

## İNEKLERDE ERKEN GEBELİĞİN ENZİM İMMUNOASSAY KİTİ İLE PRATİK TANISI.

(Early pregnancy diagnosing in cows by rapid enzyme immunoassay kit)

Erol ALAÇAM(\*)    Tefik TEKELİ(\*)    Tayyip TÜR KARSLAN(\*\*)

### GİRİŞ

Gebe ve olmayan hayvanların immunolojik, metabolik ve hormonal fonksiyonları arasında birçok farklılıklar vardır. Bu farklılıklar uygun yöntemlerle ortaya konularak evcil hayvanlarda gebelik tanıları yapılabilmektedir.

Findlay (4), ineklerde erken gebelik tanısı amacıyla kullanılabilir immunolojik yöntemleri; fertilizasyon sonrasındaki 6-24 saat içinde erken gebelik faktörünün (EPF) arandığı Rozet-inhibisyon testi, embriyonun implantasyonundan önce uygulanan radyoimmunoassay ve enzim immunoassay testleri ve implantasyondan sonra maternal dokulardaki gebeliğe spesifik antijenlerin varlığını araştıran ya da yine steroid hormonların düzeylerini ölçen assay testleri olarak sıralamaktadır.

Kan ve süt progesteron hormonu düzeylerinin araştırılmasına dayanan assay testleri son yıllarda giderek daha yaygın bir kullanma sahası bulmaktadır (1, 5, 11). İneklerde progesteron hormonunun gerek seksüel siklus gerekse gebelik sırasında periferik kandaki belirgin düzeyleri bu hormonun ölçümlerinin gebelik tanısında etkili bir biçimde kullanılmasına neden olmuştur. Seksüel siklus sırasında progesteron hormonu yoğunluğu, ovulasyondan 2 gün önce ve 3 gün sonrasına kadar

---

(\*) S.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum w Reprodüksiyon Hastalıkları  
Anabilim Dalı, Konya

(\*\*) Eczacıbaşı İlaç Firması İstanbul

minimal düzeyde iken (<0.5 ng/ml), corpus luteumun formasyonuna bağlı olarak 5-7. günlerde ani bir yükselme gösterir, sonraki 8-10 günde hafif bir yükselme veya standart bir seyir 4-5 ng/ml olarak devam eder ve östrüsten 2-4 gün önce yeniden azalmaya başlar (13). İneklerde gebelik tanısı amacıyla tohumlamayı izleyen 19-24. günlerde kan veya progesteron değerleri ölçülerek değerlendirilmeler yapılmaktadır. Gebe ineklerde 21. günde kan progesteron değeri her zaman 2 ng/ml (6.4 nmol/litre) den fazla olup genellikle 5-8 ng/ml (19.1-25.5 nmol/litre) kadardır. Gebe olmayanlarda ise ortalama 0.5 ng/ml (1.6 nmol/litre) ya da daha az miktarlardadır (5, 6).

Progesteron hormonu ölçümleri ile yapılan gebelik tanısı çalışmalarında gebe olmayanlarda % 95-100, gebe olanlarda ise % 76-94.2 oranlarında bir doğrulukla tanı konulabildiği bildirilmektedir (1, 2, 3, 7, 11, 13).

Son yıllarda saha koşullarında uygulanabilecek ve ineklerden tohumlamayı izleyen 21. günde toplanan süt örneklerinde progesteron hormonu düzeylerini kantitatif veya kalitatif olarak belirleyecek enzim immunoassay test kitleri geliştirilmiştir. Bu testler progesteron hormonuna karşı immunolojik reaksiyon veren monoklonal antikörlerden yararlanmaktadır. Test sonucunda, reaksiyon kağıdı-çubuğunun uç kısmındaki renksiz substratın enzimatik transformasyonla renkli hale gelmesi veya renksiz kalmasına göre bulgular kalitatif olarak izlenebilmektedir. Benzer bazı testlerde ise fluometrik yöntemle ve eliza okuyucuları yardımıyla kantitatif tayinler de basit olarak yapılabilmektedir (8, 9).

Nebel ve ark. (10), pratik enzim immunoassay testini radyoimmunoassay ile kontrollü olarak 820 adet inek üzerinde denemişler ve birbirine paralel sonuçlar almışlardır.

Sunulan çalışmada ise, enzim immunoassay esasına göre çalışan pratik bir test yardımıyla süt progesteron hormonu yoğunlukları kalitatif olarak ölçülüp, gebe ve gebe olmayan ineklerin tanı şanslarının araştırılması ve kullanılan testin yetiştirici düzeyinde tanıtılarak kullanılabilme olanaklarının tartışılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Selçuk üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerinde, östrüste oldukları rektal muayene ile belirlenip, bu evrenin ikinci yarısında dondurulmuş sperma ile tohumlanan, çeşitli ırklara mensup ve yaşları 3-10 arasında değişen 20 adet inek üzerinde yapıldı.

Süt örnekleri tohumlamaları izleyen 21. günde, sabah sağımından önce toplandı. Birkaç çekim süt atıldıktan sonra, örnekler dört memenin karışımı olarak, özel plastik toplama kabına 20 ml miktarında alındı.

Süt örneklerinin değerlendirilmesinde Bovitest\* isimli, enzim immunoassay esasına göre çalışan ve kalitatif olarak progesteron hormonu düzeylerini gösteren bir test kullanıldı.

Test öncesinde örnekler ile test solusyonlarının aynı oda sıcaklığında bulunmasına özen gösterilerek örnekler bir saat içerisinde değerlendirildi. Testin uygulanmasında, tarifnamesinde belirtildiği üzere, aşağıdaki yol izlendi;

a) 1 numaralı test tüpüne işaretli noktaya kadar süt doldurulup homojen kırmızı renk oluşuncaya kadar çalkalandı.

b) 2 numaralı test tüpündeki kâğıt çubuk, uç kısmına dokunulmadan çıkarılarak, 1 nolu tüpe batırıldı ve beş dakika süreyle burada bırakıldı.

c) Belirtilen süre sonrasında tüpten çıkartılan kâğıt çubuk, akarsu altına tutularak, kırmızı renk kayboluncaya kadar 30 saniye süre ile yıkandı.

d) Silkelenerek fazla suyu akıtılan kâğıt çubuk 3 nolu test tüpüne daldırılarak 4 dakika süre ile burada tutuldu ve son olarak emici bir kâğıt arasında iyice kurutulup, sonuçlar uç kısmındaki reaksiyona bakılarak okundu.

e) Değerlendirmeler çubuğun uç kısmındaki, açık mavi renkli kontrol karesiyle kıyaslanarak yapıldı. Buna göre, en uçtaki test karesi kontrolle aynı soluk mavi rengi gösteriyorsa ineğin gebe olabileceği, buna karşılık uç kısım daha koyu bir mavi renkte ise hayvanın gebe olmadığına karar verildi.

Uygulanan test sonuçlarının doğruluğu tohumlamayı izleyen 45. günde yapılan rektal palpasyon ile kontrol edildi.

---

(\*) Bovitest, Clonatec, 60, rue de Wattignies, 75012, Paris France.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Yirmi adet inek üzerinde uygulanan test sonucunda, gebe olmayanlarda % 100, gebelerde ise % 83.33 oranında doğrulukla tanı konulduğu belirlendi. (Tablo 1).

Tablo 1- Çalışma Bulguları.

İnek Sayısı	Bovitest Bulguları		Palpasyon Bulguları		Testin Doğruluk Oranı	
	Gebe	G. Değil	Gebe	G. Değil	Gebe	G. Değil
20	12	8	10	8	% 83.33	% 100

İnek yetiştiriciliğinde amacın her yıl bir buzağı elde etmek olduğu göz önünde tutulursa, doğum ile yeni bir gebeliğin şekillenmesi arasındaki sürenin uzaması ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Tohumlama sonrasında, özellikle gebe kalmayan hayvanların mümkün olduğunca erken tanısına imkân sağlayan yöntemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bugün için immunolojik yöntemler erken tanı şansı veren uygulamalardır (1, 3, 4).

Radiyoimmunoassay yöntemi ile gebelik ve infertil ineklerin tanısı konusunda pek çok çalışma yapılmıştır. Bu yöntemin kapsamlı laboratuvar donanımına gerek göstermesi nedeniyle saha koşullarında uygulanmasının güçlüğüne yanısıra östrüsdeki hayvanları çok kısa bir sürede belirleyerek yeniden tohumlama şansını sağlayabilmesi için çok iyi ve yaygın bir organizasyon gereklidir. Oysa son yıllarda enzim immunoassay esasına göre çalışan bazı pratik tanı testleri geliştirilmiş ve saha koşullarında yaygın olarak kullanılma sahası bulmaya başlamıştır (8, 9, 10).

Sunulan çalışmada kullanılan Bovitest yardımı ile, özellikle gebe olmayan hayvanların kesin bir doğrulukla (% 100) belirlenmesi mümkün olmuştur. Bu sonuç benzer çalışmaların (1, 2, 7) bulgularına paralel bir görünümde. Gebe bulgusu veren iki ineğin ise 45. günde yapılan muayenelerinde gebe olmadıkları belirlenmiştir. Gebe tanısındaki yanlışlar birçok yazara göre (6, 10, 12), tohumlama zamanının hatalı olmasına, erken embriyonik ölümlere ya da testin uygulanması veya değerlendirilmesindeki hatalara bağlı olabilmektedir. Sunulan çalışmada tohumlamalar kontrollü olarak östrüsün ikinci yarısında ve ovulasyondan önce yapıldığından zamanlama konusundaki hatalar önemli ölçüde elemine edilmiştir. Hatalı sonuç veren iki olguda da tohumlamayı izleyen 21. günde östrüs belirtilerinin daha çok erken embriyonik ölümleri akla getirmektedir.

Bu çalışmada kullanılan Bovitest 5 ve 20 testlik olarak iki türlü hazırlanmış olup, ortalama 15 dakika içinde sonuç vermektedir. Çalışma sırasında uygulandığı gibi, ahır ve saha koşullarında da kullanılabilme imkânı bulunan bu test yetiştirici tarafından bile kolaylıkla uygulanabilecek basitliktedir. Testin kullanılabilme süresinin bir yıl olması ve devamlı + 4 °C derecede saklama zorunluluğu olumsuz bir yön olarak sayılabilir.

Sonuç olarak, tohumlamaları izleyen 21. günde uygulanacak Bovitest veya benzeri testler yardımıyla özellikle gebe olmayan ineklerin kısa sürede belirlenerek yeniden tohumlanmaları mümkün olabilmektedir.

## ÖZET

Bu çalışmada, enzim immunoassay esasına göre çalışan pratik bir test yardımı ile 20 adet inek üzerinde erken gebelik tanısı şansları araştırıldı.

Çalışma sonunda gebe olmayan hayvanlarda % 100, gebelerde ise % 83.33 oranında doğrulukla tanı konuldu.

Çalışma bulguları ile birlikte testin olumlu ve olumsuz yönleri tartışıldı.

## SUMMARY

Early pregnancy diagnosing in cows by rapid enzyme immunoassay kit.

An amplified enzyme immunoassay kit for progesterone analysis was used to diagnose pregnancy in 20 cows.

An accuracy of 100 and 83.33 percent was obtained in nonpregnant and pregnant cows respectively, after the analysis of progesterone in milk samples 21 days after the inseminations.

Advantages and cause of falings of the test were discussed.

**LİTERATÜR**

1. ALAÇAM, E., TEKELİ, T. ve SEZER, A.N. (1987): İneklerde erken gebelik tanısı amacıyla kan ve sütte progesteron hormonu düzeylerinin araştırılması, S. Ü. Vet. Fak, Derg., 3, 1, 13-24.
2. DING, H., GUO, Z.O., 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. FINDLAY, J.K. (1980): Immunological diagnosis of early pregnancy (As quoted), J.P. Hearn (Editor), "Immunological Aspects of Reproduction and Fertility Control". MTP Press Limited, 63-76.
5. HEAP, R.B. and HOLDSWORTH, R.J. (1981): Hormone assays in reproduction and fertility. Br Vet. J., 137, 561-571.
6. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (1984): "Laboratory Training Manual on Radioimmunoassay in Animal Reproduction". Technical Report Series, 233, Vienna.
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. MAHIN, L. et LASRI, Kh. (1988): Comparison de trois tests rapides de dosage de la progesterone dans le lait de vache, au point de vue de leur facilité de réalisation dans les conditions du terrain. Ann. Med. Vet., 132, 149-153.
9. MC PEE, I.M AND TIBERGHEN, M.P. (1987): Assesment of pregnancy in sheep by analysis of plasma progesterone using an amplified enzyme immuncassay technique. Vet. Rec., 121, 63-65.
10. NEBEL, R.L., WHITTIER, W.D., CASSEL, B.G. AND BRITT, J.H. (1987) : Comparison of on-farm assays and laboratory milk progesterone assays for identifying errors in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. J. Dairy Sci., 70, 7, 1471-1476.

11. NORMAN, T. (1982): Laboratory methods for diagnosing pregnancy in cows. *Vet. Med./SAC*, 3, 465-468.
12. RENNINGTON, J.A., SULTZ, L.H. and HOFFMAN, W.F. (1985): Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and 24 postbreeding. *J. Dairy Sci.*, 68, 10, 2740-2745.
13. SHEMESH, M., AYALON, N., LAVI S., MILEOUIR, F., SHORE, L.S. AND TOBY, D. (1983): A new approach to the use of progesterone levels for pregnancy de termination. *Br. vet. J.*, 139, 41-48.