

Problemy z rozpoznawaniem ciąży u krów

Andrzej Max

z Katedry Chorób Małych Zwierząt z Kliniką Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

W obiektach chowu i hodowli krów rozród jest podstawowym mechanizmem napędowym produktywności, dostarczając cieląt do odchowu i remontu stada oraz warunkując laktację. W ramach weterynaryjnej opieki nad rozrodem bydląt przeprowadzane są rutynowe badania na ciążę. W przypadku jej stwierdzenia krowa lub jałówka jest przekwalifikowana do grupy cielnych, gdzie zwierzęta nie wymagają systematycznej obserwacji rui. Przy braku ciąży samica pozostaje w grupie intensywnie obserwowanej, a w miarę potrzeby jest poddawana leczeniu lub zabiegom biotechnicznym, jak indukcja lub synchronizacja rui w celu przyspieszenia zacielenia. Zatem rozpoznanie lub wykluczenie ciąży jest podstawą do dalszego postępowania ze zwierzęciem. W praktyce niekiedy występują problemy diagnostyczne skłaniające do zastanowienia się na ich przyczynami i skutkami.

Wczesne rozpoznawanie ciąży

Podstawową czynnością lekarską, także przy rozpoznawaniu ciąży, jest badanie kliniczne. Stosuje się palpacyjne badanie przez odbytnicę, polegające na omacywaniu macicy i identyfikacji jej zawartości. Od około 30 dnia ciąży pojawia się, zwłaszcza u jałówek i młodych krów, niewielka asymetria rogów macicy i bywa możliwy do wykrycia pęcherz zarodkowy, wyczuwalny jako bańkowate rozszerzenie rogu macicy, przy czym jej ściana w tym miejscu staje się nieco cieńsza. Od 35 dnia ciąży stają się wyczuwalne błony płodowe, co przy przepuszczaniu ściany macicy między palcami daje objaw dwuktowości (chwyt na błony płodowe). Jednak te wczesne zmiany nie zawsze są wyraźne, zwłaszcza u wieloródek, dlatego też mogą zostać nierozpoznane. Im wcześniej po unasienieniu przystępuje się do badania klinicznego, tym większe jest ryzyko błędnego rozpoznania. Próby bardzo wczesnego rozpoznawania ciąży (w dniach 20–25 po unasienieniu) u krów za pomocą badania rektalnego wykazały, że diagnoza była trafna w niespełna 54%, podczas gdy badanie wykonane w dniach 30–35 cechowało się ponad 80% trafnością diagnozy. Większość rozpoznań fałszywych, zwłaszcza we wcześniejszym

terminie, dotyczyła krów, które przez badającego były uznane za cielne, co następnie się nie potwierdziło (1). Aby rozpoznanie było wiarygodne, należy je przeprowadzać sumiennie. Przede wszystkim trzeba omacać oba rogi macicy w całości, od rozwidlenia aż do końca jajowodowego, co niekiedy bywa trudne, gdyż rogi macicy zawiązują się ku dołowi; wówczas ciąża może pozostać nierozpoznana (jest to diagnoza negatywna fałszywa).

Możliwe jest także mylne rozpoznanie ciąży nieistniejącej (diagnoza pozytywna fałszywa), szczególnie gdy w macicy jest patologiczna zawartość. Pewne dodatkowe problemy występują także przy stosowaniu chwytu na błony płodowe, którego wyniki nie zawsze są jednoznaczne. W szczególności Kassam i wsp. (2) stwierdzili pozytywny wynik chwytu na błony płodowe 18 dni po manualnym przerwaniu pęcherza omocznioowego w celu eksperymentalnego usunięcia ciąży. Można przypuszczać, że po samoistnej śmierci zarodka/płodu błony płodowe pozostają wyczuwalne przez pewien czas, co może być przyczyną części fałszywych diagnoz pozytywnych. Wszelkie wątpliwości diagnostyczne należy rozstrzygnąć w kolejnych badaniach. Pomocne bywa też badanie jajników na obecność ciała żółtego, którego wykrywanie za pomocą badania palpacyjnego cechuje się dużą wiarygodnością (3). Brak ciała żółtego wyklucza ciążę. Jeżeli podczas wczesnego badania (około 30 dnia) w kierunku ciąży nie stwierdzi się jej na podstawie wyłącznie badania rektalnego, nie należy pochopnie stosować leków, zwłaszcza o działaniu poronnym, jak $\text{PGF}_{2\alpha}$, gdyż w przypadku fałszywej diagnozy można stracić tę nierozpoznaną ciążę. Dopiero powtórny negatywny wynik badania upoważnia do radykalnego postępowania.

Wartość rozpoznania klinicznego może zostać podniesiona przy zastosowaniu obrazowania ultrasonograficznego, aczkolwiek należy mieć świadomość ograniczeń także tej metody. Badania ultrasonograficzne w kierunku ciąży, przeprowadzone głowicą 3,5 MHz u krów po 4 tygodniach od inseminacji, wykazały u zwierząt 2-letnich stu procentową trafność diagnozy i jej spadek wraz z wiekiem, a mianowicie do 94,1% u krów 3-letnich i do 40%

Problems associated with pregnancy diagnosis in cows

Max A., Department of Small Animal Diseases with Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

The aim of this paper was to present and discuss important aspects associated with reproduction in cows. Veterinary supervision over cattle reproduction includes systematic examination for pregnancy. Its confirmation or exclusion is essential for the further animal handling. Although commonly accepted methods and recommended protocols are available diagnostic problems are encountered often in the veterinary practice. Each procedure has its own limits regarding the term of examination, interpretation of results and the accuracy of diagnosis. This article describes problems connected with early pregnancy detection, a developmental stage of pregnancy inadequate to the point of insemination and estrous signs observed after the pregnancy is established. Furthermore, potential pregnancy loss as the result of rectal palpation, then twin pregnancy, embryonic mortality and interpretation of progesterone and pregnancy associated proteins concentrations are discussed.

Keywords: cattle, pregnancy, false diagnosis, embryonic mortality.

u 7-letnich. Badanie po 5 tygodniach wykazało we wszystkich grupach wiekowych stu procentową dokładność, którą u zwierząt w wieku 8 lat i starszych osiągnięto dopiero po 6 tygodniach od unasienienia (4). Do wczesnej diagnostyki ciąży bardziej nadają się sondy o częstotliwości 5 MHz. Przy ich użyciu pęcherz zarodkowy może być obserwowany na obrazie ultrasonograficznym w 21–24 dniu ciąży, zaś przy jego braku w 25 dniu można ciążę z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć (5, 6). Zarodek z jego pulsującym sercem bywa wykrywalny już ok. 21–22 dnia ciąży (7), lecz diagnoza ciąży jest pewna dopiero od 28 dnia (5). Z kolei Izaike i wsp. (8), używając sondy 5 MHz, diagnozowali ciążę u krów ras mięsnych w 27 dniu na podstawie obecności w jamie macicy nieechogenicznych obszarów, przy czym u 90% spośród nich nie obserwowali zarodka (8). Wysoką trafność pozytywnej diagnozy ciąży (94%) osiągnano przy badaniu ok. 41 dnia. W badaniach jałówek między 50 a 80 dniem po unasienieniu uzyskano dziewięćdziesięciosześcioprocentową trafność diagnozy ciąży pojedynczej i dziewięćdziesięcioprocentową ciąży bliźniaczej (9).

Wykorzystanie badań ultrasonograficznych wiąże się też z dążeniem do przyspieszenia terminu rozpoznawania ciąży. Bardzo wczesna diagnoza (od 16 do 18 dnia)

bazuje na wykryciu delikatnych nieecho-genicznych linii szerokości 1,5–2,0 mm wewnątrz macicy, powiększających się następnie do nieecho-genicznych obszarów pęcherza płodowego. Te objawy ciąży mogą być jednak niezauważone, jak też pomyłone z normalnie występującym w niewielkich ilościach płynem wewnątrzmacicznym (7, 10). Podjęto próbę ultrasonograficznej diagnostyki ciąży u jałówek w dniach 19–21 po unasienieniu, która nie przyniosła korzystnego wyniku. Obecność płynu w macicy obserwowano u 3 zwierząt, które przejawiały w tym czasie objawy rui oraz u jednej jałówki z obecnym ciałkiem żółtym, którą następnie uznano za cielną. U innych trzech jałówek z ciałkami żółtymi nie stwierdzono obecności płynu, a u 2 spośród nich stwierdzono ciążę w badaniu późniejszym. Zatem na podstawie obecności w macicy nieecho-genicznych obszarów (dochodzących nawet do 13–15 mm szerokości) lub też ich braku nie udało się stwierdzić ani wykluczyć ciąży.

U trzech jałówek badanych w 29 dniu po unasienieniu stwierdzono obecność płynu w macicy, który był widoczny zarówno przy użyciu sondy o częstotliwości 5, jak i 7,5 MHz. Nie zaobserwowano zarodków, natomiast palpacyjnie stwierdzono słabo wyrażone objawy mogące sugerować ciążę, takie jak asymetria rogów, rozszerzenie w obrębie jednego rogu, cieńsza ściana macicy w miejscu rozszerzenia. Dwie z nich uznano za cielne, co potwierdziło badanie późniejsze, jedną zaś za prawdopodobnie cielną, co wykluczono badaniem późniejszym (11). Podobnie Izaika i wsp. (8), badając krowy w 27 dniu ciąży głowicą 5 MHz, obserwowali u 90% zwierząt uznanych później za cielne tylko

pęcherze płodowe, bez widocznych zarodków (8). Badanie ultrasonograficzne krów w dniach 20–25 po unasienieniu zaowocowało trafną diagnozą w 88,5%, a w dniach 30–35 rozpoznano prawidłowo ciążę w 92,9%. We wszystkich przypadkach, gdy rozpoznanie następnie nie potwierdziło się, stwierdzono ciążę – być może błąd wynikał z obecności płynu w jamie macicy lub też nastąpiła utrata ciąży (1). Mniej pomyłek diagnostycznych występuje przy badaniu jałówek niż krów, jeżeli się porównuje badania przeprowadzane w tych samych terminach. Szczegóły przedstawiają **tabela 1 i 2** (12).

Stoień zaawansowania ciąży nieadekwatny do terminu unasieniania

Kolejną trudnością diagnostyczną jest niejednakowe tempo rozwoju ciąży. U krów o wysokiej mleczności obserwuje się czasowe opóźnienie, powodujące, że objawy zaawansowania ciąży wskazują na wcześniejsze stadium niż faktyczny czas jej trwania. W związku z tym występują takie sytuacje, że np. stwierdza się objawy charakterystyczne dla ciąży 2-miesięcznej, podczas gdy ostatnie usienienie wykonano przed 3 miesiącami. To zjawisko nieadekwatnego rozwoju ciąży do jej rzeczywistego wieku obserwuje się ostatnio coraz częściej. Tłumaczy się je ukierunkowaniem metabolizmu głównie na laktację, której szczytowy poziom przypada w czasie przypadającym na kolejne zacielenie. Wydatki organizmu związane z produkcją mleka są tak znaczne, że prowadzą do wolniejszego rozwoju ciąży, zwłaszcza wczesnej, w porównaniu do tego, który uznaje się za typowy na podstawie schematów opisanych dla zwierząt o parokrotnie niższej wydajności.

Objawy rujowe po stwierdzeniu ciąży

Ciąża charakteryzuje się wstrzymaniem rui w następstwie utrzymywania się ciałka żółtego ciążowego i wysokiego stężenia progesteronu blokującego oś podwzgórzowo-przysadkową. Niekiedy jednak u krów po stwierdzeniu ciąży pojawiają się objawy rujowe. Zjawisko to występuje u 5–10% zwierząt cielnych i bywa obserwowane we wszystkich okresach ciąży, z największym nasileniem w dniach 121–240. Intensywność objawów rui podczas ciąży jest taka sama, jak u zwierząt niecielnych, z odruchem tolerancji włącznie, ale utrzymują się one krócej. Nie obserwuje się natomiast charakterystycznych zmian w narządach płciowych ani krwawienia porujowego, nie zachodzi też owulacja (13, 14). Każdorazowo, krowa uznana za cielną, u której następnie wystąpiła ruja, musi być poddana ponownemu badaniu, aby potwierdzić lub wykluczyć ciążę, która mogła zostać utracona w wyniku obumieralności zarodkowo-płodowej.

Utrata ciąży jako skutek badania rektalnego

Abbit i wsp. (15) wskazują na straty ciąży w wyniku badania rektalnego, zwłaszcza przeprowadzanego przez osoby niedoświadczone i za pomocą chwytu na błony płodowe. Inni autorzy stali na stanowisku, że bardziej niż metoda badania odgrywa rolę jego termin. Mianowicie wcześniejsze (do 50 dnia) badanie na ciążę powodowało większe jej straty niż po 50 dniu (16). W innych obserwacjach nie znaleziono szkodliwego wpływu wczesnego badania palpacyjnego, wskazując na niewielki wzrost ryzyka wraz z zaawansowaniem ciąży między 28 a 42 dniem (17). Późniejsze badania nie potwierdziły związku między badaniem palpacyjnym a zamieralnością zarodkowo-płodową (18, 19). Należy zatem przypuszczać, że inne czynniki odpowiedzialne za utratę ciąży powodują, że dochodzi do niej niezależnie od badania palpacyjnego. Nie zwalnia to jednak badającego z obowiązku należytej ostrożności i delikatności podczas badania.

Ciąża mnoga

Bydło należy do gatunków o ciąży jedнопłodowej, jednak czasem w wyniku dojrzewania dwóch (sporadycznie więcej) pęcherzyków jajnikowych dominujących (zjawisko kodominacji) rozwija się ciąża mnoga. Częstość jej występowania u bydła mlecznego wynosi około 4%, podczas gdy u krów ras mięsnych – około 1%. U jałówek stwierdza się ją bardzo rzadko, u wieloródek zaś częściej. Zwykle jest to ciąża bliźniacza, a trójaczki zdarzają się mniej

Tabela 1. Trafność rozpoznania ciąży za pomocą badania ultrasonograficznego u krów (n=579, wg 12)

	Liczba dni od unasienienia do badania			
	20-23	24-27	28-31	>31
Liczba krów	146	201	116	116
Prawdziwe pozytywne (%)	42,5	36,3	54,3	51,7
Prawdziwe negatywne (%)	26,7	45,7	39,7	46,5
Falszywe pozytywne (%)	26,0	9,0	3,4	0,9
Falszywe negatywne (%)	4,8	9,0	2,6	0,9

Tabela 2. Trafność rozpoznania ciąży za pomocą badania ultrasonograficznego u jałówek (n=720, wg 12)

	Liczba dni od unasienienia do badania			
	20-23	24-27	28-31	>31
Liczba	194	182	224	120
Prawdziwe pozytywne (%)	59,8	66,0	70,6	70,0
Prawdziwe negatywne (%)	25,3	29,7	28,1	29,2
Falszywe pozytywne (%)	11,9	1,6	0,9	0,8
Falszywe negatywne (%)	3,0	2,7	0,4	0

więcej raz na tysiąc porodów, liczniejsze zaś należą do osobliwości. Możliwości rozpoznania istnienia ciąży nie odbiegają od tych przy ciąży pojedynczej, jednak identyfikacja bliźniąt jest już trudniejsza. Precyzyjne rozpoznanie ciąży bliźniaczej za pomocą wyłącznie badania klinicznego jest trudne. Day i wsp. (20) wskazują na niską czułość (49,3%) palpacyjnej diagnozy ciąży bliźniaczej. Dodatkowe możliwości w tym zakresie daje ultrasonografia pozwalająca na odróżnienie ciąży pojedynczej od mnogiej przy badaniu pomiędzy 49 a 55 (21, 22) lub między 50 a 80 dniem (23).

Bach i wsp. (24) diagnozowali bezbłędnie ciężę bliźniacze u krów mlecznych w 41 dniu (24). W innych badaniach odróżniano ciężę mnogie od pojedynczych najwcześniej między 28 a 42 dniem po unasienieniu, z powtórным badaniem w dniach 52–69 (11). Badanie późniejsze, szczególnie przeprowadzane po 80 dniu ciąży, ogranicza w pewnym stopniu dokładność diagnozy z uwagi na powiększenie rozmiarów i przemieszczenie się macicy ku przodowi. Z praktycznego punktu widzenia za podstawowe należy uznać badanie ultrasonograficzne wykonywane w dniach 50–80 po unasienieniu (9). Pozwala ono na stwierdzenie ciąży i ustalenie liczby płodów z trafnością około 95%. Możliwe jest przeprowadzenie badań we wcześniejszym okresie, a mianowicie w dniach 28–69 przy użyciu głowicy 5 MHz (11) lub pomiędzy 49 a 55 dniem (21, 22), bądź w 7 tygodniu (4). Pewne wskazówki można też uzyskać na podstawie badań laboratoryjnych. Białka ciążowe cechują się wyższym stężeniem podczas ciąży bliźniaczej niż pojedynczej (25). Także stężenie siarczanu estronu we krwi obwodowej mierzone po 50 dniu ciąży okazało się istotnie wyższe ($p < 0,01$) u krów z ciążą bliźniaczą w porównaniu do zwierząt z ciążą pojedynczą (26).

Obumieralność zarodkowo-płodowa

Wczesna obumieralność zarodków zachodzi przed wysłaniem sygnału antyluteolitycznego, co ma miejsce w dniach 13–15 po zapłodnieniu. Cięża ginie zatem przed jej rozpoznaniem, a kolejna ruja pojawia się w terminie fizjologicznym, tak jak przy braku zapłodnienia. Badania przeprowadzone u jałówek wykazały, że właśnie pierwsze dwa tygodnie ciąży są związane z najwyższymi jej stratami (27). Późniejsze występowanie obumieralności zarodków lub płodów może być w pewnym stopniu rozpoznane. Objawem sugerującym ten problem jest wydłużenie okresów międzyrujowych do 30–35 dni. To spostrzeżenie ma jednak tylko charakter orientacyjny, gdyż mogą być też inne jego przyczyny, jak np. niewłaściwa interpretacja objawów rujowych. W różnych stadach była

występowanie obumieralności zarodkowej szacuje się u na 4–30% (28). Znaczna część strat ciąży zachodzi przed jej rozpoznaniem. W pewnych jednak przypadkach, gdy ciąża została prawidłowo zdiagnozowana, może później dojść do obumarcia zarodka lub płodu, co w wyniku resorpcji lub niewykrytego poronienia pozostaje nieujawnione. Dopiero pojawiająca się ruja jest podstawą do ponownego zbadania zwierzęcia, a brak ciąży może rodzić przypuszczenie, że wcześniejsze rozpoznanie było mylne. Taką okoliczność należy oczywiście też brać pod uwagę, ale okazuje się, że późniejsza utrata ciąży występuje częściej, niż dotychczas sądzono, co także może mieć związek z rosnącą wydajnością mleczną. Barański i wsp. (29) na podstawie badań przeprowadzonych w północno-wschodniej Polsce wykazali średnio 13,7% utraty ciąży w dniach 30–260. Z kolei Romano i wsp. (19) stwierdzili 14% obumieralność zarodkowo-płodową w dniach 31–60 po unasienieniu. W tym czasie znaczna część krów jest już po rozpoznaniu ciąży, której utrata powoduje, że prawidłowo postawiona diagnoza może być następnie uważana za błędną – fałszywie pozytywną.

Trudności interpretacyjne oznaczeń stężeń progesteronu i białek ciążowych

Do rozpoznawania ciąży wykorzystuje się testy diagnostyczne, z których najwcześniej może być użyte oznaczenie stężenia progesteronu we krwi lub mleku, który to materiał należy pobrać w dniach 19–23 po unasienieniu, czyli w czasie zbliżonym do ewentualnej kolejnej ruji. Wiadomo, że podczas ruji i w okresie okolorujowym nie występuje wysokie stężenie progesteronu, ponieważ nie istnieje jego źródło, jakim jest ciało żółte. Zatem podprogowe stężenie progesteronu wyklucza fazę lutealną, a tym samym ciążę. Z kolei wysokie stężenie hormonu w tym terminie wyklucza ruję, a wskazuje na możliwość ciąży z prawdopodobieństwem 80%. Szczególną trudność stanowi interpretacja wyniku, który zawiera się w granicach wartości okołoprogowych, które zależą od czułości zastosowanej metody. Jeżeli np. za wartość progową przyjmie się 2 ng/ml, to wynik 1,9 ng/ml jest uznawany za ujemny, podczas gdy już 2,1 ng/ml jest wynikiem dodatnim. Różnica pomiędzy tymi wartościami jest nieistotna i zarówno jeden, jak i drugi wynik może wystąpić przy istnieniu ciąży albo jej braku. Wyniki fałszywie dodatnie, czyli takie, kiedy ciąża nie zostaje potem pozytywnie zweryfikowana wynikają z różnych przyczyn:

1) krowa mogła być unasieniona podczas mylnie rozpoznanej ruji (w rzeczywistości w fazie lutealnej);

- 2) u pewnych krów występują wydłużone cykle rujowe, powodujące, że po 19–21 dniach są jeszcze w kończącej się fazie lutealnej;
- 3) mogło dojść do niepełnej luteolizy;
- 4) na jajnikach obecne są struktury wydzielające progesteron (ciało żółte przetrwałe, torbiel luteinowa);
- 5) doszło do obumarcia zarodka. W tej ostatniej sytuacji pierwotne rozpoznanie ciąży było prawdziwe, tylko potem doszło do jej utraty.

Inną możliwość diagnostyczną stanowią badania laboratoryjne wykrywające białka charakterystyczne dla ciąży określane ogólnym mianem PAG (pregnancy associated glycoprotein). Wśród nich przykładowo można wymienić bydlęce swoiste białko ciążowe B (bovine pregnancy specific protein B – bPSPB), chemicznie tożsame z PAG-1, wykrywalne u większości krów od 24 dnia po zapłodnieniu, a przekraczające wartość stężenia we krwi 1 ng/ml w 30 dniu ciąży. Trafność diagnozy pozytywnej w 24 dniu wynosi 86,2%, negatywnej zaś 71,8%, a 100% w 30–35 dniu (30), jednak z powodu relatywnie długiego okresu półtrwania tego białka może powstać fałszywie pozytywna diagnoza ciąży po obumarcu zarodków. Stężenie bPAG (bovine pregnancy associated glycoprotein) we krwi obwodowej jest skorelowane zarówno ze stadium ciąży, jak z liczebnością płodów (25). Gajewski i wsp. (31) wskazują na indywidualną zmienność stężenia białek tej grupy u krów w tej samej fazie ciąży. Ponadto białka te są wykrywalne przez kilka tygodni po wycieleniu, co u krów unasienionych wkrótce po porodzie może stanowić przyczynę błędnej rozpoznania (32, 33).

Diagnoza wątpliwa

Posługując się badaniami laboratoryjnymi bazującymi na oznaczeniach stężenia P4, PAG lub estrogenów, przy założeniu, że są one wykonywane we właściwych terminach, rozpoznanie negatywne (brak ciąży) można uznać praktycznie za w pełni wiarygodne. Odwrotnie, diagnostyka polegająca na badaniu rektalnym i ultrasonograficznym jest bardziej wiarygodna przy stwierdzeniu ciąży niż przy rozpoznaniu negatywnym. Jednak każda metoda posiada pewne ograniczenia, powodujące, że nie zawsze można postawić jednoznaczne rozpoznanie. W przypadku oznaczeń zawartości hormonów mogą to być stężenia graniczne, a przy badaniu klinicznym trudności z dokładnym omacaniem lub obrazowaniem macicy (narząd bardzo oddalony) bądź stwierdzone cechy niecharakterystyczne. W takich przypadkach (diagnoza wątpliwa) należy zdecydowanie zrezygnować

z wydawania wiążącej opinii odnośnie do istnienia lub braku ciąży, a zbadać zwierzę ponownie po pewnym czasie, aby uzyskać rzetelne dowody i postawić właściwe rozpoznanie.

Piśmiennictwo

- Max A., Pawlak M., 2008 – dane niepublikowane.
- Kassam A., BonDurant R.H., Basu S., Kindahl H., Stabenfeldt G.H.: Clinical and endocrine responses to embryonic and fetal death induced by manual rupture of the amniotic vesicle during early pregnancy in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987, **191**, 417-420.
- Max A., Jurka P., Witkowski M., Boryczko Z., Bostedt H.: Kritischer Vergleich zwischen klinisch und ultrasonographisch erfassten Ovarbefunden im Interöstrum des Rindes. *Tierärztl. Prax.* 1997, **25**, 207-211.
- Hughes E.A., Davies D.A.R.: Practical use of ultrasound in early pregnancy in cattle. *Vet. Rec.* 1989, **124**, 456-458.
- Kahn W.: Zur Trächtigkeitsdiagnose beim Rind mittels Ultraschall. *Tierärztl. Umschau* 1985, **40**, 472-477.
- Rajamahendran R., Divakar J.A., Burton B.: Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction: A review. *Can. Vet. J.* 35, 1994, 563-572.
- Griffin P.G., Ginther O.J.: Research applications of ultrasonography in reproductive biology. *J. Anim. Sci.* 1992, **70**, 953-972.
- Izaike Y., Suzuki O., Shimada K., Takenouchi N., Takahashi M.: Observation by ultrasonography of embryonic loss following the transfer of two or three embryos in beef cows. *Theriogenology* 1991, **36**, 939-947.
- Dobson H., Rowan T.G., Kippax I.S., Humblot P.: Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology* 1993, **40**, 411-425.
- Kastelic J.P., Bergfeldt D.R., Ginther O.J.: Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology* 1991, **35**, 569-581.
- Max A.: Próba uzyskania i wczesnego rozpoznawania ciąży bliźniaczej u jałówek po indukowanych owulacjach mnogich. *Med. Weter.* 2001, **57**, 433-436.
- Heuwieser W., Müller K., Ahlers D.: Trächtigkeitsuntersuchung beim Rind. Teil 2: Medizinische Konsequenzen und forensische Beurteilung systematischer Trächtigkeitsuntersuchungen mittels Ultraschall auf Herdenbasis. *Prakt. Tierarzt* 2000, **81**, 587-589.
- Dijkhuizen T.J., van Eerdenburg F.J.: Behavioural signs of oestrus during pregnancy in lactating dairy cows. *Vet. Q.* 1997, **19**, 194-196.
- Thomas L., Dobson H.: Oestrus during pregnancy in the cow. *Vet. Rec.* 1989 **124**, 387-390.
- Abbitt B., Ball L., Kitto G. P., Sitzman C. G., Wilgenburg B., Raim L. W., Seidel G. E.: Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1978, **173**, 973-977.
- Vaillancourt D., Bierschwal C.J., Ogwu D., Elmore R.G., Martin C.E., Sharp A.J., Youngquist R.S.: Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979, **175**, 466-468.
- Thurmond M.C., Picano J.P.: Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993, **203**, 432-435.
- Romano J.E., Thompson J.A., Kraemer D.C., Westhusin M.E., Forrest D.W., Tomaszewski M.A.: Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology* 2007, **67**, 486-493.
- Romano J.E., Thompson J.A., Kraemer D.C., Westhusin M.E., Tomaszewski M.A., Forrest D.W.: Effects of early pregnancy diagnosis by palpation per rectum on pregnancy loss in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2011, **239**, 668-673.
- Day J.D., Weaver L.D., Franti C.E.: Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: Discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Can. Vet. J.* 1995, **36**, 93-97.
- Davis M.E., Haibel G.K.: Use of real-time ultrasound to identify multiple fetuses in beef cattle. *Theriogenology* 1993, **40**, 373-382.
- Kadokawa H., Minezawa M., Takahashi H., Sasaki O., Kariya T.: Analysis of the occurrence of freemartinism among single female calves born from multiple embryo transfer. *Theriogenology* 1993, **39**, 239-239.
- Dobson H., Rowan T.G., Kippax I.S., Humblot P.: Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. *Theriogenology* 1993, **40**, 411-425.
- Bach S., Kahn W., Müller F., Schulz J., Geigenmüller S.: Die frühe sonographische Feststellung von Zwillingen aus Insemination und kontralateralem Embryotransfer beim Rind und die Ergebnisse der Abkalbungen. *Tierärztl. Prax.* 1991, **19**, 365-368.
- Patel O.V., Sulon J., Beckers J.F., Takahashi T., Hirako M., Sasaki N., Domeki I.: Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur. J. Endocrinol.* 1997, **137**, 423-428.
- Hirako M., Takahashi T., Domeki I.: Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number. *Theriogenology* 2002, **57**, 1939-1947.
- Dunne L.D., Diskin M.G., Sreenan J.M.: Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, **58**, 39-44.
- Max A.: Obumieralność zarodków u zwierząt. *Med. Weter.* 1991, **47**, 416-418.
- Barański W., Zduńczyk S., Janowski T.: Late embryonic and foetal losses in eight dairy herds in north-east Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2012, **15**, 735-739.
- Humblot P. i wsp.: Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. *Theriogenology* 1988, **30**, 257-267.
- Gajewski Z., Melo de Sousa N., Beckers J.F., Pawlinski B., Olszewska M., Thun R., Kleczkowski M.: Concentration of bovine pregnancy associated glycoprotein in plasma and milk: its application for pregnancy diagnosis in cows. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008, **59** Suppl. 9, 55-64.
- Haugejorden G., Waage S., Dahl E., Karlberg K., Beckers J.F., Ropstad E.: Pregnancy associated glycoproteins (PAG) in postpartum cows, ewes, goats and their offspring. *Theriogenology* 2006, **66**, 1976-1984.
- Szenci O., Beckers J.F., Humblot P., Sulon J., Sasser G., Taverne M.A., Varga J., Baltussen R., Schekk G.: Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology* 1998, **50**, 77-88.