C. E., Winberg J. (1993). Pathogenesis of urinary tract infection-experimental studies of vaginal resistance to colonization. *Pediatric nephrology* 7, 509-514.
- Hinrichs, K., Cummings, M.R., Sertich, P.L., Kenney, R.M. (1988). Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *Journal of the American veterinary medical association*, 193, 72-75.
- INRA96, L'institut national de la recherche agronomique, [online], http://www.international.inra.fr/partnerships/with_the_private_sector/live_from_the_labs/inra96_r, [2009-10-15]
- Kenney, R.M., Beysan, R.V., Cooper, W.L., Moore, G.W. (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proceedings American association equine practice*, 327-336.
- Kindahl H. (2000). Reproductive physiology in the mare, In: Dalin A-M, Malmgren L, (Ed) *Compendium in equine reproduction*. 3rd, 14-28, Uppsala. SLU/repro. 91-576-5085-3,
- Krieg, N.R., Holt, J.G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, U.S.A,
- Kurowski, K., Gosh, R., Singh, S.K., Beaman, K.D. (2000). Clarithromycin-induced alterations in vaginal flora. *American journal of therapeutics*, 7, 291-295.
- Le Blanc, M., Magsiga, J., Stromberg, A.J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 68, 403-412.
- Newcombe, J.R. (1978). Comparison of the bacterial flora of three sites in the genital tract of the mare. *The Veterinary record* 102, 169-170.
- Ohm-Smith M.J., Sweet R.L., Hadely W.K. (1986). Occurrence of clindamycin-resistant anaerobic bacteria isolated from cultures taken following clindamycin therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 30, 11-14.
- Ricketts, S.W., Young, A., Medici, E.B. (1993). Uterine and clitoral cultures, In: McKinnon, A. O. and J. L. Voss, (Ed) *Equine reproduction*, 234-244, Lea & Febiger, Philadelphia, London.
- Scott P., Daley P., Gidley Baird G., Sturgess S., Frost A.J. (1971). The aerobic bacterial flora of the reproductive tract of the mare. *The veterinary record*, 88, 58-61.
- Statens jordbruksverks författningssamling K4, 2002:16, [online], Jordbruksverket, Sweden. <http://www.sjv.se> [2009-12-06].
- Ström, B., Linde-Forsberg, C. (1993). Effects of ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole on the vaginal bacteria flora of bitches. *American journal of veterinary research*, 54, 891-896.
- Sullivan, Å., Edlund, C., Nord, C.E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *The Lancet Infectious Disease*, 1, 101-114.
- Sullivan, Å., Finau-Jonasson, A., Landgren, B.M., Nord C.E. (2005). Ecological effects of perorally administered pivmecillinam on the normal vaginal microflora. *Antibicrobial agents and chemotherapy*, 49, 170-175.

- SVARM 2004, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring, The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2005. www.sva.se, ISSN 1650-6332. [2009-09-09].
- SVARM 2007, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring, The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden. 2008 ISSN 1650-6332. <http://www.sva.se>. [2009-09-09].
- SVARM 2008, Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring, The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden, 2009. www.sva.se, ISSN 1650-6332. [2009-10-15].
- Söderquist L. (2000). Artificial insemination, In: Dalin A.M., Malmgren L, (Ed) Compendium in equine reproduction. 3rd, 167-176, Uppsala. SLU/repro. 91-576-5085-3,
- Watts, J.R., Whithear, K.C., Wright, P.J. (1996). Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *Journal of small animal practice*, 37, 54-60.
- Wittenbrink, M.M., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K. (2008). What's new in bacteriology of the mare's genital tract. *Pferdeheilkunde*, 24, 53-55.