

İNEKLERDE ERKEN GEBELİK TANISI AMACIYLA
KAN VE SÜTTE PROGESTERON HORMONU DÜZEYLERİNİN
ARAŞTIRILMASI¹

*Determination of milk and plasma progesterone concentrations
for early diagnosing pregnancy in cows*

Erol ALAÇAM²
Tevfik TEKELİ³
A. Nuri SEZER⁴

Summary : The aim of this study was to investigate the pregnancy diagnosis rates by blood and milk serum progesterone assays at the first and second estrous periods after the natural servings in cows and heifers.

Fourty Swedish red cows and 10 heifers, between 2 - 11 years old, were used as materials.

Blood and milk samples were collected from cows in addition to blood samples taken from heifers on the days of 21, 38 and 45 days after serving. Blood and milk samples were centrifugated for 20 minutes at the 2000 and 5000 rpm respectively and were kept in at -20 until the determination of progesterone by radioimmunoassay method.

For the progesterone assays, «¹²⁵I Direct progesterone kits, IMM 1024, Immuchem Comp.» and «gamma counter, mini assay type, 6 - 20» were used. The figures higher than 2.30 ng/ml for plasma and 1.94 ng/ml for milk serum both the cows and heifers were evaluated as pregnant. Radioimmunoassay results were controlled by rectal examination on the 60 th day after the servings.

At the end of the study the correct diagnosis rates were 84.45 % and 100.00 % for pregnant and non pregnant animals.

- (1) Bu çalışma S. Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
- (2) Prof. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya.
- (3) Yrd. Doç. Dr., S. Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya.
- (4) Uzm. Dr., Özel Nükleer Tıp Merkezi, Konya.

The progesterone values for the blood samples taken at the 21 st, 38 th and 45 th days were not different statistically. A correlation at 5 % level was found between the blood and milk samples in cows and heifers.

As a conclusion, the high rate of correct pregnancy diagnosis can be obtained satisfactorily in cows and heifers by the assays of the blood and milk samples collected at the 21 st day of serving.

Özet : Bu çalışma, inek ve düvelerden aşımı izleyen ilk ve ikinci östrüs dönemlerinde toplanan kan ve süt örneklerindeki progesteron hormonu düzeylerini ölçerek erken gebelik tanısı sağlamak ve karşılaştırmalı olarak daha yüksek oranda gebelik tanısı şanslarını araştırmak amacıyla yapıldı.

Çalışmada materyal olarak İsviçre esmeri ırkından, 2 - 11 yaşlı, 40 inek ve 10 düve kullanıldı.

Doğal aşımaları izleyen 21., 38. ve 45. günlerde ineklerden kan ve süt, düvelerden ise sadece kan örnekleri alındı. Kanlar 2000 rpm de, sütler ise 5000 rpm de 20 dakika santrifüj edilerek, serumları çıkartıldı ve özel assay tüplerine aktararak, laboratuvar işlemlerine kadar derin dondurucuda ($-20C^{\circ}$) saklandı.

Progesteron hormonu ölçümleri radyoimmunoassay (RIA) yöntemi ile yapıldı ve çalışmada « ^{125}I Direct Progesteron Analiz Kiti, IMM 1024, Immuchem Corp.» ile «Mini assay, tip 6 - 20 Gamma sayıcı» kullanıldı.

Yapılan ölçümlere göre, progesteron düzeyleri, kan için 2.30 ng/ml den, süt serumu için 1.94 ng/ml den yüksek olanlar gebe, düşük olanlar ise gebe değil şeklinde sınıflandırıldılar.

RIA testi bulguları aşımaları izleyen 60. günde uygulanan rektal palpasyon ile kontrol edildi.

Çalışma sonucunda, gebelerde %84.45, gebe olmayanlarda ise %100.00 oranında doğrulukla tanı konulabildi.

Aşımı izleyen 21., 38. ve 45. gün kan değerleri ile inek ve düvelerden yapılan ölçümler arasında istatistiksel yönden bir farklılık görülmedi. Yine ineklerdeki kan ve süt değerleri arasında, 21 - 45. günlerde %5 düzeyinde bir korelasyon saptandı.

Sonuç olarak, inek ve düvelerden aşımı izleyen 21. günde alınan tek bir kan/süt örneğine uygulanacak RIA yöntemi ile yüksek oranda bir doğrulukla gebelik tanısı yapılabileceği kanısına varıldı.

Giriş

Progesteron hormonunun ineklerde gebelik sırasında periferik kandaki dominant özelliği ve yüksek düzeyleri, bu hormonun ölçümlerinin

gebelik tanısında yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. İneklerde gebelik tanısı amacıyla, tohumlamayı izleyen 19 - 24. günlerde kan ve süt progesteron değerleri ölçülerek değerlendirilmeler yapılmaktadır. Gebe ineklerde 21. günde kan progesteron düzeyi her zaman 2 ng/ml (6.4 nmol/lt) den fazla olup, genellikle 6 - 8 ng/ml (19.1 - 25.5 nmol/lt) kadardır. Gebe olmayanlarda ise bu değer ortalama 0.5 ng/ml (1.6 nmol/lt) ya da daha az miktarlardadır (4, 5).

İneklerde erken gebelik tanısı için RIA yöntemiyle yapılan çalışmalarda (2, 7, 9, 10), gebeliğin 21 - 23. günlerinde %76 - 98 arasında değişen oranlarda bir doğrulukla tanı yapılabildiği bildirilmektedir.

Progesteron hormonu düzeyinin yüksekliği her zaman gebeliğe bağlı olmayabilir. Bazı ineklerde östrüs siklusu 27 güne kadar uzayabilir ve 21. günde corpus luteum henüz aktif durumda bulunabilir. Yine erken embriyonik ölümlerde corpus luteum bir süre ovaryum üzerinde aktif olarak kalıp progesteron salgılamaya devam eder. Bu durumda değerlendirme sonuçları gebelik yönünden yanıltıcı olabilir. Bu nedenle RIA yönteminde gebe tanısı konulan hayvanlarda doğruluk oranı gebe olmayanların tanısına kıyasla daha düşüktür ve %75-90 arasında değişir (12, 13). Gebe olmayanlarda ise yöntemin doğruluk oranı daha yüksek olmaktadır. Gebe olmayanların tanısındaki yanlışlar, genellikle hatalı olarak metöstrüste tohumlanan ineklerde görülmektedir. Böyle durumlarda 21. günde alınan örneklerde progesteron düzeyi, ikinci luteal dönem nedeniyle, yüksek çıkabilir.

Aşağıdaki tabloda, kan plazması ve sütte progesteron düzeylerinin ölçülmesiyle yapılan bazı gebelik tanısı çalışmaları ile gebe ve gebe olmayan ineklerde konulan tanıların doğruluk oranları özet olarak sunulmuştur.

Tablo 1. Literatüre çalışma bulguları

Araştırmacılar	İnek sayısı	Örnek günü	Doğruluk oranı (%)	
			Gebe (+)	G. Değil (-)
Enne ve ark. 1984 (3)	230	22-25	86.4	100.0
Laing ve ark. 1979 (6)	82	38-46	90.3	90.0
Pennington ve ark. 1976 (11)	508	21	76.0	98.0
Pope ve ark. 1976 (14)	500	21	80.0	95-100.0
Shemesh ve ark. 1981 (16)	96	21-24	79.0	100.0

Progesteron düzeylerinin ölçülmesi için aşımı izleyen 21-23. günler erken tanı yönünden avantaj sağlamakla birlikte bazı yazarlar (6, 7, 10, 15), 38. ve 46. günlerde toplanan örnekler ile daha sağlıklı sonuçlar alınabileceğini ileri sürmektedirler. Bu araştırmacılar, 38 ve 46. günlerin hayvanın tohumlanması izleyen ikinci östrüs dönemine rastladığını ve 8 günlük aralığın siklusların uzayabilme ihtimalini de göz önünde tuttuğunu bildirmektedirler. Yine, çoğu erken embriyonik ölümün 42. günden önce şekillenmesi nedeniyle, fertilité yönünden 38-46. günlerde yapılan ölçümlerin 21. günde yapılanlara kıyasla daha sağlıklı sonuçlar vereceği ileri sürülmektedir (10).

RIA çalışmaları için ineklerde kan ve süt örnekleri alınmaktadır. Kan örneklerinin toplanma güçlüğüne karşılık, düveler için tek seçenek olmaktadır. Süt ise hayvan bakıcıları tarafından bile kolaylıkla toplanabileceğinden çalışmalar çoğunlukla süt üzerinde yapılmaktadır. RIA yönteminde elde edilen progesteron düzeylerinde, minimum ve maksimum değerler arasındaki geniş aralık tanı yönünden rahatlık sağlamaktadır. Sütte ölçülen 5 ng/ml ile, süt yağındaki 30 ng/ml nin altındaki değerler hayvanın gebe olmadığını ortaya koymaktadır (10). Progesteron yoğunluğunun daha yüksek olması nedeniyle bazı yazarlar (1) süt yağını, bazıları (6, 12) işlem kolaylığı bakımından total sütü, bazıları (14) ise daha sağlıklı sonuçlar verdiği iddiasıyla yağı alınmış sütü tercih etmektedirler.

Sunulan çalışmanın amacı, inek ve düvelerde, aşımı izleyen ilk ve östrüs dönemlerinde toplanan kan ve süt örneklerinde RIA yöntemiyle progesteron düzeylerini ölçerek erken gebelik tanısını sağlamak ve 21., 38. ve 45. günlerde toplanan örnekler arasında yapılacak karşılaştırma ile daha yüksek oranda gebelik tanısı şanslarını araştırmaktır.

Materyal ve Metot

1. Materyal :

Bu çalışma Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Konya İşletmesine ait 40 inek ve 10 düve üzerinde yapıldı. İsviçre esmeri ırkından olan bu hayvanların yaşları 2-11 arasında değişmekteydi. Yetiştirmede bazı yıllarda sun'i tohumlama uygulanmakla birlikte, çalışma sırasında doğal aşım yaptırılmaktaydı. İneklerin beslenme durumları normal olup bütün yıl boyunca akşamları kapalı barınaklarda tutuluyorlar, gündüzleri ise aşırı sert iklim şartları dışında mer'aya alınarak egzersiz yapmaları sağlanıyordu.

Yetiştirmenin kayıt sistemi düzgün olup, gebe olmayan hayvanlarda post partum östrüs kontrolleri, sabah akşam gözlenerek yapılmıyordu.

2. Metot :

2.1. Örneklerin alınması

Çalışmada kullanılan hayvanlardan doğal aşımı izleyen 21., 38. ve 45. günlerde üçer defa örnek alındı. İneklerden her defasında kan ve süt örneği toplanırken, düvelerden sadece kan alındı.

Kan örnekleri vena jugularis'ten, steril tüplere 10 ml miktarında alınarak kısa sürede 2000 rpm de 20 dakika santrfüj edildi ve serumu ayrılarak özel plastik tüplere aktarıldı.

Süt örnekleri için ise, meme başları iyice dezenfekte edilip, birkaç çekim süt dışarı atıldıktan sonra, steril tüpler içine, bütün meme bölümlerinden eşit miktarda alınarak, 10 ml kadar karma süt toplandı. Bu arada mastitis şüphesi gösteren meme bölümlerinin sütleri alınmadı. Toplanan süt örnekleri de 5000 rpm de 20 dakika santrfüj edildi ve üstte biriken kaymak tabakası özel bir tel yardımı ile özenle ayrılıp atıldıktan sonra kalan süt serumu plastik tüplere aktarıldı.

Daha sonra bütün örnekler, laboratuvar çalışmalarına kadar derin dondurucuda ($-20C^{\circ}$) saklandı.

2.2. Radyoimmunoassay çalışmaları

2.2.1. Deneylerde kullanılan aletler

- Derin dondurucu, Bosch (0 / - 60C°).
- Vortex mikser.
- Su banyosu, 37 C° dereceye ayarlı,
- Yarı ve tam otomatik, ayarlanabilir Socorex pipetler (50 - 1000 ml).
- Aksesuar laboratuvar aletleri,
- Gamma sayıcı, mini assay tip 6 - 20, I¹²⁵ için ayarlı, 1000 sn ye ayarlı zaman intervalli.

2.2.2. Çalışmada kullanılan hormon analiz kitleri

¹²⁵I Direct Progesteron Analiz Kitleri : IMM 1024, (Immuchem Corp.).

2.2.3. Kan ve süt örneklerinde progesteron hormonu ölçüm çalışmaları

Gamma sayıcı, cihaz sayıma başlamadan önce kalibre edildi ve çalışma yerindeki normal radyasyon (back ground) miktarı saptandı. Bu sa-

yım miktarı örnek ve standart ortalama sayımlardan çıkartılarak net sayımlar bulundu.

Toplanan kan ve süt örnekleri derin dondurucudan çıkartılarak, serbest halde oda sıcaklığına getirildi. Daha sonra iyice çalkalanarak homojenizasyonları sağlandı.

Çalışmada şu yol izlendi;

- Standart ve örnekler için çiftler tüp hazırlandı,
- Her standart ve örnekten 50 ml özel tüplerine konuldu,
- Bunların üzerine 1.0 ml Progesteron - ¹²⁵I ilave edilerek vortex mikserde karıştırıldı,
- Tüplerin ağızları para - film ile kapatılarak 37C° de 150 dakika inkübe edildi,
- Tüpler dökülerek boşaltıldı ve absorban kağıt üzerine ters çevrildi. Onbeş dakika sonra, ağız kenarları kurularak gamma sayıcıda sayıma başlandı. Her tüp 3 dakika süre ile sayıldı.

2.2.4. Verilerin elde edilmesi

Standart ve nünunelerin ortalamaları alındı. Bunlardan back ground ve NSB (non spesifik bağlanma) miktarı çıkartılarak net sayımlar bulundu. Bunlar sıfır standartına bölünerek % bağlanmalar hesaplandı.

$$\%B/BO = \frac{CPM (\text{örnek}) - CPM (NSB)}{CPM (O \text{ Standart}) - CPM (NSB)} \times 100$$

CPM : Ortalama sayım

Örnek : Hesaplanan örnek veya standart

NSB : Non - spesifik bağlanma

O Standart : O Tüpü

Elde edilen veriler, yüzde bağlanma/ng/ml ve CPM/ng/ml olarak iki ayrı log - linear ve logit - log grafik kağıtlarına işlenerek okundu. Veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

2.3. Rektal palpasyon ile gebeliklerin kontrolü

Deney hayvanlarında rektal palpasyon ile gebelik kontrolleri aşım - dan sonraki 60. günde yapıldı. Bulgular daha sonra RIA sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiler.

Bulgular

Kırk inek, 10 düve olmak üzere toplam 50 hayvan üzerinde yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler tablolar şeklinde sunulmuştur.

Tablo 2. Gebe ve gebe olmayan ineklerdeki ortalama kan progesteron değerleri (ng/ml).

	GEBE (+)				GEBE DEĞİL (-)			
	n	min.	mak	ort.	n	min.	mak.	ort.
İnek	21	2.30	14.40	7.10 \pm 0.60	17	0.1	2.69	1.39 \pm 0.69
Düve	8	2.68	11.50	6.60 \pm 0.80	1	—	—	0.11

Gebe olduğu saptanan inek ve düvelerin, 21., 38. ve 45. günlerdeki progesteron düzeyleri ve bunların istatistiksel değerlendirilmeleri tablo 3 de özetlenmiştir.

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

	G Ü N L E R			F
	21.	38.	45.	
İnek (kan)	6.70 \pm 0.58	6.95 \pm 0.77	7.72 \pm 0.73	0.564 ⁻
Düve (kan)	6.47 \pm 0.97	6.49 \pm 0.99	6.88 \pm 0.59	0.068 ⁻
İnek (süt)	1.94 \pm 0.23	2.08 \pm 0.28	3.52 \pm 0.40	7.703 ^{**}

(^{**}) : P < 0.01

(⁻) : P > 0.05

Gerek inek, gerekse düvelerde kan örneklerinden yapılan ölçümlerde 21., 38. ve 45. günlerdeki progesteron düzeyleri arasında istatistiksel yönden bir farklılık bulunmamıştır. İneklerden alınan süt örneklerinde ise 21. ve 45. günler arasındaki fark istatistiksel yönden önemli olarak görülmektedir.

Tablo 4 de gebe inek ve düvelerdeki kan progesteron değerlerinin istatistiksel karşılaştırması verilmiştir.

Tablo 4. İnek ve düvelerdeki kan progesteron değerlerinin karşılaştırması.

Örnek Günleri	İNEK	DÜVE	T
21. gün	6.70 \mp 0.58	6.95 \mp 0.77	0.324 ⁻
38. gün	6.95 \mp 0.77	7.72 \mp 0.73	0.025 ⁻
45. gün	7.72 \mp 0.73	6.88 \mp 0.59	0.068 ⁻

(⁻) : P > 0.05

Tabloda özetlenen ortalama değerlere göre ineklerle düvelerden elde edilen veriler arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır.

İneklerdeki kan ve süt verileri arasındaki korelasyon değerleri tablo 5'te sunulmuştur.

Tablo 5. İnek kan - süt verileri arasındaki korelasyon değerleri

GÜNLER	r
21	0.600 ^{xx}
38	0.230 ⁻
45	0.640 ^{xx}
21-45	0.480 ^x

(⁻) : P > 0.05, (^x) : P < 0.05, (^{xx}) : P < 0.01.

Aşımı izleyen 60. günde rektal palpasyonla yapılan kontrollerle karşılaştırmalı olarak RIA testinin doğruluk yüzdeleri ise tablo 6 da verilmiştir.

Tablo 6. Gebelik tanısı yönünden RIA testinin doğruluk oranları

	(GEBE (+))	GEBE DEĞİL (-)
İnek	%81.40	%100.00
Düve	%87.50	%100.00
Genel	%84.45	%100.00

Tartışma ve Sonuç

İnek yetiştiriciliğinde parasal yönden önemli bir yeri olan erken gebelik tanısı konusunda RIA yönteminin değişik birçok çalışmada başarı ile kullanıldığı çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmektedir (6, 7, 10, 11). Özellikle gebe olmayan hayvanların, aşımı izleyen 3. haftada, kan ve sütlerindeki, nanogram düzeyindeki progesteron hormonu ölçümleri ile yüksek oranda tanınabilmesi RIA yöntemini seçkin bir hale getirmektedir (3, 16).

Uluslararası Atom Enerjisi Komisyonu (5)'nin hazırladığı RIA laboratuvar el kitabında, aşımı izleyen 21. günde büyük ruminantlar için kan progesteron miktarının gebelerde daima 2 ng/ml den fazla ve genellikle 6 - 8 ng/ml olduğu, gebe olmayanlarda ise 0.5 ng/ml den düşük ölçüldüğü bildirilmektedir. Yine yapılan saha çalışmaları (2, 8, 17, 18) kan, süt yağı ve total süt örneklerinde sırasıyla 2, 30, 5 ng/ml nin üzerindeki değerleri gebe olarak göstermektedir. Sunulan bu çalışmada ise kan progesteron düzeyleri 0.1 - 14.40 ng/ml olarak ölçülmüştür. Buna göre 2.30 ng/ml den yüksek olanlar gebe, düşük olanlar gebe değil şeklinde sınıflandırılmışlardır. Bu ölçümlere göre konulan tanuların 60. günde uygulanan rektal palpasyon ile kontrolunda, gebe olanlarda %84.45, gebe olmayanlarda ise %100.00 oranında doğru sonuç verdiği anlaşılmıştır. Bu oranlar, gebe ve gebe olmayan inekler için Laing ve arkadaşları (6), Lukaszewska ve arkadaşları (8) ve Swenson (18) gibi araştırmacıların bildirdikleri miktarlara yakın ve paralel bir görünümde. Üzerinde çalışılan yağı alınmış süt örneklerindeki değerler de 0.10 - 3.52 ng/ml olarak ölçülmüştür. Bu miktarlardan da 1.94 ng/ml nin üzerinde olanlar gebe olarak kabul edilmiştir. Ancak olumlu veya olumsuz gebelik tanısı için elde edilen düzeyler arasındaki farkın az olması değerlendirmede güçlüğe neden olmuştur.

Diğer taraftan 21 - 45. günler arasında kan ve süt örneklerinden elde edilen değerler arasında bir korelasyon bulunduğu saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda süt örneklerine RIA yöntemi, yağı alınmış süte (14), süt yağına (1) veya total süte (6, 12) uygulanmaktadır. Pope ve arkadaşları (14)'nin sütün değişik zamanlarda farklı yağ miktarları içermesi nedeniyle seksüel siklus ve gebelik sırasında en sağlıklı sonuçların yağı giderilmiş sütle alındığını ileri sürmelerine karşılık, sunulan çalışmada süt serumunun çıkartılması işleminin uzunluğu ve elde edilen değerler arasındaki sınırın gebelik tanısı yönünden tayini güç bulunmuştur. Kanımızca, Laing ve arkadaşları (6) ile Pennington ve arkadaşlarının (12) tanımladığı gibi çalışmada total sütün kullanılması daha pratik ve sağlıklı sonuçlar verecektir.

RIA ile genellikle 21. günde konulabilecek tanılar avantajlı olmakla birlikte bazı araştırıcılar (6, 7, 10, 15), 38 - 46. günlerde toplanan örnekler ile daha doğru sonuçlar alınabileceğini ileri sürmektedirler. Bunlara göre, aşımı izleyen ikinci östrüs dönemine rastlayan bu günler arasındaki 8 günlük aralık, siklusların uzayabilme ihtimali ile tohumlamadaki yanlış zamanlamaları da göz önünde tutamakta, yine 42. güne kadar şekillenebilecek erken embriyonik ölümleri saptayabilme şansını sağlamaktadır. Bu çalışmada da yukarıda bildirilen ihtimaller göz önünde tutularak, aşımı izleyen birinci (21. gün) ve ikinci östrüs (38 - 45. günler) dönemlerinde ölçümler yapılmış, ancak değerlerin incelenmesi sonucunda erken embriyonik ölüme işaret edebilecek ve tanıyı değiştirebilecek bir bulguya rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada inekler ve düveler arasındaki kan değerleri karşılaştırılmış ve 21., 38. ve 45. gün bulguları arasında tanı yönünden istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır.

Sonuç olarak, 40 inek ve 10 düve olmak üzere toplam 50 baş büyük ruminant üzerinde yapılan bu çalışmada, RIA ile gebeliğin 21 - 45. günleri arasında gebe olmayanlarda %100.00, gebelerde ise %84.45 oranında doğrulukla gebelik tanısı yapılmıştır. Gebe olmayan hayvanların erkenden tanınmasının ekonomik önemi göz önünde tutulursa, aşımı izleyen 20. günde alınan tek bir örnekle (kan veya süt) yapılacak ölçümlerin en uygunu olduğu kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Caudle, A. B., Clekis, T., Thompson, F. N. and Van Camp, S. D. (1980). Progesterone in bovine milk fat. *Theriogenology*, 14, 5, 329 - 338.
2. Ding, H., Guo, Z. Q., Luo, R. N. and Chen, J. B. (1985). Early pregnancy diagnosis in dairy cattle by milk progesterone assay. *Acta Vet. Zootech. Sinica*, 16, 3, 155 - 158.
3. Enne, G., Fossati, P., and Perotti, L. (1984). Practical application of the radioimmunoassay of milk progesterone in pregnancy diagnosis of cows. *Rivista di Zootechnia e Veterinaria*, 12, 4, 229 - 233.
4. Heap, R. B. and Holdsworth, R. J. (1981). Hormone assays in reproduction and fertility. *Br. vet J.*, 137, 561 - 571.
5. International Atomic Energy Agency (1984). «Laboratory Training

- Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction.» Technical Report Series, 233, Vienna.
6. Laing, J. A., Eastman, S. A. K. and Bouflower, J. C., (1979). The use of progesterone concentrations in milk and plasma for pregnancy diagnosis in cattle. *Br. vet J.*, 135, 204 - 209.
 7. Laing, J. A., Gibbs, H. A. and Eastman, S. A. K. (1980). A herd test for pregnancy in cattle based on progesterone levels in milk. *Br. vet J.*, 136, 413 - 415.
 8. Lukaszewska, Janina and Hansel, W. (1980). Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fert.*, 59, 485-493.
 9. Newton, J. M., Shaw, R. C. and Booth, J. M. (1982). Pregnancy diagnosis in dairy herds in England and Wales. *Vet. rec.*, 110, 123 - 125.
 10. Norman, T. (1982). Laboratory methods for diagnosing pregnancy in cows. *Vet. Med./S.A.C.*, 3, 465 - 468.
 11. Pennington, J. A., Spahr, S. L. and Lodge, J. R. (1976)a. Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Br. vet J.*, 132, 487 - 496.
 12. Pennington, J. A., Spahr, S. L. and Lodge, J. R. (1976)b. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in milk. *J. Dairy Sci.*, 59, 8, 1528 - 1531.
 13. Pennington, J. A., Sultz, L. H. and Hoffmon, W. F. (1985). Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding. *J. Dairy Sci.*, 68, 10, 2740 - 2745.
 14. Pope, G. S., Majzlik, I., Ball, P. J. H. and Leaver, J. D. (1976). Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. vet J.*, 132, 497 - 506.
 15. Shelford, J. A., Grisenthwaite, T., Barrington, S., Peterson, R. G. and Fisher, L. J. (1979). Milk sampling methods for a progesterone assay for early pregnancy diagnosis. *Can J. Anim. Sci.*, 59, 77 - 82.
 16. Shemesh, M., Ayalon, N., Lavi, S., Mileguir, F., Shore, L. S. and Toby, D. (1983). A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy determination. *Br. vet. J.*, 139, 41 - 48.
 17. Stabenfeldt, G. H. (1974). Physiologic, pathologic and therapeutic roles of progestins in domestic animals. *J. A. V. M. A.*, 164, 439 - 541.
 18. Swenson, M. J. (1977). (Editor) «*Dukes' Physiology of Domestic Animals.*» 9th ed., Cornell Univ. Press, Ithaca.

