

Untersuchungen zur transvaginalen ultrasonographisch geleiteten Reduktion von Zwillingsträchtigkeiten bei der Stute

Frank Becker¹, Knut Göllnitz², André Kleinpeter³, Jörg Neubauer⁴, Hans-Jürgen Keindorf⁵, Gerd Nürnberg⁶ und Wilhelm Kanitz¹

Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf, FB Fortpflanzungsbiologie¹ und FB Genetik und Biometrie⁶, Tierarztpraxis Hohen Schönberg², Praxis für Pferde Alt-Sammit³; Praxis für Pferde Güstrow⁴ und Tierarztpraxis Rätzlingen⁵

Zusammenfassung

Zwillingsgraviditäten bei der Stute bewirken ökonomische Verluste, da sie im Regelfall zu Aborten, Totgeburten bzw. zur Entwicklung lebensschwacher oder deformierter Fohlen führen. Die transvaginale ultraschallgeleitete Aspiration ist eine effiziente Methode um eine Reduktion zu erreichen. In der vorliegenden Studie wurde bei 27 Zwillingsträchtigkeiten einmalig zwischen dem 21. bis 52. Trächtigkeitstag Fruchtwasser von einem Konzeptus aspiriert. Insgesamt wurde nach 10 bis 14 Tagen eine Überlebensrate der verbleibenden Embryonen von 59,2 % ermittelt. Vierzehn Stuten erhielten eine therapeutische Dosis eines nichtsteroidalen Antiphlogistikums vor sowie 5 Tage nach der Aspiration. Die Überlebensrate in dieser Gruppe betrug 71,4 %. In der unbehandelten Kontrollgruppe betrug sie 46,1 %. Eine direkte Beziehung zwischen der Überlebensrate der verbleibenden Embryonen und dem Trächtigkeitsstadium, in dem die Aspiration vorgenommen wurde, konnte nachgewiesen werden. Eine signifikant geringere Rate wurde nach Aspirationen nach dem 36. Tag beobachtet.

Schlüsselwörter: Stute, Zwillingsträchtigkeit, Trächtigkeitstag, Reduktion, Flunixin

Transvaginal ultrasound-guided reduction of twin pregnancies in the mare

Twin pregnancies in mares cause economic losses as they result in a high rates of abortion, stillbirth or the delivery of dead or weak and deformed foals. Transvaginal ultrasound-guided twin reduction techniques are described for twin pregnancies that advance to the phase of fixation. In total 27 twin pregnancies were ultrasound-guided managed by aspiration of embryonic fluid. Mares with twin pregnancies from day 21 to day 52 were directed to the ultrasound-guided procedure. In total the success rate was 59.3 %. Fourteen mares got a therapeutic dose of Flunixin (Finadyne[®] RP; Essex) before and for 5 days after aspiration. The success rate was 71.4 % in the treated group and 46,1 % in the control group. A direct relation between success rate and stage of gestation and aspiration was observed. Success rate of survival of one twin was significantly lower when manipulation was started beyond day 36.

Keywords: mare, twin pregnancy, reduction, flunixin, gestation day

Einleitung

Obwohl der größte Anteil equiner Zwillingsgraviditäten spontan reduziert wird, stellen sie im Falle ihrer Persistenz, wenn nicht diagnostiziert und behandelt, eine bedeutsame Ursache für Aborten, Totgeburten oder die Entwicklung lebensschwacher Fohlen dar.

Nach *Ginther* (1984, 1989) sowie *Ginther und Griffin* (1994) werden ca. 70 % der Zwillinge unilateral fixiert, von denen ca. 85 % bis zum 40. Trächtigkeitstag (TT) einer natürlichen Reduktion zur Einlingsgravidität unterliegen. Demgegenüber beobachtet man bei bilateral fixierten Embryonen eine wesentlich geringere natürliche Reduktionsrate.

Das manuelle Quetschen eines einzelnen Embryos in seiner motilen Phase oder später bei bilateraler Fixierung ist eine effektive Methode der Zwillingsreduktion, die hohe Überlebensraten für den verbleibenden Embryo verspricht und demzufolge von entsprechenden Tierärzten beherrscht und prakti-

ziert werden sollte. Gelingt dies aus den unterschiedlichsten Gründen nicht bzw. wird die Zwillingsgravidität (Bild 1) zu spät erkannt, sollten andere Methoden genutzt werden.

In früheren Studien wurden Ergebnisse chirurgischer Eingriffe und transabdominale intrakardiale Injektionen von KCL-Lösungen bei Feten beschrieben (*Pascoe* 1983, *Rantanen* und *Kinkaid* 1989). Als Routineverfahren haben sich diese Methoden nicht durchgesetzt. Vielmehr wurden in den letzten Jahren einige Ergebnisse der transvaginalen ultrasonographisch geleiteten Aspiration von Fruchtwasser der Konzepten veröffentlicht (*Jonker et al.* 1995, *Macpherson et al.* 1995, *Morris et al.* 1999, *Mari et al.* 2004). Die Erfolgsraten, die am Vorhandensein eines vitalen Embryos 10 bis 14 Tage nach dem Eingriff oder an Hand der Abfohlraten gemessen wurden, variieren in Abhängigkeit von der Lage der Embryonen und dem TT zwischen 9 und 75 %. Die besten Ergebnisse wurden von *Mari et al.* 2004 publiziert, der mit dieser Methode 14 lebend geborene Fohlen aus 20 Zwillingsträchtigkeiten erreichte. Allerdings handelte es sich in dieser Arbeit um Ein-

griffe im Zeitraum TT 16 bis 25. Bei Reduktionen nach dem 40. TT konnten keine Trächtigkeiten erhalten werden. Insgesamt ist die Zahl der untersuchten Fälle gering, vergleichende Untersuchungen fehlen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Einfluss des TT und einer prolongierten Behandlung der Stute mit einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum auf die Ergebnisse der Zwillingsreduktion zu prüfen.



Abb 1 Unilaterale Zwillingsträchtigkeit am 32. TT einer Stute. *Unilateral twin pregnancy on day 32 of pregnancy*

Material und Methoden

Stuten

Insgesamt wurde im Zeitraum von 4 Jahren die transvaginale ultrasonographisch geführte Zwillingsreduktion bei 27 Stuten durchgeführt. Bei den Stuten handelte es sich um Mecklenburger, Hannoveraner bzw. Oldenburger Warmblutstuten sowie um eine Kaltblutstute. Zum Zeitpunkt der Aspiration waren die Stuten zwischen 4 und 16 Jahre alt, von guter Körperkondition und klinisch ohne Krankheitsanzeichen. Die Zwillingsgravidität wurde ultrasonographisch zwischen den TT 16 und 50 von entsprechenden Hof-tierärzten festgestellt, die die Stuten zur anschließenden Zwillingsreduktion überwiesen. Die Aspiration wurde im Zeitraum 21. bis 52. TT durchgeführt. Durch die überweisenden Tierärzte wurden die Überwachung der weiteren Trächtigkeit sowie etwaige Behandlungen durchgeführt. Vierzehn Stuten der Versuchsgruppe erhielten vor und

Aspiration

Während der Untersuchungen waren die Stuten in einem Behandlungsstand fixiert. Eine kurzzeitige Sedierung vor dem Eingriff erfolgte durch Applikation von Domosedan® (Pfizer, Karlsruhe. i.v.; 0,2 ml per 100 kg KM). Das Rektum wurde entleert; Perineum und Vulva wurden gründlich gereinigt und desinfiziert (2-Propanol-2-biphenylol-Spray, Kodan®, Schülke und Mayr; Norderstedt).

Für die transvaginal geführte Aspiration von Allantoisflüssigkeit wurde ein speziell gefertigtes Aspirationssystem (VETEC GmbH Rostock) und ein stationärer Computersonograph CS 9000 (HITACHI, Deutschland) verwendet. Der Sondenträger enthält einen 6,5 MHz Sektorscanner sowie den Aspirationskanülenschaff. Die auswechselbare Kanüle selbst besitzt einen Außendurchmesser von 1,1 mm und einen Innendurchmesser von 0,8 mm bei einer Länge von 80 mm.

Während der Aspiration wird der ausgewählte Konzeptus durch transrektale Fixation vor dem Schallkopf positioniert, so dass eine größtmögliche, ungeteilte echolose Fläche ein maximales Volumen von Allantoisflüssigkeit anzeigt. Während der Aspiration penetriert die Kanüle das Scheidendach, den Uterus und die Fruchthülle (Abb. 2). Anschließend wird soviel Fruchtwasser (i.d.R. Allantoisflüssigkeit) mittels aufgesetzter Spritze aspiriert, wie ohne Gefährdung des anderen Embryos bzw. Beeinträchtigung des Endometriums möglich ist. Mehrmalige Aspirationen wurden im Regelfall vermieden, auch wenn bei der sonographischen Kontrolle noch Restmengen an Flüssigkeit im behandelten Konzeptus festgestellt wurden. Besondere Sorgfalt wurde der Manipulation am Uterus entgegengebracht. Die Fixation und das Penetrieren wurden auf das unerlässliche Minimum beschränkt. Gleichfalls wurde auf eine direkte Beeinflussung (Verletzung, Punktion, Injektion) des Embryos selbst verzichtet. Bei unilateralen Embryonen ist die Vermeidung von Verletzungen des anderen Konzeptus von besonderer Bedeutung.

Die Entscheidung, welcher Embryo punktiert wurde, basierte auf mehreren Kriterien. Bei bilateral verteilten Embryonen



Abb 2 Sequenz von Bildern während einer Fruchtwasseraspiration. *Sequence of pictures showing aspiration of embryonic fluid.*

nach dem Eingriff eine Flunixin-Meglumin-Behandlung (Fina-dyne®, Essex, München; i.v. bzw. oral: insgesamt 3000–3500 mg verteilt auf 6 Applikationen im 24 h-Rhythmus). Die Stuten der Kontrollgruppe erhielten eine einmalige intravenöse Applikation von 500 mg Flunixin ca. 30 min vor der Aspiration. Die Vitalität des verbleibenden Embryos wurde 10 bis 14 Tage nach dem Eingriff ultrasonographisch bestimmt.

wurden die Größe, die Herz-tätigkeit, die Position im Uterus-horn sowie die manuelle Fixationsmöglichkeit des Konzeptus berücksichtigt. Bei unilateralen Embryonen wurde im Regelfall Fruchtwasser des caudal positionierten Konzeptus aspiriert. Im Anschluss an den Eingriff wurden die Tiere an den Hof-tierarzt zurück überwiesen. Antibiotische Behandlungen wurden nicht durchgeführt.

Statistik

Das Ziel der statistischen Analyse war es, die Kategorie „verbleibende Trächtigkeit nach Zwillingsreduktion“ in Abhängigkeit von einer Flunixin-Behandlung (Behandlung ja/nein) und dem Trächtigkeitstag (<36, >36), an dem die ultraschallgeleitete Zwillingsreduktion vorgenommen wurde, zu analysieren. Für die Analyse wurde das Verfahren CATMOD des Software-Paketes SAS®, Vers.9.1 genutzt. Es wurden die Haupteffekte (Behandlung/ TT) und die zugehörige Interaktion (Behandlung x TT) berücksichtigt.

Ergebnisse

Insgesamt wurde bei 27 Zwillingsgraviditäten vom TT 21 bis 52 die Aspiration bei einem Konzeptus durchgeführt. In allen Fällen war es möglich, Flüssigkeit zu aspirieren. In Abhängigkeit von Größe und Position der Konzepten, ihrer manuellen Fixationsmöglichkeit und der Vermeidung von Gefahrenpotentialen für den verbleibenden Embryo bzw. für das Endometrium wurden Flüssigkeitsmengen von 10 bis ca. 100 ml abgesaugt. Mit einer Ausnahme am TT 21 führten die Aspirationen zum Absterben des betroffenen Embryos. Der reexpandierende und vitale (Herzaktion) Konzeptus vom TT 21 wurde nach 7 Tagen einer erneuten Aspiration zugeführt. Die uterine Verteilung der Zwillinge bei den Stuten und die korrespondierenden Überlebensraten der nicht punktierten, verbleibenden Embryonen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab 1 Ergebnisse der Zwillingsreduktion in Abhängigkeit ihrer uterinen Position.
Results of twin reduction in relation to their uterine position.

Uterine Position der Zwillinge	Anzahl	Überlebensrate	
	(n)	(n)	(%)
Unilateral	16	8	50,0
Bilateral	11	8	72,7

Mit 72,7 % wurde bei bilateraler Verteilung der Embryonen im Uterus der Stuten eine tendenziell höhere Erfolgsrate realisiert. Insgesamt wurde bei 16 Stuten das Überleben des verbleibenden Embryos beobachtet (Überlebensrate gesamt 59,2 %). In der Gruppe der mit Flunixin behandelten Tiere wurde eine Überlebensrate von 71,4 % erreicht. In der Kontrollgruppe überlebten im beobachteten Zeifenster 46,1 %.

Eine Reduktion von Zwillingen nach dem 36. TT ergab, unabhängig von einer Flunixinbehandlung, signifikant ($p < 0,05$) geringere Überlebensraten der verbleibenden Embryonen. 81,2 % der erhaltenen Trächtigkeiten resultieren aus Aspirationen bis zum 36. TT. Die Ergebnisse der Zwillingsreduktion in Relation zum TT und einer Flunixinbehandlung sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Diskussion

In den zurückliegenden Jahren sind eine überschaubare Anzahl von Studien zum Management von Zwillingsgraviditäten bei der Stute publiziert worden. Im Regelfall ist die Zahl der beschriebenen Fälle limitiert und vergleichende Untersuchungen wurden nicht angestrengt. Als gesichert gilt, dass das manuelle „Crushing“ von Embryonen in ihrer motilen bzw. frühembryonalen Phase eine erfolgreiche Methode der Zwillingsreduktion darstellt (Pascoe et al. 1987, Bowman 1987).

Gelingt die Quetschung der Embryonen nicht oder wird die Zwillingsgravidität zu einem späteren Zeitpunkt (>30. TT) festgestellt, ist die ultrasonographisch geleitete Aspiration embryonaler Flüssigkeit die Methode der Wahl (Macpherson et al. 1995, Macpherson and Reimer 2000, Mari et al. 2004). Sie erlaubt eine gezielte und kontrollierte Aspiration embryonaler Flüssigkeit und wird von der Stute im Regelfall problemlos toleriert.

Bei unilateraler Position der Embryonen sollte besondere Sorgfalt darauf gerichtet sein, die Lage der Embryonen zueinander zu verifizieren. Die Verwendung unterschiedlicher Schallköpfe und Schallrichtungen zur Lagediagnostik gestattet es, direkte Schädigungen bei zum Teil äußerst dicht benachbarten und fixierten Embryonen zu vermeiden, indem der Kanüleneintritt in den Uterus und die Punktionsrichtung entsprechend ausgerichtet wird. Die Erfolgsrate war nach

Tab 2 Ergebnisse der Zwillingsreduktion in Abhängigkeit vom TT und einer Flunixinbehandlung. a:b $p < 0,05$
Results of twin reduction in relation to the day of pregnancy and administration of flunixin. a:b $p < 0,05$

	Anzahl Stuten (n)	Überlebensrate		Anteil erfolgreicher Aspirationen TT ≤36		Anteil erfolgreicher Aspirationen TT >36	
		(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Kontrolle	13	6	46,1	5	83,3	1	16,6
Flunixin	14	10	71,4	8	80,0	2	20,0
Gesamt	27	16	59,2	13	81,2 ^a	3	18,7 ^b

Aspiration in bilateral verteilten Embryonen tendenziell höher (72,7 % vs. 50 %). Damit werden Untersuchungsergebnisse von Jonker et al. (1995), Macpherson et al. (1995), Morris et al. (1999) und Mari et al. (2004) bestätigt, die den Einfluss lokaler Effekte vermuten. Während Mari et al. (2004) und Bracher et al. (1993) über Erfolgsraten von 33 bis 70 % berichten, weisen andere Arbeiten Erfolgsraten zwischen 9 und 33 % aus. Mari et al. (2004) führen ihre hohen Erfolgsraten (Abfohlrate von 70 %) darauf zurück, dass der Eingriff bis zum 25. TT durchgeführt wurde. Bei 4 Stuten mit Zwillingsgraviditäten älter als 40 Tage wurde nach Aspiration keine Trächtigkeit erhalten.

Die eigene Arbeit zeigt, dass auch bei Zwillingsgraviditäten bis zum 36. TT nach einer transvaginalen ultrasonographisch geleitete Aspiration signifikant höhere Überlebensraten des

verbleibenden Embryos erwartet werden können. Der Eingriff bei Zwillingsträchtigkeiten nach dem 40. TT war dagegen nur in einem Fall erfolgreich (3,7 %).

Um den 36. TT der Stute wandern spezialisierte Trophoblastzellen aus dem Choriongürtel des Konzeptus in das Endometrium aus und verankern ihn zunächst nicht sehr stabil. Die Implantation erfolgt ab den 40. TT durch interaktive Verbindung von Trophoblast- und Uterusepithelzellen (Allen and Stewart 2001, Hoffmann et al. 2004). Es ist anzunehmen, dass Eingriffe in diesem Stadium mit allgemeinen uterinen Reaktionen einhergehen, die Auswirkungen auch auf den verbleibenden Konzeptus besitzen. Es kann dagegen angenommen werden, dass signifikant höhere Überlebensraten nach Aspirationen bis zum 36. TT darauf zurückzuführen sind, dass sie Embryonen betreffen, die noch keine direkten, festen zelluläre Verbindung zum Endometrium aufweisen.

Ein signifikanter Einfluss einer Flunixin-Applikation konnte nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein nichtsteroidales Antiphlogistikum über einen längeren Zeitraum (5-6 Tage) vor und nach der Aspiration eingesetzt. Im Regelfall beträgt die Halbwertszeit dieser Präparate nur mehrere Stunden und zielte in bisherigen Studien auf die unmittelbare Unterdrückung lokaler Entzündungsprozesse im Anschluss an die Manipulation am Uterus. Die eigenen Überlegungen waren darauf fokussiert, ein mögliche gesteigerte $PGF_{2\alpha}$ -synthese über einen längeren Zeitraum zu hemmen. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass nicht nur die Punktion bzw. Aspiration alleinig signal- bzw. luteolyseauslösend ist, sondern auch der im Uteruslumen verbleibende embryonale Zelldetritus eine erhöhte und länger anhaltende Prostaglandinsynthese ($PGF_{2\alpha}$) bewirken könnte. Die Ergebnisse belegen, dass vor allem der Zeitpunkt der Aspiration entscheidend ist. Entsprechende medikamentelle Behandlungen könnten unterstützend wirksam werden.

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass die transvaginale ultrasonographisch geleitete Aspiration bei Zwillingsträchtigkeit der Stute eine effiziente Methode zum Erhalt der Gravidität sein kann. Die Überlebensrate des verbleibenden Embryos wird vom Zeitpunkt der Aspiration beeinflusst und könnte durch eine entsprechende Applikation nichtsteroidaler Antiphlogistika verbessert werden. Weitere Untersuchungen sollten sich anschließen.

Literatur

- Allen W. R. und Stewart F. (2001): Equine placentation. *Reprod Fertil Dev* 13, 623-34
- Bowman T. (1987): Ultrasonic diagnosis and management of early twins in the mare. *Proceedings of Am Assoc Equine Pract* 32, 35-43
- Bracher V. G. S. (2003): Twins. In: *Current Therapy in Equine Medicine*, Robinson N. E. (ed.), 5th edn. Elsevier Science, St. Louis, MO, 245-248
- Ginther O. J. (1984): Postfixation embryo reduction in unilateral and bilateral twins in mares. *Theriogenology* 22, 213-223
- Ginter O. J. (1989): Twin embryos in mares II: post fixation embryo reduction. *Equine Vet J* 21, 171-174
- Ginther O. J. und Griffin P. G. (1994): Natural outcome and ultrasonic identification of equine twins. *Theriogenology* 41, 1193-1199
- Hoffmann B., Leiser R. und Schuler G. (2004): Reproduktionsmedizin beim Pferd, Parey Verlag Stuttgart
- Jonker F., Parlleviet J., Pycock J. und Vos P. (1995): Twin reduction by transvaginal ultrasound guided puncture of embryonic vesicles. *Proc. Brit Equi Vet Assoc* 34, 49
- Macpherson M. L. und Reimer J. M. (2000): Twin reduction in the mare: current options. *Am Reprod Sci* 60-61, 233-244
- Macpherson M., Homco L., Varner D., Blanchard T., Harms P., Flanagan M. und Forrest D. (1995): Transvaginal ultrasound-guided allantocentesis for pregnancy elimination in the mare. *Biol Reprod Mono* 1, 215-223
- Mari G., Iacono E., Merlo B. und Castangnetti C. (2004): Reduction of twin pregnancy in the mare by transvaginal ultrasound guided aspiration. *Reprod Dom Anim* 39, 434-437
- Morris L. H. A., Greenwood R. E. S. und Allen W. R. (1999): Transvaginal ultrasound guided reduction of twin conceptuses in the mare. *Proc Int Konf Equine Reprod* 15, 614-617
- Pascoe R. (1983): Methods for treatment of twin pregnancy in the mare. *Equine Vet J* 15, 40-42
- Pascoe D., Pascoe R., Hughes J., Stabenfeldt G. und Kindahl H. (1987): Comparison of two techniques and three hormone therapies for management of twin conceptuses by manual embryonic reduction. *J Reprod Fertil* 35, 701-702
- Rantanen N. W. und Kinkaid B. (1989): Ultrasound guided fetal cardiac puncture: a method of twin reduction in the mare. *Proc. Am Assoc Equine Pract* 34, 173-179

Dr. Frank Becker
Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere
Dummerstorf, FB Fortpflanzungsbiologie
18196 Dummerstorf, Germany
becker@fhn-dummerstorf.de

Pferdeheilkunde Curriculum Anästhesiologie

Claudia Spadavecchia und Olivier Levionnois

11.-12. März

www.pferdeheilkunde.de