

İNEKLERDE TRANSREKTAL ULTRASONOGRAFİ, SERUM PROGESTERON ANALİZİ VE VAGİNAL SMEAR MUAYENESİ İLE ERKEN GEBELİK TANISI

Deniz Nak¹@

Yavuz Nak¹

Dilek Arsoy Başaran²

Abdülkadir Keskin¹

Early Pregnancy Diagnosis in Cows by means of Transrectal Ultrasonography, Analysis of Serum Progesterone and Examination of Vaginal Smear

Özet : Bu çalışma ineklerde erken gebeliğin tanısı için tohumlama sonrası 21., 38. ve 46. günlerde transrektal ultrasonografi, serum progesteron analizi ve vaginal smearin sitolojik muayenesi gibi üç farklı metodun karşılaştırılması ve embriyonik ölümlerin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Çalışmada materyal olarak Holstein ırkından, 3-6 yaşlı, 44 adet inek kullanıldı. Ultrason muayenesinin 21. günde sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %82.3 ve %59.2 idi, fakat 38. ve 46. günlerde sırasıyla %100-100 ve %100-100 olarak bulundu ($P < 0.05$). 21. günde gebe ve gebe olmayan ineklerde progesteron konsantrasyonları önemli değişiklikler gösterdi ($P < 0.001$). Gebe ve gebe olmayan ineklerde toplam intermedier ve parabasal hücre sayılarında 21., 38. ve 46. günlerde önemli değişiklikler belirlendi. Sonuç olarak gebeliğin 38. ve 46. günlerinde ineklerde transrektal ultrasonografinin kullanımı ile gebelik teşhisinin hızlı, doğru ve güvenilir olarak yapılabileceği saptandı. İneklerde 21.günde serum progesteronundan yararlanarak yapılan gebelik teşhisinin güvenilir bir metot olduğu tespit edildi. Gebelik teşhisinde minimum ve maksimum intermedier + parabasal hücre sayılarının gebe ve gebe olmayan ineklerde benzer olmasından dolayı vaginal smearin muayenesi metodu güvenilir bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: İnek, Gebelik Teşhisi, Ultrasonografi, Progesteron, Vaginal Smear

Summary : This study was done to compare three method for diagnosing early pregnancy as transrectal ultrasonography, serum progesterone assay, cytological examination of vaginal smear on days 21th, 38th and 46th post-inseminated and of the embryonic losses in the cows. Fourty four Holstein cows, between 3-6 years old were used as materials. The sensitivity and specificity of the ultrasound examination in the 21th were 82.3% and 59.2%, respectively, but were 100%-100% and 100%-100% in the 38th and 46th days, respectively ($P < 0.05$). Progesterone concentration in the non pregnant and pregnant cows showed significant differences on the 21th day ($P < 0.001$). Total Intermediate and parabasal cell count in the non pregnant and pregnant cows determined significant differences on the 21th, 38th and 46th days. In conclusion, the use of transrectal ultrasonography of cows on days 38th and 46th of gestation offers a rapid, accurate and reliable diagnosis of pregnancy. In cows, diagnosis pregnancy using serum progesterone was detected as reliable method on 21th days. Pregnancy diagnosis by examination of the celluler content of vaginal smear was not reliable because of minimum and maximum intermediate and parabasal cell count were similar in the non pregnant and pregnant cows.

Key Words: Cow, Pregnancy Diagnosis, Ultrasonography, Progesterone, Vaginal Smear

Giriş

Erken gebelik teşhisinde amaç, gebe olanların belirlenmesi değil, daha doğru bir yaklaşımla gebe olmayan hayvanların olabildiğince erkenden belirlenmesidir. Böylece gebe olmayan hayvanların yeniden gebe kalma şansları araştırılabilir veya istenmiyorsa sürüden çıkartılabilirler (Youngquist, 1997; Alaçam, 2002).

İneklerde bugüne kadar gebelik tanısı amacıyla;

plazma ve sütte progesteron konsantrasyonu, kan veya sütte östron sülfat, erken gebelik faktörü (EPF), gebelik spesifik antijenler, placental lactogen (PL), gebelik spesifik protein B tayini gibi laboratuvar, rektal palpasyon, ultrasonografik metotlar; fetal elektrokardiyografi gibi klinik metotlar kullanılmıştır (Youngquist, 1997; Noakes ve ark., 2001, Alaçam, 2002),

İneklerde gebeliğin teşhisinde ultrasonografi yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Erken gebelik teş-

hisi için ultrason rektal palpasyona nazaran daha az zararlı bir tekniktir ve rektal palpasyonda nadiren gözlenen abort insidansı daha da azaltılabilir. Bu yöntem muhtemelen standart olan rektal palpasyonun yerine geçecektir (Youngquist, 1997; Fricke, 2002). Düvelerde 7.5MHz'lik propla yapılan transrektal ultrasonografi ile tohumlamadan sonra en erken 9 günden itibaren gebelik tanısı yapılabilmektedir (Boyd ve ark., 1988). Yine düvelerde 5 MHz'lik propla yapılan transrektal ultrasonografi ile 12-20. günler arasında embriyonik vezikülün (Pierson ve Ginther, 1984; Totey ve ark., 1991), 24 -29. günden itibaren ise embriyo ve kalp atımlarının belirlenebildiği ifade edilmektedir (Pierson ve Ginther, 1984; Muller ve ark., 1986). Ultrasonografi ile gebeliğin erken tanısının yanı sıra embriyo-fötusun canlılığı ve sayısı, gebelik anomalileri, gebelik yaşı ve fötusun cinsiyeti de belirlenebilmektedir (Youngquist, 1997; Noakes ve ark., 2001; Alaçam, 2002; Fricke, 2002).

İneklerde erken gebelik tanısı amacıyla kan ve süt progesteron hormonu düzeylerinin ölçülmesine sıklıkla başvurulmaktadır (Alaçam, 1987; Pieterse ve ark., 1990). Alaçam ve ark. (1987), progesteron düzeylerinin ölçülmesi için aşımı izleyen 21-23. günlerdeki ölçümler avantajlı olmakla birlikte, bazı araştırmacıların 38 ve 46. günlerde toplanan örnekler ile daha doğru sonuçlar alınabileceğini ifade ettiklerini ileri sürmektedir. Aşımı izleyen ikinci östrus dönemine rastlayan bu günler arasındaki 8 günlük aralığın, siklusların uzayabilme ihtimali ile tohumlamadaki yanlış zamanlamaları da göz önünde tuttuğunu, yine çoğu erken embriyonik ölümün 42. günden önce şekillenmesi nedeniyle fertilité yönünden 38-46. günlerde yapılan ölçümlerin 21. günde yapılanlara kıyasla daha sağlıklı sonuçlar vereceğini ifade ettiklerini bildirmektedirler.

İneklerde vaginal sitoloji reproduktif durumlardaki spesifik değişiklikleri gösterir. Vaginal sitolojide, östrusta süperfisiyel ve kornifiye hücrelerin, di-östrusta nötrofil ve intermediyer hücrelerin, anöstrusta nukleusların, gebelikte nukleus ve parabasal hücrelerin, endometritiste nötrofiller ve endoservikal hücrelerin ve ovaryum kistlerinde kısmen kornifiye süperfisiyel intermediyer hücrelerin sayılarında artış görüldüğü ifade edilmektedir (Subramanian ve Patbaraman, 1986).

Bu çalışma da, ineklerde erken gebeliğin teşhisinde transrektal ultrasonografi, serum progesteron analizi ve vaginal smearin sitolojik muayenesi gibi üç farklı metodun etkinliğinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi ve embriyonik ölümlerin belirlenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod

Bu çalışma da, U.Ü. Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliğinde bulunan 3-6 yaşlı, Holstein ırkı 44 adet inek araştırma materyali olarak kullanıldı.

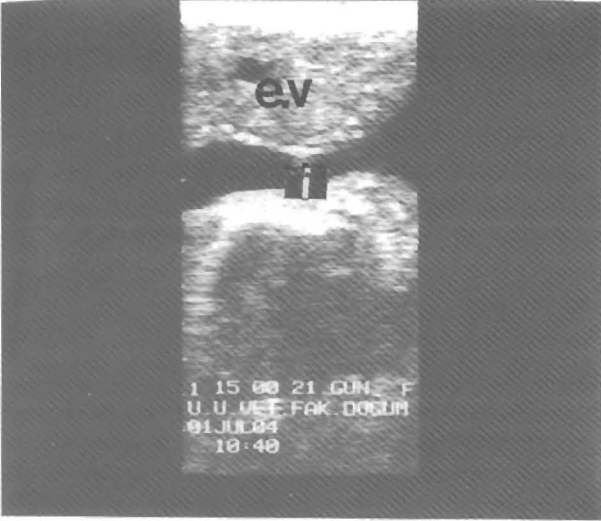
İşletmede bulunan hayvanların suni tohumlama kayıtları gözden geçirilerek, 21 gün önce tohumlanmış inekler çalışmaya alındı. Bütün ineklere tohumlamayı takiben 21., 38. ve 46. günlerde ultrasonografik muayene, serum progesteron değerlerinin tayini ve vaginal sitolojinin muayenesi yapıldı. Ultrason muayeneleri 5 MHz'lik linear array proplu, real time ultrasonografi cihazı ile transrektal yolla gerçekleştirildi. Serum progesteron düzeylerinin tayini için aynı günlerde kan örnekleri toplandı. Kan örneklerinin +4 ° C'de, 3000rpm 'de, 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar -20° C 'de analiz yapılabilmektedir. Serum progesteron düzeyleri " micro-titrasyon plak enzimeimmunoassay" tekniği (Munro ve Stabenfeldt 1984; Van de Wiel ve ark., 1986; Güven, 1988) kullanılarak Ankara Nükleer Tarım ve Hayvancılık Araştırma Enstitüsünde belirlendi. Vaginal sitoloji için yaklaşık 15-20 cm uzunluğundaki çubuğun ucuna sarılı pamuk eküvyon serum fizyolojik ile ıslatıldıktan sonra vestibulum vaginaya kadar ilerletildi. Pamuklu çubuk, eksenini etrafında döndürülerek mukozaya sürtüldü ve geri çekildi. Pamuklu çubuk lam üzerinde bastırılıp, yuvarlandı. Hazırlanan preparat etil alkolde 15 dakika süre ile tespit edilip, Giemsa ile 30 dakika boyandı. İmmersiyon objektifinde incelendi. Anuklear superficial, superficial, intermedier ve parabasal hücre tipleri değerlendirildi. Değerlendirme toplam 100 hücre üzerinden yapıldı.

46.gündeki ultrasonografik muayene bulgularına göre gebe olduğu belirlenen 25 inek uygulama, gebe olmadığı belirlenen 19 inek kontrol grubu olarak değerlendirildi. Ultrasonografik muayenenin gebelik tanısındaki etkinliği, Doğru pozitif tanı (a), Yanlış pozitif tanı (b), Doğru negatif tanı (c), Yanlış negatif tanı (d), Doğruluk oranı (%) $(a+c/e) \times 100$, Duyarlılık: Sensitivite (%) $(a/a+d) \times 100$, Özgüllük: Spesifite (%) $(c/c+b) \times 100$, Gebe olanları belirleme değeri (%) $(a/a+b) \times 100$ ve Gebe olmayanları belirleme değeri (%) $(c/c+d) \times 100$ formülleri kullanılarak hesaplandı (Pieterse ve ark., 1990).

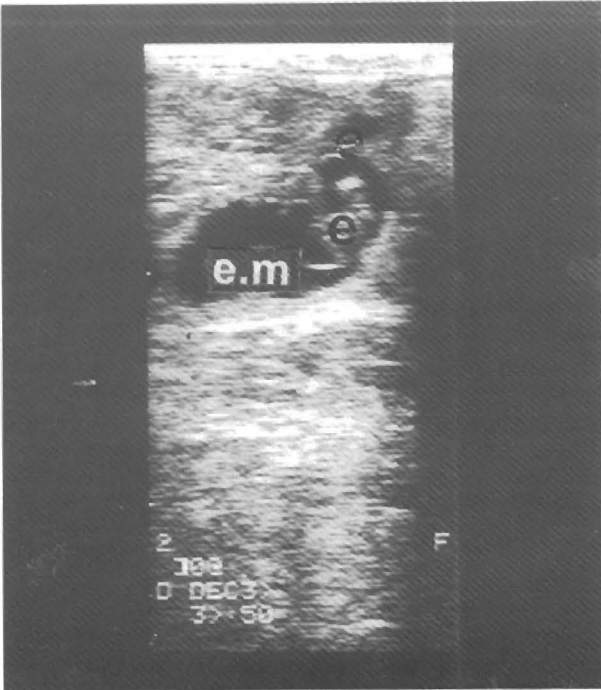
Gruplar arasında karşılaştırma yapılırken Student t testi kullanıldı. Ultrasonografik muayene bulguları karşılaştırılırken χ^2 testi uygulandı. Günler kendi içerisinde varyans analizi ve tukey testi ile karşılaştırıldı (SPSS, 1999).

Bulgular

Transrektal ultrasonografi ile gebeliğin 21, 38 ve 46. günlerinde embriyo, amnion kesesi ve sıvılarına

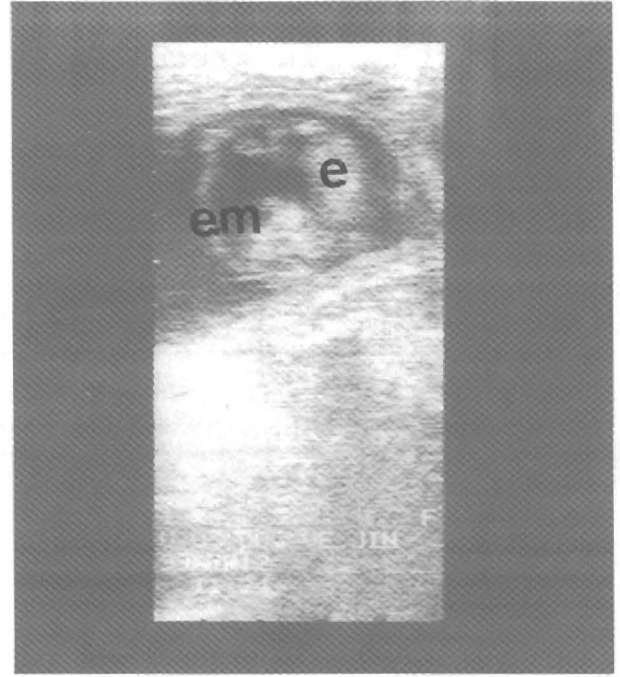


Şekil 1. 21. günlük gebelik embriyonik vezikül (e.v.), idrar kesesi



Şekil 2. 38. günlük gebelik embriyo(e), embriyonik membranlar (e.m).

ait bulgular belirlenmiştir. Gebe ineklerde 21, 38 ve 46. günlerdeki ultrasonografi görüntüleri şekil. 1,2 ve 3'te verilmiştir.



Şekil 3. 46. günlük gebelik embriyo(e), embriyonik membranlar (e.m).

Çalışma bulguları Tablo.1-6'da özetlenmiştir.

Gebe olan hayvanlarda 21. günde tespit edilen en düşük progesteron değeri 1.5ng /ml eşik değer olarak alındığında progesteronun gebe olan ve olmayan hayvanların tanısındaki doğruluk oranları Tablo.4'te verilmiştir.

Tablo 2. Tohumlamayı izleyen 21, 38 ve 46. günlerde gebe ve gebe olmayan ineklerde kan serumu progesteron düzeyleri

Gün	Progesteron(ng/ml)		İstatistik Önemi
	Gebelik (+) X ± S.H.	Gebelik(-) X ± S.H.	
21	2.75 ± 0.17	0.83 ± 0.28	P<0.001
38	3.01 ± 0.25	2.32 ± 0.33	n.s
46	3.57 ± 0.31	2.91 ± 0.70	n.s

Tablo 1. İneklerde üç farklı dönemde ultrasonografik muayenenin gebelik tanısındaki etkinliği

Parametreler	21.gün	38.gün	46.gün
Doğru pozitif tanı (a)	14	25	25
Yanlış pozitif tanı (b)	11	-	-
Doğru negatif tanı (c)	16	19	19
Yanlış negatif tanı (d)	3	-	-
Toplam (e)	44	44	44
Doğruluk oranı (%) (a+c/e)x100	68.1 ^a	100 ^b	100 ^b *
Duyarlılık:Sensitivite (%) (a/a+d)x100	82.3 ^a	100 ^b	100 ^b *
Özgüllük:Spesifite (%) (c/c+b)x100	59.2 ^a	100 ^b	100 ^b *
Gebe olanları belirleme değeri (%) (a/a+b)x100	56 ^a	100 ^b	100 ^b *
Gebe olmayanları belirleme değeri (%) (c/c+d)x100	84.2 ^a	100 ^b	100 ^b *

* Aynı satırda farklı üst harf taşıyan değerler arasında istatistiki açıdan önemli farklılık söz konusudur (P< 0.05).

Tablo 3. Gebe ve gebe olmayan ineklerde progesteron ölçümlerinin örnekleme günlerine göre istatistiksel değerleri

	GÜNLER			İstatistik Önemi
	21	38	46	
Gebe (+)	2.75 ± 0.17	3.01 ± 0.25	3.57 ± 0.31	n.s
Gebe (-)	0.83 ± 0.28 ^b	2.32 ± 0.33 ^a	2.91 ± 0.70 ^a	P<0.01

Tablo 4. Gebe olan ve olmayan hayvanlarda 21.gündeki progesteron değerlerinin doğruluk oranları

Gün	Gebe (+)	Gebe (-)
21.gün	% 89.28	% 100.00

Ultrasonografik muayenede 21. günde gebelik teşhisi konan üç vakada, 38 ve 46. günlerde gebeliğin devam etmediği gözlenmiştir. Ancak 21. gündeki doğruluk oranımız %100 olmadığı için ultrason bulgularını değerlendirirken gebe olmayan ineklerde gebe olarak değerlendirdiğimiz 3 vaka yanlış negatif tanı olarak kabul edildi. Bununla birlikte bu vakaların progesteron değerlerinin 21. günde yüksek olduğu, I ve II nolu vakada 38 ve 46. günlerde daha düşük olduğu, III nolu vakada ise 38. günden sonra düştüğü gözlemlendi(Tablo.5). Bu üç vakanın ultrason ve progesteron bulguları birlikte değerlendirildiğinde geç embriyonik ölüm olabileceği düşünüldü.

Tablo 5. Embriyonik ölüm olabileceği düşünülen vakalara ait 21, 38 ve 46. günlerdeki progesteron değerleri

Hayvan No	Progesteron(ng/ml)		
	21.gün	38.gün	46.gün
I	3.1	2	0.8
II	3.5	2.2	0.35
III	3	4.1	2.5

Tablo 6. Tohumlamayı izleyen 21, 38 ve 46. günlerde gebe ve gebe olmayan ineklerde toplam intermediyer ve parabasal hücre sayıları

Gün	İntermediyer + Parabasal Hücre Sayısı		
	Gebelik (+) X ± S.H.	Gebelik(-) X ± S.H.	İstatistik Önemi
21	59.08 ± 4.97	37.26 ± 4.97	P<0.004
38	77.80 ± 3.49	49.63 ± 5.78	P<0.0001
46	77.57 ± 3.41	40.10 ± 6.14	P<0.0001

Tartışma ve Sonuç

Gebelik tanısı için en ideal olan, tohumlama sonrası ilk olası östrüstan önce gebeliğin doğru olarak belirlenmesidir. Böylece zaman kaybı olmaksızın gebe olmayan inekler tekrar tohumlanabilirler. Ancak böyle bir test pratikte kullanım için henüz mevcut değildir. Gebeliği tespit etmek için bir çok metod gebeliğin 25 ve 40. günleri arasında kullanım için uygundur ve bir çok araştırmacıda gebe olmayan ineklerin tahmin edilen ikinci östrüstan önce belirlenmesini tavsiye etmektedirler. Nitekim ineklerde erken embriyonik ölümler gebeliğin ilk ayında daha sıklıkla meydana gelmektedir (Youngquist, 1997).

Sütçü düvelerde 5MHz'lik transrektal ultrasonografi ile gebeliğin 18. gününden önce teşhisin doğruluğunun %50'den az olduğu fakat bu oranın ge-

beliğin 20-22. günlerinde %100'e ulaştığı ifade edilmiştir (Kastelic ve ark., 1989). Ancak normal şartlar altında, 5 MHz'lik propla yapılan ultrasonografi ile yaklaşık gebeliğin 24 ila 26. gününden sonra ilk kez embriyo ve kalp atımlarının tespit edilebileceği anda gebeliğin hızlı ve doğru bir şekilde teşhis edilebileceği bildirilmektedir (Muller ve ark., 1986; Youngquist, 1997; Szenci ve ark., 2000). Badtram ve ark. (1991), 5 MHz'lik transrektal ultrasonografi ile gebeliğin 16 ila 22. günlerinde gebelik teşhisinin doğruluk oranını ve sensitivitesini %50 ve %25 olarak tespit ederken, bu oranları gebeliğin 23 ila 31. günleri arasında %70.2 ve %68.8 olarak belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada da (Pieterse ve ark.,1990) sensitivite ve spesifite gebeliğin 21-25. günlerinde %44.8 ve %82.3 olarak bildirilirken gebeliğin 26-33. günlerinde bu oranlar sırasıyla %97.7 ve %87.8 olarak bulunmuştur. Sunulan bu çalışmada da, gebeliğin 21. gününde sensitivite ve spesifite sırasıyla % 82.3 ve %59.2 iken, bu oranlar gebeliğin 38 ve 46. günlerinde sırasıyla %100-100 ve %100-100 olarak bulunmuştur(P<0.05). Östrusta fizyolojik olarak uterus sıvısının miktarının artması ya da gebe olan hayvanlarda sonradan embriyonik ölümlerin şekillenmesi gibi nedenler 21. günde ultrasonografi bulgularımızın düşük çıkmasına sebep olmuş olabilir. Ultrasonografik muayene gebelik tanısının yanı sıra aynı zamanda embriyo-fötusun canlılığı ve sayısı hakkında da bilgi vermiştir.

Progesteron hormonu ölçümü tohumlamayı izleyen ilk periyodik östrus evresinde yapılmalıdır (Youngquist, 1997; Noakes ve ark., 2001 Alaçam, 2002).Sunulan bu çalışmada, gebe olan ve olmayan hayvanlar arasında 21. günde progesteron düzeyleri 38 ve 46 günlere nazaran istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı çıkmıştır.(P<0.001). Günler kendi içerisinde karşılaştırıldığında, gebe olan hayvanlarda günler arasında önemli bir fark gözlenmezken, gebe olmayan grupta 21. gün diğer günlerden istatistiksel olarak önem ifade edecek şekilde düşük çıkmıştır(P<0.01). Ortalama olarak progesteron düzeyleri gebe olmayan hayvanlarda 1 ng/ml'nin altında iken gebe olanlarda 2-11 ng/ml arasında değişiklikler göstermektedir (Alaçam,2002). 21. günde gebe olmayan hayvanlarda 3 inek hariç diğer tüm ineklerde progesteron düzeyi 1 ng/ml'nin altında iken, gebe olan tüm ineklerde 1.5 ng/ml 'nin üzerinde ölçülmüştür. 21. günde tespit edilen en düşük progesteron değeri 1.5 ng/ml eşik değer alındığında progesteronun gebe olanları %89.28, gebe olmayanları ise %100 doğrulukla tespit edebildiği gözlenmiştir. Bu oranlar kan ve sütte progesteron ölçümü ile elde edilen literatürlerde (Inaudi ve ark.,1982; Pennington ve ark.,1985; Youngquist, 1997; Arthur ve ark.,2001; Alaçam,2002) verilen oranlarla uyum-

ludur. Embriyonik ölümler 21. günden sonra şekillenir ise, corpus luteumun yaşam süresi uzayacağı için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (Youngquist, 1997; Arthur ve ark.,2001; Alaçam,2002). Yirmibirinci günde gebe olmayan ineklerde 1ng/ml'nin üzerinde progesteron değerine sahip ve ultrasonda da gebelik tanısı konan, ancak 21. günde bulgularımız %100 olmadığı için yanlış negatif tanı olarak kabul ettiğimiz bu üç inekte ultrason bulguları ve tüm günlerdeki progesteron bulguları birlikte değerlendirildiğinde geç embriyonik ölüm olabileceğini düşündürmektedir.

Gebelik esnasında vaginal sitolojideki hücre tipleri gebeliğin normal gidişini ve genital bezlerin fonksiyonlarını iyi bir şekilde yansıtmaktadır (Subramanian ve Pattabiraman, 1986; Kostov,1972) . İneklerde gebelik esnasında, vaginal smearın muayenesinde gebeliğin birinci ve ikinci üç aylık periyodu esnasında hücre tipleri progesteronun varlığını göstermektedir. 7.8. ve 9. ayda östrojenik tipteki hücrelerin sayıları artarak toplam hücre sayısının %71.4'üne ulaşabilmektedir. (Kostov, 1972). Sunulan bu çalışmada, gebe hayvanlardaki toplam intermediyer ve parabasal hücre sayıları gebe olmayan hayvanlarla karşılaştırıldığında tüm günlerde istatistiksel olarak önem ifade edecek şekilde yüksek çıkmıştır.

Sonuç olarak, gebelik teşhisinde ultrason bulgularının doğruluk oranlarının gebeliğin 21. gününden sonra hızla yükseldiği, progesteron değerlerinin 21. günde güvenilir olduğu, vaginal sitoloji bulgularının ise gebe olan ve olmayan hayvanlarda minimum ve maksimum hücre sayılarının benzer olmasından dolayı çok güvenilir olmadığı belirlendi. Ayrıca embriyonik ölüm oranının önemsenmeyecek düzeyde az olmadığı bu nedenle erken teşhisin önemi kadar, sonraki günlerde hem gebelik teşhisinin bir kez daha doğrulanması ve fötusun gelişimi hemde gebelik anomalileri yönünden ultrason muayenelerinin tekrarlanması gerektiği kanısına varıldı.

Kaynaklar

- Alaçam,E. (1987). İneklerde Erken Gebelik Tanısı Amacıyla Kan ve Sütte Progesteron Hormonu Düzeylerinin Araştırılması. S.Ü.Vet.Fak.Derg., 3,1,13-24.
- Alaçam, E. (2002). Gebelik Tanısı.. alınmıştır "Evcil hayvanlarda Doğum ve İnfertilite", Ed. E. Alaçam, Sf.109-120, Medisan Yayın Serisi No.30, 4. Baskı,Ankara.
- Badtram,G.A.,Gaines,C.B.,Thomas,C.B.,Bosu,W.T.K. (1991). Factors influencing the accuracy of early pregnancy detection in cattle by real-time ultrasound scanning of the uterus. Theriogenology, 35, 6, 1153-1167.
- Boyd, J.S., Omran, S.N., Ayliffe, T.R.(1988). Use of a high frequency transducer with real-time B-mode ultrasound

- scanning to identify early pregnancy in cows. *Vet. Rec.*, 123,1,8-11.
- Curran, S., Pierson R.A., Ginther, O.J.(1986). Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 10 through 20. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189,10,1289-1294.
- Fricke, P.M. (2002). Scanning the future- Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 85, 1918-1926.
- Güven, B.(1988). Mikrotitrasyon Plak enzime immunoassay yöntemiyle ineklerde doğum sonrası süt progesteron düzeylerinin tayini. Ankara Üniversitesi Sağlık Bil. Enst., Ankara.
- Inaudi, P., Bacigalupo, M., Moniotta, C., Lugaro, G., Genazzani, A.R. (1982). Pregnancy diagnosis in cattle by a rapid and highly reliable method for progesterone determination in milk. *J. Reprod Fertil*, 65,2,265-273.
- Kastelic, J.P., Curran, S., Ginther, O.J. (1989). Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, 31,4,813-820.
- Kostov, L., Gospodinov, G., Kassabov, R.(1972). Histologic and cytologic studies on the vaginal mucosa in cows. II. During pregnancy and the puerperium. *Vet. Sci.*, Vol.IX, No.4, 41-47.
- Muller, E., Rath, D., Klug, E., Merkt, H.(1986). Usefulness of ultrasound for gynaecological diagnosis in cattle. *Berliner-und-Munchener-Tierarztliche-Wochenschrift*, 99,9, 311-318.
- Munro, C., Stabenfeldt,G.(1984). Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocr.* 101,41-49.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W., Arthur, G.H.(2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. Eight Edition, pg. 69-118, W.B.Saunders, Philadelphia.
- Pennington, J.A., Schultz, L.H., Hoffman, W.F. (1985). Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 post breeding: field study in dairy cattle. *J Dairy Sci.*,68,10,2740-2745.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J.(1984). Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*, 22,2, 225-233.
- Pieterse, M.C., Szenci, O., Willemse, A.H., Bajcsy, C.S.A., Dieleman, S.J., Taverne, M.A.M.(1990). Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. *Theriogenology*,33,3,697-707.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvao, K.N. (2004). The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Repro. Sci.*, 82-83,513-515.
- SPSS , 10.00 Computer Software (1999). SPSS Inc, Headquarter, 233 s.Wocker Drive, Chicago, Illinois 60606, USA.
- Subramanian, A., Pattabiraman,S.R. (1988). Exfoliative vaginal cytology in bovines. *Indian Journal of Animal Sciences*,58,2,209-211.
- Szenci,O., Beckers, J.F., Varga,J., Bajcsy,A.C.(2000). The accuracy of the diagnoses of early pregnancy and late embryonic mortality in the cow:a review. *Folia-Veterinaria*, 44,4,199-201.
- Totey SM, Singh G., Taneja, M.,Talwar, G.P.(1991). Ultrasonography for detection of early pregnancy following embryo transfer in unknown breed of Bos Indicus cows, *Theriogenology*, 35,3, 487-497.
- Van De Wiel, D.F.M., Koops,W., Vos, E.(1986). Enzyme and radioimmunoassay techniques for hormone determination in livestock. *IAEA.*, SM-292/7, 243-253.
- Youngquist, R.S. (1997). Pregnancy Diagnosis, In Youngquist, R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 295-309.