

**PATOLOGIE EMERGENTI NELL'ALLEVAMENTO
BOVINO DA LATTE AD ALTA PRODUZIONE**

La gravidanza gemellare

La gravidanza gemellare, cui sono solitamente associate diverse patologie del parto, è una condizione in continuo aumento nell'allevamento bovino da latte, in cui è considerata un evento indesiderato.

La gravidanza gemellare è diventata un vero e proprio problema aziendale: in dieci anni si è passati da un'incidenza del 4-5% al 10%, e non è raro trovare allevamenti in cui si arriva a una percentuale del 15-16%. Alla gravidanza gemellare sono costantemente associate diverse patologie del parto: ritenzione di placenta, metrite, chetosi, distocia (ossia incremento dei giorni *open* e peggioramento delle performance riproduttive), dislocazione abomasale, compromissione delle performance produttive-riproduttive dell'animale, mortalità neonatale e freemartinismo [16,17]. Per questo, la gravidanza gemellare rappresenta nell'allevamento bovino da latte ad elevata produzione, un evento indesiderato (foto 1). La maggior incidenza di mortalità embrionale e/o fetale, il maggior costo (quindi il minor profitto per l'allevatore: è stato calcolato negli USA in un costo annuo per la sola Holstein di 55 milioni di dollari) [12,18], fanno considerare questo tipo di gravidanza, una vera e propria "patologia". In que-



Foto 1. Nell'allevamento bovino da latte ad elevata produzione la gravidanza gemellare rappresenta un evento indesiderato.

sto lavoro si analizzeranno i fattori predisponenti e i meccanismi che portano all'insorgenza di una gravidanza gemellare, e soprattutto si evidenzia la necessità e l'utilità, di una diagnosi ultrasonografica precoce.

Epidemiologia

La specie bovina è generalmente unipara e la gravidanza gemellare ha un'incidenza molto diversa a seconda degli autori: 0,5% nelle razze da carne [8,16], 5%-9,8% [1,2,16] nelle razze da latte [1, 16], con variazioni anche in funzione della razza e delle condizioni di allevamento (tabella 1). La gravidanza tripla, è molto rara, pari allo 0.01% [2].

L'incidenza di gravidanza gemellare aumenta con l'aumentare del numero dei parti; è una gravidanza assai rara nelle manze e nelle primipare (1,3%), mentre nelle pluripare è particolarmente frequente tra il 2° e il 4° parto [3, 4]. Le recidive sono frequenti, arrivando al 22% [5, 6, 7].

Secondo Karlsen et al. [9], il *twinning rate* in Norvegia è passato dallo 0,6% al primo parto al 4% al sesto parto ed esisterebbe un trend fenogenetico positivo nel periodo 1978-1995.

Alcuni tori hanno una frequenza di gravidanze multiple estremamente bassa, rispetto ad altri: l'ereditabilità stimata è dello 0,7-0,8% alla prima gravidanza, ma sale già al 2,8% alla seconda gravidanza. Secondo questi ricercatori, la correlazione genetica tra gemellarità, e prima e seconda gravidanza è pari approssimativamente a 1. Esisterebbe anche una maggiore incidenza stagionale: la gemellarità sarebbe infatti più alta in primavera e più bassa invece in autunno [18], anche se non tutti gli Autori hanno riscontrato questa cor- ►►

relazione tra gemellarità e stagione [19]. La gravidanza gemellare è caratterizzata da un accorciamento della gestazione (275,6 giorni di gravidanza mediamente per una gemellare, contro 281,3 giorni di gravidanza mediamente per una gravidanza normale [17]). Di questo occorre tenere conto quando si decide la messa in asciutta delle bovine e quando queste vengono poste in *steaming up*: le implicazioni metaboliche di queste scelte sono determinanti.

Secondo Fricke et al. [10, 20], la quantità di latte prodotta dalla bovina sarebbe un fattore determinante per spiegare l'incidenza di gravidanze gemellari. Questi ricercatori hanno dimostrato un'ipotesi secondo la quale esisterebbe una correlazione tra gravidanze multiple e alta produzione. La doppia ovulazione è correlata statisticamente in modo positivo all'aumento di produzione. Analogamente, attraverso questo meccanismo si spiegherebbe la diversa incidenza di gravidanze gemellari, in funzione del numero di lattazioni: nelle bovine pluripare l'incidenza della gravidanza gemellare è più alta, ma anche le produzioni sono maggiori. In pratica l'elevato metabolismo steroideo, viene proposto come la congiunzione tra l'elevata produzione e la doppia ovulazione. Si è ipotizzato che l'elevata produzione di latte incrementi il me-

tabolismo steroideo per aumento del transito ematico dal tratto digestivo al fegato (il fegato è la sede primaria del metabolismo steroideo) [10, 20].

Secondo Echternkamp et al. [11], gli indici riproduttivi di bovine che hanno partorito un vitello singolo sono migliori rispetto a quelli di bovine che hanno avuto una gravidanza gemellare: è più corto il periodo parto-primi calore ($P < 0,01$) e anche il *pregnancy rate* in questi animali è migliore rispetto a quelli con gravidanza multipla e/o distocia.

Eziologia

I gemelli possono essere monozigoti o eterozigoti (foto 2 e 3). Nella gravidanza gemellare monozigote, si ha l'ovulazione di un singolo oocita, da un singolo follicolo di Graaf. L'embrione neoformato si splitta dando luogo alla crescita di due embrioni, ovviamente dello stesso sesso e identici, con un solo corpo luteo.

I gemelli eterozigoti, risultano dall'ovulazione e fertilizzazione di due oociti, approssimativamente nello stesso momento [14]. I due oociti sono prodotti dalla simultanea ovulazione (solo alcune ore di differenza) di due follicoli di Graaf, presenti sullo stesso ovaio o, uno per ovaio. A conferma della doppia ovulazione, si avrà la presenza di due corpi lutei [14].

Studi sperimentali stanno dimostrando che lo sviluppo della gravidanza gemellare, ha alla base ovulazioni doppie o triple, per la contemporanea maturazione di due o tre follicoli dominanti [14].

Il tasso di doppie ovulazioni e il tasso di gravidanza sono stati messi in relazione tra loro [15]. Nella sperimentazione sono state prese in esame 1.917 inseminazioni, realizzate su un gruppo di bovine ad elevata produzione; le bovine sono state esaminate ultrasonograficamente 11 giorni post-inseminazione, per verificare la presenza del

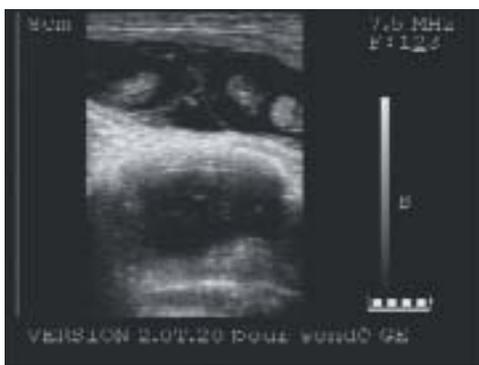


Foto 2. Gemelli al 43° giorno di gravidanza.

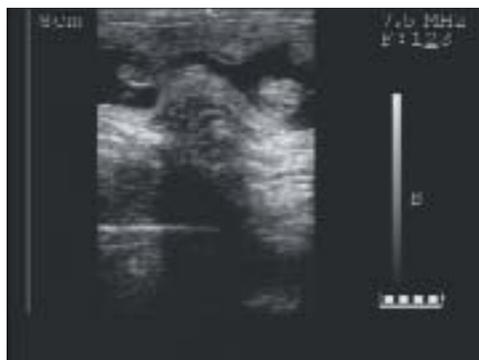


Foto 3. Gemelli al 33° giorno di gravidanza.

Incidenza della gemellarità in funzione della razza

Razza	Incidenza
Brown Swiss	2,7-8,85%
Holstein	3,08-3,3%
Ayrshire	2,8%
Guernsey	1,95%
Jersey	1%

Meadow e Lush 1957, Johansson 1968.

Tabella 1

corpo luteo (o dei corpi lutei).

È stato rilevato che solo il 6,5% degli animali non ha ovulato dopo l'inseminazione e che il tasso di non ovulazione è risultato quattro volte maggiore durante l'estate, rispetto al periodo a clima temperato: se ne è dedotto che il rischio di non ovulazione era 3,9 volte maggiore durante l'estate.

Nella stessa prova, non sono emerse correlazioni tra livello di produzione e giorni di lattazione o numero di lattazioni, con l'incidenza di mancata ovulazione (tabelle 2 e 3). La doppia ovulazione ha interessato il 15,5% delle inseminazioni: nel 52,7% dei casi, si è trattato di doppia ovulazione monolaterale (42,5% a sinistra e 57,5% a destra); nel un 41,5% dei casi si è trattato di doppia ovulazione bilaterale e solo nel 5,8% dei casi si è avuta una tripla ovulazione.

Il rischio di doppie ovulazioni aumenta con il numero di lattazioni [18]; così nelle secondipare e terzipare, tenendo come riferimento le primipare, il rischio di doppia ovulazione è rispettivamente 3,4 e 5,6 volte maggiore.

L'alta produzione, sarebbe negativamente correlata con il tasso di doppie ovulazioni, il che contrasterebbe con il dato statistico di altri lavori [19, 20] che vedono aumentare l'incidenza di gravidanze gemellari, in funzione dell'aumento della produzione. Infine, il rischio di doppia ovulazione è maggiore durante la fase intermedia della lattazione, prendendo come parametro di confronto la parte iniziale e finale della medesima [15].

Percentuale di doppie ovulazioni in funzione del numero di lattazioni

I	6,7%
II	16,6%
III o >	25%

Da [15].

Tabella 2

Percentuale di doppie ovulazioni in funzione dei giorni di lattazione

< 90	13%
90-150	20,7%
> 150	14,2%

Da [15].

Tabella 3

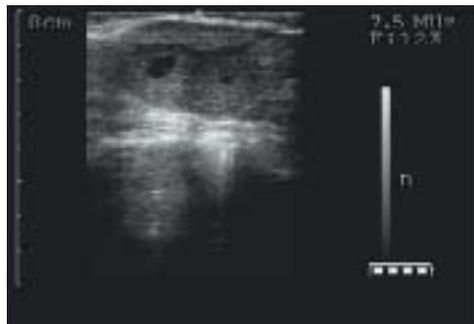


Foto 4. Doppio corpo luteo cavitario.

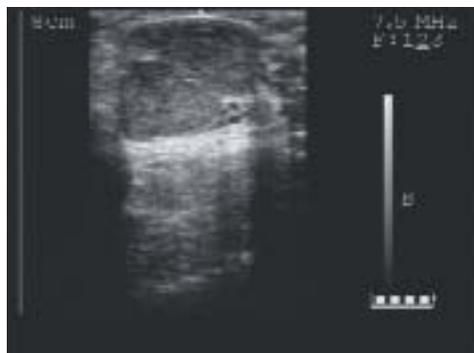


Foto 5. Doppio corpo luteo compatto.

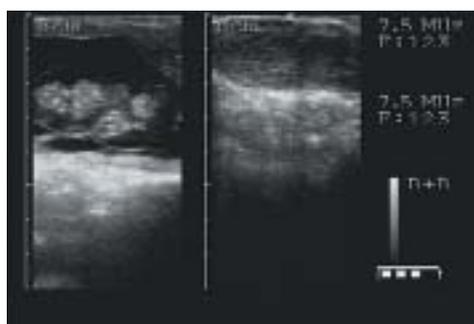


Foto 6. Doppio corpo luteo con gravidanza gemellare unicornuale.

Le ovaie delle bovine con gravidanze gemellari, contengono normalmente un superiore numero di follicoli piccoli (≤ 5 mm di diametro), medi (5,1-9,9 mm di diametro) e grandi (≥ 10 mm di diametro), rispetto alle ovaie di bovine con gravidanze non gemellari [14].

Nelle gravidanze gemellari eterozigoti, si hanno due corpi lutei; la massa luteinica totale è maggiore, rispetto a quella di una gravidanza singola, ma la massa dei singoli corpi lutei non differisce da quella del corpo luteo di una gravidanza singola [14] (foto 4, 5 e 6).

L'IGF-I, stimola la proliferazione, la differenziazione e steroidogenesi delle cellule follicolari, inibendone l'apoptosi [14]. La maggiore concentrazione di IGF-I nelle bovine con gravidanza gemellare, potrebbe



spiegare il meccanismo in base al quale si realizza la gemellarità, attraverso un incremento del reclutamento di follicoli, o riducendone l'atresia. Una alternativa a questa ipotesi potrebbe essere che lo sviluppo di più di un follicolo dominante in vacche con gravidanza gemellare è conseguente a una minor produzione di fattori inibenti la crescita follicolare (dei follicoli coartali) da parte di un follicolo dominante: a causa di ciò, la crescita dei follicoli subordinati continua fino allo sviluppo di più di un follicolo di Graaf.

Sta emergendo come un ruolo chiave nei tassi di gemellarità venga giocato dalle linee paterne: alcuni tori danno infatti più gemelli di altri.

Le coppie di cromosomi coinvolte nella gemellarità sarebbero le numero 5, 7, 19 e 23 [16].

Gemellarità e morte embrionale

L'incidenza di mortalità embrionale nell'allevamento bovino ad alta produzione è in aumento [13, 6].

Secondo Lopez-Gatius et al. [12], la gravidanza gemellare rappresenta un'importante problema manageriale nell'allevamento bovino da latte, anche per l'incremento di morte embrionale a essa correlato. Sono state monitorate 211 gravidanze gemellari in bovine da latte ad elevata produzione, per verificare quale fosse il momento di massima incidenza di mortalità embrionale. La gravidanza è stata diagnosticata ecograficamente per via transrettale tra il 36° ed il 42° giorno dopo l'inseminazione; gli animali, dopo la diagnosi positiva, sono stati ricontrollati settimanalmente fino al 90° giorno di gravidanza o fino all'interruzione della medesima, se questa avveniva prima del 90° giorno. La vitalità fetale è stata analizzata monitorando il battito fetale intorno al 50° giorno post-inseminazione.

Il 40,8% dei gemelli era bilaterale, mentre il 59,2% monolaterale.

È stata registrata la morte di un solo embrione in 35 bovine (16,6%); in 33 di queste gravidanze l'accertamento era stato fatto al momento della diagnosi di gravidanza. In 22 animali la diagnosi di morte embrionale è stata emessa tra la prima e la quarta settimana successiva alla diagnosi di gravidanza gemellare. In pratica, 13 animali, ossia il 6,2% del totale degli animali, hanno portato avanti la gravidanza con un solo embrione.

In totale la morte embrionale prima del 90° giorno di gravidanza (69 ± 14 giorni), ri-

guardò 51 bovine (24,2%): in 7 di loro (8%), la gemellarità era bilaterale, mentre in 44 (35,2%) si trattava invece di gemellarità unilaterale (32,4% destra e 39,2% sinistra).

La morte di un solo embrione è risultata significativamente più bassa ($P = 0.02$) nelle gravidanze gemellari bilaterali (9,3%), rispetto alle gravidanze gemellari monolaterali (21,6%).

Alcuni autori, ritengono che la mortalità embrionale, in caso di gravidanza gemellare, sarebbe più tardiva rispetto a quella che si registra in corso di gravidanze singole [13].

Diagnosi

La diagnosi di gravidanza gemellare deve essere innanzi tutto precoce. Ovviamente il concetto di precocità è funzionale al tempo che intercorre tra inseminazione e diagnosi.

È utile sapere se la bovina è gravida tra i 25-28 giorni, ma è indispensabile saperlo tra i 28 e i 30 giorni post-inseminazione. Questo dato permette infatti di fare delle utilissime considerazioni tra avvenuta gravidanza e morte embrionale, da un lato, e infertilità dall'altro.

La diagnosi di gemellarità deve essere effettuata tramite esame ultrasonografico; la valutazione manuale è impossibile quando realizzata a 30-45 giorni; pressoché inutile (e sempre estremamente fortuita), quando realizzata a 45-60 giorni di gravidanza. Appurato che l'unico strumento efficace e pratico per una diagnosi di gravidanza gemellare è l'ecografo, è necessario applicare un metodo, che si adatti all'abilità dell'ecografista. Indipendentemente dal fatto che si avvii la diagnosi precoce di gravidanza a 25 o a 30 giorni post-inseminazione, la prima cosa da fare è verificare se è presente un corpo luteo, senza il quale non può esserci gravidanza.

Il secondo step sarà verificare se è unico o se sono presenti altri corpi lutei, ricordando che due corpi lutei possono essere entrambi da un lato (destro-sinistro), o uno per ciascun ovaio.

Una volta che si è rilevata la presenza di due corpi lutei ed è stato quindi appurato che la bovina potrebbe non essere vuota, si deve dimostrare la presenza di uno o due embrioni. Va ricordato che solo l'identificazione dell'embrione permette di stabilire con certezza che la bovina è gravida.

Un buon 50% delle gravidanze caratterizzate da due corpi lutei, è gemellare: questo impone all'ecografista una particolare attenzione nel caso vengano rilevati due cor-

pi lutei. Nel caso in cui i corpi lutei siano sullo stesso ovaio, è importante ricercare presso il corno uterino ipsi-laterale l'embrione o gli embrioni. Nel caso invece che entrambe le ovaie portino un corpo luteo, l'embrione o gli embrioni, andranno ricercati uno per ciascun corno uterino.

Va ricordato che a partire dal 33°-35° giorno, in caso di gravidanza gemellare mono-laterale, è possibile rinvenire un embrione a destra e uno a sinistra, pur avendo due corpi lutei destri o sinistri: ciò è reso possibile dell'estensione della gravidanza dal corno ipsi-laterale a quello contro laterale. Tale estensione parte indicativamente intorno al 30° giorno di gravidanza.

Tutte le volte che si diagnostica una gravidanza con due corpi lutei, tra il 25°-30° giorno post-inseminazione, e un solo embrione, è bene ripetere l'esame ultrasonografico dopo una settimana. L'evidenziazione dell'embrione a 25 giorni di gravidanza non è infatti facile in un 40% dei casi, se non dopo una manipolazione, spesso consistente, dell'utero. A partire dal 27°-28° giorno di gravidanza, l'evidenziazione dell'embrione avviene, nel 90% dei casi, facilmente e senza alcuna manipolazione uterina. Analogamente, l'accertamento di una doppia gravidanza, non è semplice al 25°-26° giorno di gestazione: ecco perché è consigliabile ripetere un secondo esame (o ritardare il primo di 1-2 giorni) dopo qualche giorno. Riassumendo, è necessario:

1 Fare diagnosi ultrasonografica (precoce) di gravidanza gemellare: tutte le volte che ci sono due corpi lutei, sospettare un gravidanza gemellare.

2 Monitorare le gravidanze gemellari: effettuare almeno due controlli tra la diagnosi e il 90° giorno post-inseminazione.

Vantaggi del servizio

È ampiamente documentato come la mortalità embrionale sia correlata positivamente con la gravidanza gemellare. Si è anche visto che la gravidanza gemellare non si può diagnosticare se non tramite ecografia. Si tratta inoltre di un problema in forte e costante aumento che conduce, parallelamente, all'incremento della mortalità embrionale ad esse correlata.

Se non si effettua la diagnosi ecografia di gemellarità, l'unica cosa che è possibile dire di fronte a una morte embrionale precoce è: "... Facciamo degli accertamenti sierologici!". Nel caso in cui, però, si tratti di una gravidanza gemellare, non si riuscirà a ottenere nessuna indicazione dall'accertamento sierologico, facendo in compenso

perdere tempo e denaro all'allevatore...

In molti casi, la morte embrionale (di uno solo o di entrambi gli embrioni) avviene prima della diagnosi di gravidanza (esame a 35-45 giorni): la bovina viene considerata "problema", in quanto non gravida, ma la realtà è che la bovina era stata ingravidata normalmente, ma non ha poi portato a termine la gravidanza a causa della gemellarità.

L'approccio terapeutico-gestionale del tecnico deve essere molto diverso, ovviamente, a seconda che la bovina abbia avuto una morte embrionale precoce (con o senza gemelli), oppure abbia un problema di fertilità.

La conoscenza precoce di una gravidanza gemellare, permette di ridimensionare l'entità del problema "morte embrionale/fetale": il pregiudizio verso forme infettive (BVD/MM per esempio) è infatti sempre estremamente forte.

Da un punto di vista terapeutico, non esiste una terapia, accertata e valida, per ridurre l'incidenza di morte embrionale tra i gemelli. È stato invece riportato da diversi tecnici come l'incidenza della gravidanza gemellare si riduca proporzionalmente all'incremento di utilizzo dei programmi di sincronizzazione.

In alcuni casi, non giungono a morte entrambi gli embrioni, ma uno solo; se l'embrione che muore è un maschio e l'embrione che rimane è una femmina, è possibile avere la formazione di un free-martin.

Ovviamente l'ecografia in sé non risolve questo problema, ma se al momento del sesso (60-90 giorni di gestazione) si diagnostica una gravidanza femminile e non si evidenzia più l'altro feto, potendo quest'ultimo essere di sesso maschile, si porrà sotto controllo precoce (4-6 mesi dalla nascita) la vitella che nascerà, al fine di stabilirne rapidamente l'eventuale riforma.

Naturalmente conoscere il sesso dei gemelli è utile indipendentemente dal fatto che uno dei due possa essere un free-martin.

Sapere che una gravidanza è gemellare, permette di anticipare e/o prevenire tutta una serie di problematiche, le stesse che rendono questo tipo di gravidanza "sgradita" alla maggior parte degli allevatori di bovini da latte.

Nelle gravidanze gemellari, il parto è anticipato: di questo occorre tener conto, ponendo gli animali in asciutta anticipatamente rispetto alla data prevista. Analogamente andrà anticipato il periodo di *steaming up*. Questo permetterà di ridurre le problematiche metaboliche sempre associate alla gravidanza gemellare: ritenzione





Foto 7. Assicurando una pronta assistenza ostetrica al parto in caso di gravidanza gemellare si riduce l'incidenza della natimortalità.

di placenta, chetosi, dislocazione abomassale, metrite. In caso di gravidanza gemellare, nessun allevatore nega assistenza al parto...ovviamente se ne è a conoscenza. Assicurando una pronta assistenza ostetrica al parto in caso di gravidanza gemellare, si riducono gli effetti della distocia e soprattutto si riduce l'incidenza della natimortalità (foto 7).

Conclusioni

La diagnosi precoce di gravidanza gemellare, permette di prendere una serie di decisioni in merito al futuro produttivo e/o riproduttivo dell'animale; l'obiettivo di queste scelte è quello di ridurre al minimo la perdita, per un problema di per sé poco controllabile e/o prevedibile. Le scelte che l'allevatore e il tecnico posso-

no fare sono diverse:

- 1 La bovina può essere riformata.
- 2 La bovina può essere venduta.
- 3 La bovina può essere mantenuta in allevamento, gestendone con cura la gravidanza, assicurandole adeguate integrazioni specialmente in asciutta e garantendo una pronta assistenza al parto.
- 4 La bovina in caso di aborto viene nuovamente inseminata.
- 5 Si interrompe la gravidanza della bovina.

Sulle prime due scelte, non è possibile alcun commento, essendo vincolate alla situazione di ogni singola azienda e soprattutto ai suoi bilanci e obiettivi. La scelta di inseminare nuovamente una bovina che ha abortito dei gemelli viene fatta per ragioni genetiche o per opportunità, ma economicamente ha un costo elevatissimo se l'aborto si è verificato dopo il quarto mese di gestazione e, soprattutto, se la bovina ha più di 1-2 parti al suo attivo, magari con molti giorni di lattazione in corso.

In caso si decida per l'interruzione di gravidanza è bene sapere che il rischio che si ripeta una nuova gravidanza gemellare è molto elevato.

Appare chiaro come la gravidanza gemellare sia un problema e come non sia facile gestirlo. Nonostante questo, è fondamentale monitorarla in azienda già precoce, ricorrendo all'esame ultrasonografico. È necessario anche verificare l'incidenza della mortalità embrionale da gravidanza gemellare.

Laddove possibile, è utile cercare di ridurre l'incidenza della gemellarità ricorrendo ai programmi di sincronizzazione e ponendo particolare attenzione ai tori che si utilizzano in azienda per l'inseminazione. ■

Bibliografia

1-Laing J. A. Br. Vet. J. 1979; pp. 135-204, citato da F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina". Tep veterinaria 1989; pag. 147.
 2-F. Bottarelli. "Fertilità e Ipfertilità Bovina". Tep veterinaria. 1989.
 3-Bostedt H. (1982). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 95-101, citato da F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina", Tep veterinaria. 1989; pag. 147.
 4-Johansson I et al. Genetica e allevamento animale, citato da F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina". Tep veterinaria. 1989; pag. 147.
 5-Al Dahash S. Y. Vet. Rec. 1977; vol. 101; p. 296, citato da F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina". Tep veterinaria; 1989; pag. 147.
 6-Al Dahash S. Y et al. Vet. Rec. 1977; vol. 101; pp. 320-21, citato F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina".Tep veterinaria. 1989; pag. 147.
 7-Berra G. B. et al. (1984). Riv. Zoot. Vet., 12, 124., citato da F. Bottarelli in "Fertilità e Ipfertilità Bovina", Tep veterinaria 1989, pag. 147.
 8-Gilmore et al., 1952. Citato da Arthur G., et Al., in Veterinari Reproduction and Obstetrics. Tindall Ed. 1983, sixth Ed., p. 77.
 9-Karlsen A., Ruane J., Klemetsdal G., Hering-

stad B. Twinning rate in Norwegian cattle: frequency, (co) variance components, and genetic trends. J. A. S. 2000; vol. 78, n. 1: pp. 15-20.
 10-Fricke P. M., Wiltbank M. C. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. Theriogenology. 1999; vol. 52, n. 7: pp. 1133-1143.
 11-Echternkamp S. E., Gregory K. E. Effects of twinning on postpartum reproductive performances in cattle selected for twin births. J. Anim. Sci. 1999; vol. 77, n. 1: pp. 48-60.
 12-Lopez-Gatius F., Hunter R. H. Spontaneous reduction of advanced twin embryos: its occurrence and clinical relevance in dairy cattle. Theriogenology. 2005; vol. 63, n. 1: pp. 118-125.
 13-Lopez-Gatius F., Santolaria P., Yanez J. L., Garbayo J. M., Hunter R. H. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. Reprod. Domest. Anim. 2004; vol. 39, n. 6: pp. 429-433.
 14-Echternkamp S. E., Roberts A. J., Lunstra D. D., Wise T., Spicer L. J. Ovarian follicular development in cattle selected for twin ovulations and births. J. Anim. Sci. 2004; vol. 82: pp. 459-471.

15-Lopez-Gatius F., Lopez-Bejar M., Fenech M., Hunter R.H. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risk factors and effects. Theriogenology. 2005; vol. 63, n. 5: pp. 1298-307.
 16-Komisarek J., Dorynek Z. Genetic aspects of twinning in cattle. J. Appl. Genet. 2002; vol. 43, n. 1: pp. 55-68.
 17-Echternkamp S. E., Gregory K. E. Effects of twinning on gestation length, retained placenta, and dystocia. J. Anim. Sci. 1999; vol. 77, n. 1: pp. 39-47.
 18-Johanson J. M., Berger P. J., Kirkpatrick B. W., Dentine M. R. Twinning rates for North American Holstein Sires. J. D. Sci. 2001; vol. 84, n. 9: pp. 2081-8.
 19-Kinsel M. L., Marsh W. E., Ruegg P. L., Etherington W. G. Risk factors for twinning in dairy cows. J. Dairy Sci. 1998; vol. 81, n. 4: pp. 989-93.
 20-Wiltbank M. C., Fricke P. M., Sangsritavong S., Sartori R., Ginther O. J. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. J. Dairy Sci 2000; vol. 83, n. 12: pp. 2998-3007.