



Sığırlarda Gebelikle İlişkili Glikoproteinlerin Tespitinde Kullanılan İki Test Kitinin Karşılaştırılması

Mehmet Salih KAYA¹, Servet BADEMKIRAN², Mehmet KÖSE², Eyyüp Hakan UÇAR³, Hasan MUTLU⁴, Mehmet Osman ATLI²

1. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.
2. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, TÜRKİYE.
3. Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE.
4. Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received
14.06.2016

Kabul Tarihi/Accepted
27.01.2017

Yayın Tarihi/Published
30.04.2017

Öz: Bu çalışmada; sığırlarda bir gebelik biyo-markırı olan gebelik ilişkili glikoproteinlerin kan plazmasında tespitine yönelik hazırlanan farklı iki ticari gebelik tanı kitinin (Sığır Gebelik Test Kiti ve Görsel Gebelik Test Kiti) erken gebelik tanısındaki etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlandı. Bu amaçla inek (n=32) ve düvelerden (n=37) tohumlama sonrası 27-30. günde kan örneği alındı. Kan örneklerinden toplanan plazma örnekleri, Sığır Gebelik Test Kiti ve Görsel Gebelik Test Kitleriyle üretici firma talimatlarına göre analiz edildi. İnek ve düvelerin gebelik durumları kan örneklerinin alınımından 10 gün sonra transrektal ultrasonografi ile tespit edildi. Gebeliklerin devamlılığı ise tohumlama sonrası 60. günde yapılan ikinci transrektal ultrasonografi ile teyit edildi. Sığır Gebelik Test Kiti ve Görsel Gebelik Test Kitlerinin sırasıyla; sensitivite %80 - %80, spesivite %91.2 - %85.3, pozitif prediktif değerleri %90.3 - %84.8, negatif prediktif değerleri %81.6 - %80.6, ve doğruluk oranları %85.5 - %82.6 oldu. Sonuç olarak; Sığır Gebelik Test Kiti ve Görsel Gebelik Test Kitinin inek ve düvelerde erken gebelik tanısında etkinliklerinin benzer olduğu ve rutin erken gebelik tespitinde güvenle kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Erken gebelik tanısı, Gebelik ilişkili glikoproteinler, Görsel gebelik test kiti, inek.

Comparison of Two Test Kits for the Detection of Pregnancy Associated Glycoproteins in Cattle

Abstract: In this study, it was aimed to compare the efficiency of two commercial pregnancy test kits (Bovine Pregnancy Test Kit and Visual Pregnancy Test Kit) based on detection of pregnancy associated glycoproteins, which are pregnancy biomarkers in cattle for early pregnancy diagnosis in the blood plasma of cattle. For this purpose blood samples from dairy cows (n=32) and heifers (n=37) were collected between 27 and 30 days after insemination. Plasma samples collected from blood samples were analyzed with Bovine Pregnancy Test Kit and Visual Pregnancy Test Kit according to manufacturer's protocols. Pregnancy status of cows and heifers was diagnosed ten days after blood samples collection by using transrectal ultrasonography. The pregnancy was confirmed by second transrectal ultrasonography at 60 days post insemination. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy rates of the Bovine Pregnancy Test Kit and Visual Pregnancy Test Kit were 80% - 80%, 91.2% - 85.3%, 90.3% - 84.8%, 81.6% - 80.6%, and 85.5% - 82.6%, respectively. As a result; it was concluded that Bovine Pregnancy Test Kit and Visual Pregnancy Test Kit had similar efficacies in early pregnancy diagnosis and could be used safely for routine early pregnancy diagnosis in cows and heifers.

Keywords: Cattle, Early pregnancy diagnosis, ELISA, Pregnancy-associated glycoproteins, Visual pregnancy test kit.

GİRİŞ

Sütçü inek işletmelerinde ekonomik karlılık sürünün süt verimi ve üreme performansı ile ilişkilidir. Ancak yüksek süt verimliliğinin sürdürülebilmesi de yenilenen laktasyonlara bağlı olduğundan ekonomik karlılık temelde sürü reproduktif verimliliğinin sürdürülmesine bağlıdır (1).

Reproduktif verimliliğin ölçütlerinin optimal sınırlar içerisinde sürdürülebilmesi için reproduktif sürü yönetiminde tohumlama sonrası mümkün olan en kısa sürede gebe olanların tespitiyle birlikte gebe olmayanların da tespit edilerek yeniden tohumlamaları gerekmektedir (2). Bu nedenle sütçü inek işletmelerinde gebeliğin erken tanısı çok önemlidir (3).

Sığırlarda erken gebelik tanısı amacıyla direkt (klinik) ve indirekt (laboratuvar) olmak üzere birçok yöntem geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemlerin pratikte yaygın olarak kullanılabilmesi; kolay uygulanabilir, tekrar edilebilir, düşük maliyetli, güvenilir ve non-invaziv özellikte olmalarıyla ilişkili olduğundan, bu yöntemlerden sadece birkaçı günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (4). Direkt yöntemler içerisinde rektal palpasyon ve transrektal ultrasonografi en çok kullanılan yöntemlerdir. Rektal palpasyon basit, hızlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntemdir. Ancak, bu yöntemle güvenilir gebelik tanısı tohumlama sonrası en erken 35. günden sonra yapılabilmektedir ve gebeliğin erken döneminde embriyonun canlılığına ilişkin bulgu/lar tespit edilememektedir (5). Ayrıca bu yöntemde fluktuasyon, konseptusun tespiti ve yavru zarlarının kaydırılması amacıyla yapılan manipülasyonlar nedeniyle gebelik sonlanabilmektedir (6). Transrektal ultrasonografi ise rektal palpasyona göre gebelik teşhisinin daha erken günlerde yapılabildiği, kalp atımının tespitiyle embriyonun canlılığının izlenebildiği ve iatrojenik gebelik kaybı riskinin çok daha az olduğu bir yöntemdir (7). Ancak bu yöntemin de; gebeliğin primer bulguları olan embriyo ve kalp atımlarının tohumlama sonrası 24. günden sonra tespit edilebiliyor olması nedeniyle tohumlama

sonrası ilk östrüsün kaçırılması, maliyeti yüksek ultrason cihazı gerektirmesi ve gün ışığına karşı muayene kolaylığı için ortamın düzenlenmesinin gerekliliği gibi önemli dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca, saha şartlarında yaygın olarak kullanılan bu iki klinik yöntemde muayene sırasında klinisyenin yaralanma riski de bulunmaktadır (2,4,6).

Sığırlarda gebelik tanısı amacıyla klinik yöntemlere alternatif olarak çeşitli laboratuvar testleri geliştirilmiştir. Bu testlerde gebelik tanısı; kan, süt vb. çeşitli maternal vücut sıvılarında gebeliğe ilişkin çeşitli maddelerin kalitatif veya kantitatif tespitine dayalı olarak indirekt yolla yapılmaktadır (2). İneklerde gebelik tanısında en çok kullanılan laboratuvar testlerinden biri, tohumlama sonrası beklenen ilk periyodik östrüs günlerinde kanda veya sütte progesteron konsantrasyonunun belirlenmesidir (8). Ovaryumlardaki korpus luteumun aktivitesinin göstergesi olan periferik progesteron konsantrasyonunun; gebeliğe ilişkin olmayan bazı durumlarda da (korpus luteumun kalıcı hale geçmesi, östrüs siklusunun normalden daha uzun veya kısa sürmesi, hatalı tohumlama, embriyonik ölüm vb.) yüksek olması testin güvenilirliğini azaltmaktadır (9). Ayrıca ardışık ölçümlere ihtiyaç duyulması testin kullanımını sınırlandırmaktadır (2).

Memelilerde gebelik süresince anne ve yavru arasındaki geçici bağlantıyı oluşturan plasenta ve yavrudan, türlere özgü sentezlenen bazı bileşikler (kısıraklarda eCG, kadınlarda hCG vb.) periferik kan dolaşımına geçmektedir (10). Ruminantlarda da implantasyonun başlangıcıyla villi koryalislerin dış yüzeyindeki tek/çift çekirdekli dev (mono/bi nükleer giant) hücrelerin uterus epitelyumuna göç etmesiyle oluşan hibrid hücrelerden salgılanan gebelik ilişkili proteinlerden (PAGs) bazıları maternal kan dolaşımına geçer (5). Bu moleküllerin plazma konsantrasyonu plasental fonksiyonun göstergesi olduğundan (10) kanda ve sütte bu moleküllerin tespitine dayalı gebelik tanısı ve gebeliğin devamlılığının izlenmesi mümkün olmaktadır (11-13).

PAGs'in tespiti önceleri RIA testi ile yapılmakta iken (14), daha sonraları benzer etkinlikte olan ELISA testleri geliştirilmiştir (15). Bu testlerde örneklemenin kolay yapılması, non-invaziv olması ve yetiştiriciler tarafından da kolaylıkla yapılabilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır (4).

Bu çalışmada; süt sığırlarının kan plazmasındaki PAGs moleküllerinin tespitine dayalı Sığır Gebelik Test Kiti (SGTK) ile Görsel Gebelik Test Kiti (GGTK)'nin erken gebelik tespitindeki etkinliklerinin karşılaştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Çalışma, klinik olarak sağlıklı, 69 baş Holştayn ırkı sığır (32 baş inek, 37 baş düve) üzerinde gerçekleştirildi. Sığırlar yarı açık ahırlarda serbest dolaşımli olarak barındırıldı ve kesif yem, mısır slajı, kuru yonca otu, buğday samanı ve şeker pancarı posasından oluşturulan rasyon ile beslendi. Suyu serbest olarak içmeleri sağlandı. Çalışmada hayvanlar üzerine yapılan tüm uygulamalar Dicle Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan alınan etik onay çerçevesinde etik ilkelere uyularak gerçekleştirilmiştir (Karar no: #2012-51).

Kan Örneklerinin Toplanması

SGTK ve GGTK ile gebelik tanısı için tohumlama sonrası 27-30. gündeki her bir ineğin coccygeal damarlarından 10 ml kan örneği K3-EDTA içeren tüplere (BD Vacutainer) alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra en geç 2 saat içerisinde 4000 devir/dakika hızda 10 d santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örnekleri, 1.5 mL'lik epondorf tüplerde dondurularak buz içerisinde Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Araştırma Laboratuvarına getirildi ve analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı.

Gebe ve Gebe Olmayan Hayvanların Tespiti

Çalışmada gebe ve gebe olmayan sığırların tanısı ve gebeliklerin devamlılığı iki transrektal ultrasonografi (5/7.5 MHz prob, Scanner 480 Vet, Esaote/Pie 22 Medical, Maastricht, Hollanda) ile

tespit edildi. Birinci ultrasonografik muayene; kan örneklerinin alınmasından 10 gün sonra yapıldı. Bu muayenede yavru suları ve/veya embriyo görülenler gebe olarak değerlendirildi. İkinci ultrasonografik muayene ise tohumlama sonrası 60. günde yapıldı ve birinci muayenede gebe olanlarda gebeliklerin devamlılığı teyit edildi. Yapılan ikinci transrektal ultrasonografik muayene sonucu 69 sığırdan 35'inin gebe, 34'ünün ise gebe olmadığı belirlendi. Birinci ultrasonografik muayenede gebe olmadığı belirlenen sığırlara ikinci ultrasonografik muayene yapıncaya kadar tohumlama yapılmadı.

SGTK ve GGTK Testlerinin Yapılması

Plazma örneklerinden gebelik tespiti SGTK (IDEXX Bovine Pregnancy Test Kit, Westbrook, Maine, USA) ve GGTK (IDEXX Visual Pregnancy Test Kit, Westbrook, Maine, USA) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Analizler, hayvanların gebelik durumları hakkında bilgi sahibi olmayan laboratuvar elemanları tarafından gerçekleştirildi.

SGTK ile yapılan analizde, reaksiyonun durdurulmasından sonra her bir kuyucuğun 450 nm dalga boyundaki optik dansiteleri (OD) ELISA okuyucusunda (Stat Fax 2100 Microplate Reader Awareness Technologies, Florida, USA) okundu. Sonuçlar hesaplanırken her bir örneğin OD'sinden negatif kontrol kuyucuklarının OD'leri çıkarılarak Örnek-Negatif (Ö-N) olarak ifade edildi. Plazma örneklerinin sonuçları ≥ 0.3 olanlar pozitif (gebe) olarak değerlendirilirken, 0.3'ün altında olanlar negatif (gebe değil) olarak değerlendirildi.

GGTK ile yapılan analiz sonuçları ise mikroyeylet kuyucuklarındaki renk değişimine göre tespit edildi. Buna göre mavi rengin tonlarında renk değişimi olduğu tespit edilen kuyucuklardaki örnekler pozitif (gebe), renk değişimi tespit edilemeyen kuyucuklardaki örnekler ise negatif (gebe değil) olarak değerlendirildi.

Birinci transrektal ultrasonografi sonuçları esas alınarak SGTK ve GGTK için; gerçek pozitif (a; ultrason

sonucu gebe, test sonucu gebe), hatalı pozitif (b; ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe), hatalı negatif (c; ultrason sonucu gebe, test sonucu gebe değil) ve gerçek negatif (d; ultrason sonucu gebe değil, test sonucu gebe değil) sonuçlar belirlendi. Bu verilerden yararlanılarak aşağıda verilen formülasyonlarla her iki kitin sensitivite ($a/(a+c) \times 100$), spesivite ($d/(b+d) \times 100$), pozitif prediktif değer ($a/(a+b) \times 100$), negatif prediktif değer ($d/(c+d) \times 100$) ve doğruluk oranları ($(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$) hesaplanarak (16) gebelik tanısındaki etkinlikleri karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde ki-kare testi kullanıldı ve $P < 0.05$ önemli kabul edildi.

BULGULAR

SGTK Analiz Sonuçları: SGK ile yapılan analizler sonucunda gebelere ait plazmalardan (n=35) 28'inde gerçek pozitif, 7'sinde hatalı negatif tanısı yapılırken, gebe olmayanlara ait plazma örneklerinden (n=34) ise 31'inde gerçek negatif, 3'ünde hatalı pozitif gebelik tanısı yapıldı. Hatalı negatif tanısı yapılan 7 örnekten 1'inin inek, diğer 6'sının düve, hatalı pozitif tanısı yapılan 3 örnekten 1'inin inek, diğer 2'sinin düvelere ait olduğu işletme kayıtlarından tespit edildi. Bu bulgulara göre SGK'in spesivitesi %91.2, sensitivitesi %80, pozitif prediktif değeri %90.3, negatif prediktif değeri %81.6 ve doğruluk oranı %85.5 olarak belirlendi (Tablo 1).

GGTK Analiz Sonuçları: GGK ile yapılan analizler sonucunda gebelere ait plazmalardan (n=35) 28'inde gerçek pozitif, 7'sinde ise hatalı negatif tanısı yapılırken, gebe olmayanlara ait plazma örneklerinden (n=34) ise 29'unda gerçek negatif, 5'inde hatalı pozitif gebelik tanısı yapıldı. Hatalı negatif tanısı yapılan 7 örnekten 1'inin inek, diğer 6'sının düve, hatalı pozitif tanısı yapılan 5 örnekten 3'ünün inek, diğer 2'sinin düve olduğu işletme kayıtlarından tespit edildi. Bu bulgulara göre GGK'nin spesivitesi %85.3, sensitivitesi %80, pozitif

prediktif değeri %84.8, negatif prediktif değeri %80.6, doğruluk oranı %82.6 olarak belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Sığırlarda erken gebelik teşhisi için kullanılan Sığır Gebelik Test Kiti (SGTK) ve Görsel Gebelik Test Kiti (GGTK) testlerinin sensitivitesi, spesivitesi, prediktif değerleri ve doğruluk oranları.

Table 1. Sensitivity, specificity, predictive values, and accuracy rates of Bovine Pregnancy Test Kit (BPTK) and Visual Pregnancy Test Kit (VPTK) tests used for early pregnancy diagnosis in cows.

	SGTK	GGTK
Gerçek pozitif tanı (a)	28	28
Hatalı pozitif tanı (b)	3	5
Hatalı negatif tanı (c)	7	7
Gerçek negatif tanı (d)	31	29
Sensitivite (%)	80.0	80.0
Spesivite (%)	91.2	85.3
Pozitif prediktif değer (%)	90.3	84.8
Negatif prediktif değer (%)	81.6	80.6
Doğruluk oranı (%)	85.5	82.6

SGTK ve GGK'nin gebe olmayan hayvanların tespitindeki etkinliğini gösteren spesivite ve negatif prediktif değerleri arasındaki farklar, istatistiksel olarak önemli bulunmadı ($P > 0.05$).

SGTK testinde hatalı pozitif (1 inek, 2 düve) veya hatalı negatif (1 inek, 6 düve) olarak tespit edilen inek ve düvelerin test sonuçları GGK ile elde edilen test sonuçlarıyla tamamen örtüşüyordu. GGK testinde, SGK testinden farklı olarak 2 inekte daha hatalı

pozitif sonuç elde edildi. GGTK ile hatalı pozitif veya hatalı negatif olarak tespit edilen inek ve düvelerin

bireysel plazma PAG OD değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Görsel Gebelik Test Kiti (GGTK) ile hatalı pozitif veya hatalı negatif olarak tespit edilen inek ve düvelerin bireysel plazma PAG OD değerleri.

Table 2. Individual plasma PAG OD values of cows and heifers detected as false positive or false negative with Visual Pregnancy Test Kit (VPTK).

	İnek/düve	Plazma PAG OD değeri		İnek/düve	Plazma PAG OD değeri
GGTK testinde hatalı negatif tanı	Düve	0.031	GGTK testinde hatalı pozitif tanı	Düve	0.632
	Düve	0.030		Düve	1.472
	Düve	0.033		İnek	2.256
	Düve	0.024		İnek*	0.266
	Düve	0.024			
	Düve	0.035			
	İnek	0.044		İnek*	0.298

* Sığır Gebelik Test Kiti testinde gerçek negatif tanısı yapıldı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt sığırcılığında modern işletme sayısının sürekli artması ve bu işletmelerde daha fazla kar elde etme isteği; sürü yönetiminde pratik erken tanı sistemlerinin (mastitis, östrüs tespiti vb) kullanılmasını zorunlu hale getirmiş ve hızla yaygınlaşmasına neden olmuştur (2,12). Sürü yönetiminde verimliliğin artması, iş gücü ve zaman tasarrufu için en fazla ihtiyaç duyulan uygulamalardan biri kolay, uygulanabilir ve güvenilir erken gebelik tespittir. Bu alanda son yıllarda yaygın olarak kullanılan tanı yöntemlerinden biri PAGs'dir. Periferal kanda PAGs tespitiyle gebelik tanısı yapılabileceği yaklaşık 20 yıldır bilinmektedir (2). İlk zamanlarda gebelik tanısı için PAGs tespitinde radyoimmün testler kullanılmış ancak kullanılan radyoaktif maddelerin insan ve çevre sağlığına verdiği zararlar göz önüne alınarak daha güvenilir olan ELISA testleri geliştirilmiştir. Günümüzde teknolojik gelişmelere bağlı olarak analiz yöntemleri alanında sağlanan iyileştirmelerle kısa sürede sonuç alınabilen, laboratuvar cihazı gerektirmeyen ve saha şartlarında kolaylıkla uygulanabilen

plazma/serumdaki PAGs tespitine dayalı görsel gebelik test kitleri geliştirilmiştir (15,17).

Sunulan bu çalışmada, saha şartlarında ortalama 2 saat gibi kısa bir sürede yaklaşık 90 örneği analiz edilebilen, laboratuvar cihazlarına ihtiyaç duymadan, renk değişikliği esasına göre sonuç veren GGTK ile, analizlerin yapılabilmesi ve sonuçlarının değerlendirilebilmesi için laboratuvar cihazları ve altyapısı gerektiren SGTK'nin erken gebelik tanısındaki etkinlikleri karşılaştırıldı. Yapılan analizler sonucunda her iki test kitinin sensitivite, spesivite, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer ve doğruluk oranları birbirine çok yakın olduğu tespit edildi.

Daha önce yapılan çalışmalarda kanda PAGs'in tespitine dayalı gebelik tanısında çok yüksek doğruluk oranlarının (>%90) elde edildiği bildirilmiştir (15,18-21). Çalışmamızda elde edilen doğruluk oranları (SGTK %85.5 ve GGTK %82.6) ile bu çalışmalar arasında %10-15 oranında bir farklılık olduğu görülmektedir. Bununla birlikte bizim çalışmamızdaki doğruluk oranlarına çok yakın sonuçların elde edildiği çalışmalarda bulunmaktadır (12,22-24). Bu kısmi düşüklüğün; çalışmamızda kullanılan plazma örneklerinin her iki kitin protokolünde belirtilen

örnekleme gününe (tohumlama sonrası 28. günden itibaren) en yakın günlerde toplanmasından (27-30. günlerde) ve çalışmalar arasındaki örnekleme günlerinde olan farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu düşüncenin, yapılacak çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Daha önceki çalışmalarda periferik kanda erken gebelik döneminde PAGs'in gebelik tanısı için yeterli konsantrasyona 28. günde ulaştığı (15) ve gebelik yaşıyla paralel olarak yükseldiği (12,24,25) bildirilmiştir.

Bu çalışmada SGTK ile 3 (1 inek, 2 düve), GGTK ile 5 (3 inek, 2 düve) hayvanda hatalı pozitif gebelik tanısı elde edilmiştir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da hatalı pozitif tanılar yapıldığı ve bu tanıların örnekleme öncesinde oluşan gebelik kayıpları, kross reaksiyonlar ve önceki gebelikten kaynaklı PAGs'lerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (18,19,21,24). Hatalı pozitif gebelik tanısının en önemli dezavantajı bu tanının yapıldığı inek ve düvelerde izleyen tohumlamanın gecikmesine neden olmasıdır. Bu nedenle testlerde beklenen en önemli özelliklerden biri hatalı pozitif tanı oranının düşük olmasıdır. Bu tür tanı kitlerinde hatalı pozitif oranlarını düşürmek için, pozitif gebelik için kabul edilen değerlere çok yakın sonuçların elde edildiği veya göreceli testlerde şüpheli olarak değerlendirilen hayvanlarda 7-10 gün sonra testin tekrarlanması gerektiği bildirilmiştir (12,26). Bu imkanın olmadığı durumlarda ise embriyonal dönemin sonunda veya fetal dönemin başlangıcında gebeliğin devamlılığı teyit edilmelidir (13,27). Bu çalışmada; işletme kayıtlarına göre düvelerin ilk defa tohumlanması, ineklerin postpartum en az 90. günde olmaları, ikinci gebelik muayenesine kadar tohumlama yapılmaması ve ikinci transrektal ultrasonografi ile gebelik teyidinin kan örneklemesinden 30 gün sonra yapılması; hatalı pozitif sonuçların embriyonik ölümler veya PAG benzeri proteinlerden kaynaklanan kross reaksiyonlardan kaynaklandığına işaret etmektedir. İneklerde gebelik kayıplarının çoğunlukla erken embriyonal dönemde olduğu çok iyi bilinmekle birlikte geç embriyonal ve erken fetal

dönemde oluşan gebelik kayıplarının da %17'ye kadar yükselebileceği (28) ve bu kayıplarında daha çok geç embriyonal dönemin başlangıcında olduğu bildirilmiştir (29). Bu çalışmada da gebelik kayıpları, SGTK ve GGTK ile yapılan hatalı pozitif tanılara göre hesaplandığında, literatürlerde ifade edilenlere benzer oranlarda (SGTK testinde %9.7 (3/31), GGTK testinde ise %15.2 (5/33)) tespit edildi.

Çalışmamızda hem SGTK hem de GGTK testlerinde aynı inek (n=1) ve düvelerde (n=6) hatalı negatif gebelik tanısı yapıldı. Bu sonuca dayanarak hem SGTK hem de GGTK testlerinin erken gebelik döneminde kan plazmasındaki PAG konsantrasyonu tespitindeki hassasiyetlerinin aynı düzeyde olduğu ifade edilebilir. Ancak günümüzdeki modern yetiştiricilikte ekonomik kayıpların esas nedeni fertilité kaynaklıdır ve çok büyük değerlere ulaşan bu kayıpların azaltılmasına odaklanılmıştır. Bu amaçla düvelerde ilkine buzağılama yaşının, ineklerde ise buzağılama aralığının ideal ölçütlerde olması amacıyla gebelik tespiti sonrası gebe olmayanların en kısa sürede tohumlanabilmesi için re-senkronizasyon protokolleri sıklıkla uygulanmaktadır. Ancak bu protokollerin çoğunluğunda korpus luteumun regresyonuna neden olan luteolitik ajanlar kullanılmakta ve tespit edilemeyen erken gebelikler sonlandırılmaktadır. Bu nedenle özellikle erken gebelik tanısında kullanılacak kitlerin negatif prediktif değerlerinin mümkün olduğunca yüksek olması arzu edilmektedir. Bu çalışmada hatalı negatif gebelik tanıları, Perenyi'nin (30) bildirdiği gibi, PAGs konsantrasyonundaki yükselişte hayvanlar arasındaki varyasyondan kaynaklı bireysel farklılıkların sonucu olabilir.

SGTK ve GGTK' nin gebe olmayan hayvanların tespitindeki etkinliğini gösteren spesivite ve negatif prediktif değerleri arasındaki farklar, istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Çalışmamızda bu parametrelere ilişkin iki test sonucu arasındaki farklılık; SGTK' iyle gerçek negatif tanı yapılan iki inekte, GGTK' yle hatalı pozitif tanı yapılmasından kaynaklandı. Bu iki ineğin SGTK testinde değerleri (0.266 ve 0.298), pozitif tanı için eşik değer olarak

kabul edilen 0.3 değerine çok yakın oldu. Bu nedenle bu ineklerde GGTK testindeki hatalı pozitif tanının, ineklerin plazmalarındaki PAGs moleküllerinin konsantrasyonunun GGTK testinde gözle tespit edilecek düzeyde renk değişikliği oluşturacak seviyede bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Günümüzde tohumlama sonrası ilk östrüsün kaçırılmadan sonra erken gebelik tanısı amacıyla kullanılacak laboratuvar testlerinden biri kan plazması veya serumunda progesteron düzeyinin tespiti. Ancak bu test erken gebelik tanısında PAGs moleküllerinin tespitine dayalı ELISA testlerinin alternatifi olmaktan oldukça uzaktır. PAGs molekülleri uterusu canlı bir embriyonun varlığının göstergesi olması ve tespiti için örneklemenin tohumlama sonrası 27. günden itibaren istenilen bir günde yapılabilmesi progesteron testlerine göre önemli bir üstünlük oluşturmaktadır (2). Kan örneklemesinin tohumlama sonrası sınırlı günlerde yapılabilmesi (tohumlama sonrası 19–23. günler arasında), korpus luteum fonksiyonunun göstergesi olması, gebeliğe spesifik olmaması ve bazı patolojik durumlarda (luteal evrenin uzaması, luteal kist vb) hatalı pozitif tanı yapılması kan progesteron düzeyine dayalı gebelik tanısının kullanılabilirliği ve güvenilirliğini azalmaktadır (9).

Sonuç olarak; SGK ve GGTK ticari kitlerinin inek ve düvelerde gebeliğin 27–30. günleri arasında gebelik tanısında benzer düzeyde etkinliğe sahip olduğu kanısına varıldı. Bu sonuçlara göre GGTK testinin saha şartlarında kolaylıkla oda ısısında herhangi bir laboratuvar cihazına ve deneyimli laboratuvar elemanına ihtiyaç duymadan yetiştiriciler tarafından da yapılabilir olması nedeniyle SGK testine göre önemli bir üstünlük oluşturduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Inal S., Cam M., 2015. Culling and Replacement in Dairy Cattle Herds. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, 1, 106-112.
2. Ott TL., Dechow C., O'Connor ML., 2014. Advances in reproductive management: pregnancy diagnosis in ruminants. *Anim Reprod*, 11, 207-216.
3. Whitlock BK., Maxwell HS., 2008. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. *Theriogenology*, 70, 550-559.
4. Balhara AK., Gupta M., Singh S., Mohanty AK., Singh I., 2013. Early pregnancy diagnosis in bovines: current status and future directions. *Sci World J*, 1-10.
5. Peters AT., 2013. Bovine placenta: A review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. *Theriogenology*, 80, 693-705.
6. Romano JE., Thompson JA., Kraemer DC., Westhusin ME., Forrest DW., Tomaszewski MA., 2007. Early pregnancy diagnosis by palpation per rectum: Influence on embryo/fetal viability in dairy cattle. *Theriogenology*, 67, 486-493.
7. Romano JE., Thompson JA., Forrest DW., Westhusin ME., Tomaszewski MA., Kraemer DC., 2006. Early pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography in dairy cattle. *Theriogenology*, 66, 1034-1041.
8. Nak D., Nak Y., Başaran DA., Keskin A., 2005. İneklerde transrektal ultrasonografi, serum progesteron analizi ve vaginal smear muayenesi ile erken gebelik tanısı. *Vet Bil Derg*, 21, 39-44.
9. Kose M., Tekeli T., 2014. Effect of ovarian functions on estrus synchronization and pregnancy rate in Brown Swiss heifers and non-lactating cows. *Eurasian J Vet Sci*, 30, 53-58.
10. Patel OV., Sulon J., Beckers JF., Takahashi T., Hirako M., Sasaki N., Domeki I., 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. *Eur J Endocrinol*, 137, 423-428.
11. Lopez-Gatius F., Hunter RHF., Garbayo JM., Santolaria P., Yaniz J., Serrano B., Ayad A., de Sousa NM., Beckers JF., 2007. Plasma concentrations of pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) in high producing dairy

- cows suffering early fetal loss during the warm season. *Theriogenology*, 67, 1324-1330.
12. Friedrich M., Holtz W., 2010. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. *Reprod Domest Anim*, 45, 142-146.
 13. LeBlanc SJ., 2013. Short communication: Field evaluation of a pregnancy confirmation test using milk samples in dairy cows. *J Dairy Sci*, 96, 2345-2348.
 14. Zoli AP., Guilbault LA., Delahaut P., Ortiz WB., Beckers JF., 1992. Radioimmunoassay of a pregnancy associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. *Biol Reprod*, 46, 83-92.
 15. Green JA., Parks TE., Avale MP., Telugu BP., McLain AL., Peterson AJ., McMillan M., Mathialagan N., Hook RR., Xie S., Roberts RM., 2005. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology*, 63, 1481-1503.
 16. Kastelic JP., 2006. Critical evaluation of scientific articles and other sources of information: an introduction to evidence-based veterinary medicine. *Theriogenology*, 66, 534-542.
 17. Karen A., De Sousa NM., Beckers JF., Bajcsy AC., Tibold J., Mádle I., Szencia O., 2015. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*, 159, 31-37.
 18. Silva E., Sterry RA., Kolb D., Mathialagan N., McGrath M.F., Ballam JM., Fricke PM., 2007. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci*, 90, 4612-4622.
 19. Piechotta M., Bollwein J., Friedrich M., Heilkenbrinker T., Passavant C., Branen J., Sasser G., Hoedemaker M., Bollwein H., 2011. Comparison of commercial ELISA blood tests for early pregnancy detection in dairy cows. *J Reprod Dev*, 57, 72-75.
 20. Ricci A., Carvalho PD., Amundson MC., Fourdraine RH., Vincenti L., Fricke PM., 2015. Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *J Dairy Sci*, 98, 2502-2514.
 21. Kaya MS., Kose M., Bozkaya F., Mutlu H., Ucar EH., Atli MO., 2016. Early pregnancy diagnosis by using a commercial ELISA test based on pregnancy associated glycoproteins in heifers and lactating cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 40, 694-699.
 22. Karen A., Darwish S., Ramoun A., Tawfeek K., Van Hanh N., De Sousa M., Sulon J., Szenci O., Beckers JF., 2007. Accuracy of ultrasonography and pregnancy-associated glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes. *Theriogenology*, 68, 1150-1155.
 23. Fernandez IG., Moncebaez J., Elizondo C., Hernandez H., Ulloa-Arvizu R., Rojas S., 2013. Negative prediction value of pregnancy-associated glycoprotein contributes to reduce the days during which nonpregnant holstein cows are subjected to diverse strategies of hormonal synchronization. *Int J Anim Vet Adv*, 5, 160-164.
 24. Szenci O., Beckers JF., Humblot P., Sulon J., Sasser G., Taverne MA., Varga J., Baltusen R., Schekk G., 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B, and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*, 50, 77-88.
 25. Shahin M., Friedrich M., Gaulty M., Holtz W., 2014. Pregnancy-associated glycoprotein (pag) profile of holstein-friesian cows as compared to dual-purpose and beef cows. *Reprod Domest Anim*, 49, 618-620.
 26. Green JC., Volkmann DH., Poock SE., McGrath MF., Ehrhardt M., Moseley AE., Lucy MC., 2009. Technical note: A rapid enzyme-linked

- immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. *J Dairy Sci*, 92, 3819-3824.
27. Dinc DA., 2015. Dairy Herd Health Concept and Role of the Veterinarian. *J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*, 1, 1-16.
28. Humblot P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 56, 1417-1433.
29. Silke V., Diskin MG., Kenny DA., Boland MP., Dillon P., Mee JF., Sreenan JM., 2001. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 15, 1-12.
30. Perenyi Z., Szenci O., Sulon J., Drion PV., Beckers JF., 2002. Comparison of the ability of three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. *Reprod Domest Anim*, 37, 100-104.