

**İNEKLERDE ERKEN GEBELİK FAKTÖRÜ'NÜN (EGF) TESPİTİYLE GEBELİĞİN TEŞHİSİ\***

Atilla YILDIZ Hüseyin DEVECİ

Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Elazığ-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 29.07.1999

**Diagnosis of Pregnancy by Determining Early Pregnancy Factor (EPF) in Cows****SUMMARY**

The aim of this study was to investigate a possible relationship between the serum activity of early pregnancy factor (EPF) on the days 7 and 21 and the blood serum levels of progesterone on the day 21 following insemination and on the day 45 rectal examination findings in cows. Possible use of EPF parameter in early diagnosis of pregnancy was also sought.

Sixty Brown Swiss cows were used in this study. Blood samples were collected on the days 7 and 21 for EPF activity and on the day 21 for progesterone analysis. Serum EPF and progesterone levels were determined by Rosette Inhibition Test (RIT) and radioimmunoassay, respectively. In the RIT analysis, findings above 4 were accepted as pregnant and those equal or below 4 as non-pregnant. The cows with serum progesterone levels above 2.30 ng/ml were evaluated as pregnant.

RIT and serum progesterone levels were compared with the rectal examination findings on the day 45 following insemination.

Based on the rectal examination findings, the accuracy EPF of on the days 7 and 21 and progesterone results on the day 21 were 54.7%, 70.7% and 67.4%, respectively, in the pregnant cows. All three parameters proved to be 100% accurate in the non-pregnant animals. Early embryonic deaths affected the diagnosis of early pregnancy results significantly based on the serum EPF and progesterone parameters. Although fertilisation rate of the cows was 88.3%, embryonic deaths occurred in 45.3%.

In conclusion, these findings suggested that the determination of EPF activity may be used for diagnosis of early pregnancy and for monitoring continuation of pregnancy. RIT and progesterone analysis methods may be more reliably used for determination of the non-pregnant cows than the pregnant ones.

*Key words: Cow, early pregnancy factor, pregnancy diagnosis.*

**ÖZET**

Bu çalışmada, ineklerde tohumlama sonrası kan serumunda, 7. ve 21. gündeki Erken Gebelik Faktörü (EGF) ile 21. gündeki progesteron ve 45. gündeki rektal muayene bulguları değerlendirilerek, elde edilecek gebelik oranları arasındaki ilişkinin ve erken gebelik teşhisinde, EGF bulgularının kullanılıp kullanılmayacağı araştırılması amaçlandı.

Altmış İsviçre Esmeri inek materyal olarak kullanıldı. Tohumlamayı izleyen 7. ve 21. günlerde EGF aktivitesi, 21. günde progesteron ölçümü için kan örnekleri alındı ve kan serumu EGF aktivitesi Rozet İnhibisyon Testi (RIT) ile, kan serumu progesteron düzeyi ise radioimmunoassay (RIA) metoduyla belirlendi. RIT'nde, Rozet İnhibisyon Titre'si 4'ün üzerinde olanlar gebe, 4 ve 4'ün altında olanlar ise gebe değil olarak değerlendirildi. Progesteron düzeyleri 2.30 ng/ml'den yüksek olanlar gebe, düşük olanlar gebe değil şeklinde kabul edildi.

\*Bu araştırma F.Ü.Araştırma Fonu (FÜNAP-215) tarafından desteklenmiş ve aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

RIT ve progesteron sonuçları, tohumlamayı izleyen 45. gündeki rektal muayene bulgularıyla karşılaştırıldı

Rektal muayene sonuçları esas alınarak yapılan değerlendirmede, 7. ve 21. gün EGF, 21 gün progesteron ölçümlerine göre elde edilen sonuçların doğruluk oranları sırasıyla: gebelerde %54.7, %70.7 ve %67.4, gebe olmayanlarda ise her üç erken gebelik teşhis metodunda da %100 olarak bulundu. Erken embriyonik ölümler, EGF ve progesteron ölçümleri sonuçlarına dayanan, erken gebelik teşhis sonuçlarını önemli ölçüde etkiledi. Fertilizasyon oranı %88.3 (53) iken, bunun %45.3'ünde (24) embriyonik ölüm şekillendiği görüldü.

Sonuç olarak, EGF aktivitesinin ölçülmesinin, erken gebelik teşhisi ve gebeliğin devam edip etmediğinin kontrolü amacıyla kullanılabilmesi, RIT ve progesteron ölçümlerine dayanan, erken gebelik teşhisi metodları, gebe olanlardan ziyade, gebe olmayanları ortaya koymada daha güvenilir olduğu kanaatine varıldı.

*Anahtar kelimeler: İnek, erken gebelik faktörü, gebelik teşhisi*

## GİRİŞ

Evcil hayvanlarda erken gebelik teşhisi, yetiştirici açısından pratik önemi yanısıra, fertilité kontrol programları için de bilimsel yönden önemlidir. İnfertilitenin bir sonucu olan zaman kaybının önlenmesinde, hayvanların uygun tedavi ya da gebe olmayan hayvanların erken ayrımı ile yetiştiriciye birkaç tercih hakkı sağladığından, çiftleşme ya da tohumlamadan kısa bir süre sonra, erken gebelik teşhisine ihtiyaç duyulur. Ayrıca satılık hayvanların değerini belirlemek, sigorta işleri, tohumlama programındaki pahalı hormon kullanım israfını azaltmak ve ekonomik hayvan üretimine yardımcı olmak için de gebelik teşhisine ihtiyaç duyulmaktadır (13). Bununla birlikte bugüne kadar, östrüse dönme zamanından önce, gebelik teşhisine imkân veren bir klinik yöntem mevcut değildir (19).

Erken Gebelik Faktörü (EGF) olarak adlandırılan maddenin varlığı, Rozet inhibisyon testi (RIT) kullanılarak yapılan araştırmalarda, laboratuvar ve deney hayvanlarının yanısıra, insan ve birçok evcil hayvanlarda da gösterilmiştir (4, 10, 16-18, 20, 29, 38). EGF, fertilizasyondan kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve abort şekillendiğinde aktivitesi ortadan kalkar (21, 26, 31, 37, 45).

Fertilizasyondan sonra hızla ortaya çıkması, gebeliğin ilk üçte ikilik dönemi boyunca varlığını sürdürmesi ve embriyonun ölümü ya da cerrahi olarak uzaklaştırılmasını takiben hızla ortadan kaybolması gibi EGF'nin özellikleri, erken gebelik teşhisi için güçlü bir belirleyici olarak ve embriyo canlılığını izlemede bir araç olarak kullanılabilmesini gösterir (7, 9, 11, 24, 25, 27, 32). Ancak sığır EGF'ü hakkında sadece birkaç rapor bulunduğu için, EGF'nin klinik uygulamasından önce daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmada, ineklerde tohumlama sonrası kan serumunda; 7. ve 21. gündeki EGF ile 21. gündeki progesteron ve 45. gündeki rektal muayene bulguları değerlendirilerek, elde edilecek gebelik oranları

arasındaki ilişkinin ve erken gebelik teşhisinde, EGF bulgularının kullanılıp kullanılmayacağı araştırılması amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada, küçük aile tipi işletmeciliğe ait, yaşları 3-8 arasında değişen, üreme yönünden herhangi bir klinik bozukluğu bulunmayan, tabii östrüslerinde sun'i olarak tohumlanan, toplam 60 İsviçre Esmeri inek kullanıldı. Hayvanlardan, tohumlamayı izleyen 7 ve 21. günlerde vena jugularisten steril kan alma tüplerine 10 ml kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri, pıhtı teşekkül edinceye kadar (takriben 2 saat) oda ısısında bekletildi. Pıhtı oluşan örnekler, çizilerek oda ısısında, serum vermesi için 3 saat kadar bekletildi. Tüpün üst kısmında toplanan serumlar, steril santrifüj tüpüne aktararak, 1600 devir /dk'da, 30 dakika süre ile santrifüje edildi. Serumlar, EGF ve progesteron tespitinde kullanılmak üzere iki ayrı serum saklama tüpüne aktarıldı. Daha sonra, EGF tespitinde kullanılacak serumlar, 30 dakika süreyle etüvde 56°C'de inaktive edildikten sonra, -20°C'de muhafaza edildi. Progesteron ölçümü için kullanılacak serum örneğine inaktivasyon işlemi uygulanmaksızın, RIA ile progesteron analizi işlemine kadar -20°C'de saklandı.

### EGF'nin Ölçülmesi:

Serum örneklerinde EGF'nün varlığı, RIT ile araştırıldı. Sakonju ve ark. (30) tarafından detaylı olarak tarif edilen, antilenfosit serum, lenfosit süspansiyonu, kobay serumu, koyun eritrositinin hazırlanması ve RIT metot kullanıldı.

### RIA ile kan serumu progesteron tayini:

Yirmibirinci günde alınan kan serumu örneklerinde, progesteron düzeyleri ng/ml olarak double RIA metodu ile belirlendi (14, 28). Kan serumu progesteron seviyelerinin ölçülmesinde, coated tüp

metodu (Coat-A-Count®, Diagnostic Corporation (DPC), U.S.A.) kullanıldı. RIA ölçüm cihazı olarak, Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan gamma counter kullanıldı.

#### Rektal muayene ile gebeliklerin kontrolü:

Tohumlanan hayvanların gebelikleri, tohumlamayı izleyen 45. günde rektal palpasyon ile kontrol edildi.

#### Veri analizi:

Tohumlamadan sonra 7 ve 21. günde serum EGF'sine ait RIT'leri 4'ün üzerinde olan inekler gebe kabul edildi. Yirmibirinci günde serum progesteron konsantrasyonları, Alaçam ve ark. (1)'nin yaptığı çalışmadaki 2.3 ng/ml düzeyi esas alınarak, gebe olan ve olmayanlar belirlendi. Testin doğruluk oranı, değerlendirmeye alınan hayvanlara ait RIT ve P<sub>4</sub> bulgularının, palpasyon bulgularına bölünmesiyle elde edilen değer, 100 ile çarpılması sonucu elde edildi. Yedinci günde EGF aktivitesine ait titre 4'ün üzerinde iken, 21. günde titre 4'ün altına indiğinde aradaki fark ile 21. gün EGF düzeyi 4'ün üzerinde olmasına rağmen 45. günde rektal muayene sonucunda gebe bulunmayanlar, embriyonik kayıp olarak değerlendirildi. Rozet İnhibisyon Titre'leri ve progesteron miktarları, rektal muayene sonuçlarıyla mukayese edilerek embriyonik ölümler değerlendirildi. Veriler t ve bağımlı gruplarda x<sup>2</sup> testleriyle analiz edildi (8, 39). Veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası olarak sunuldu.

#### BULGULAR

Tohumlamayı izleyen 7. günde EGF bulgularına göre, 60 inekten 53'ünün (%88.3) gebe, 7'sinin (%11.7) gebe olmadığı tespit edildi (Tablo 1).

Tohumlamayı izleyen 21. gün EGF sonuçlarına göre 60 ineğin 41'i (%68.3) gebe ve 19'unun (%31.7) gebe olmadığı görüldü (Tablo 1).

Yirmibirinci günde progesteron düzeyine bakılarak yapılan gebelik teşhisinde 60 inekten 43'ünün (%71.7) gebe, 17'sinin (%28.3) gebe olmadığı görüldü (Tablo 1).

Sun'i tohumlamayı izleyen 45. günde yapılan rektal muayenede 60 inekten 29'unun (%48.3) gebe, 31'inin (%51.7) ise gebe olmadığı belirlendi (Tablo 1).

Rektal muayene sonuçları esas alınarak yapılan değerlendirmede, 7. gün EGF, 21. gün EGF ve 21. gün progesteron ölçümlerine göre, elde edilen sonuçların doğruluk oranları: Sırasıyla gebelerde %54.7, %70.7 ve %67.4; gebe olmayanlarda ise her üç metoddan da %100 olarak bulundu. (Tablo 2).

Rektal muayene sonuçları temel alındığında, gebe ve gebe olmayan ineklere ait serum örneklerinde yapılan ölçümlerde, 7. günde rozet inhibisyon titreleri (RIT) arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılık bulunmakla birlikte (P<0.01), 21. günde alınan örneklerde farkın çok daha önemli olduğu görüldü (p<0.001) (Tablo 3).

Gebe hayvanlarda RIT'si, 7. ve 21. günlerde 4'ün üzerindeydi ve 4'ün altına düşmedi. Tohumlamayı izleyen 45. günde rektal muayenede gebe olmayanların RIT'leri 3 farklı formda görüldü (Tablo 4).

1. Yedinci ve 21. günde RIT'si 4'ün altında olanlar (7 hayvan).

2. Rozet İnhibisyon Titre'si 7. günde 4'ün üzerinde olup 21. günde 4'ün altına düşenler (12 hayvan).

3. Yedinci ve 21. günde Rozet İnhibisyon Titre'si 4'ün üzerinde olmasına rağmen 45. günde gebe olmadığı tespit edilenler (12 hayvan).

Rozet İnhibisyon Titre'lerine göre EGF değerlendirilmesi Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tohumlama sonrası 45. günde gebe olan ineklerde, 21. günde ortalama progesteron değeri 5.69 ± 0.22 ng/ml iken, gebe olmayanlarda 1.66 ± 0.26 ng/ml olduğu ve aralarındaki farkın önemli olduğu görüldü (p<0.001).

Yirmibirinci günde progesteron değerleri ile Rozet İnhibisyon Titre'leri arasında fark önemsizken (p>0.05), 7. günde RIT ile 21. günde progesteron değerleri arasında farkın önemli olduğu görüldü (p<0.01).

Rozet İnhibisyon Titre'leri 4'ün altında olan ve EGF değerlendirmesine göre gebe olmadığı sonucuna varılan 7 inekten 6'sında, ortalama progesteron değeri 0.08 ± 0.01 ng/ml olduğu ve geriye kalan bir hayvanda ise progesteron yoğunluğunun 1.22 ng/ml olduğu görüldü.

Şekil 1-2'de, koyun eritrositleri ile boğa lenfositleri arasındaki çeşitli rozet oluşumu görüntüleri sunuldu.

**Tablo 1.** Yedinci ve 21. gün EGF, 21. gün P<sub>4</sub> ve 45. güne ait rektal muayene bulguları.

İnek Sayısı	45. Gün R. Muayene Bulguları		7. Gün EGF Bulguları		21. Gün EGF Bulguları		21. Gün P <sub>4</sub> Bulguları	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
60	29	31	53	7	41	19	43	17

(+) : Gebe

(-) : Gebe değil

**Tablo 2:** 45. gündeki rektal muayene sonuçlarına göre, tohumlama sonrası 7 ve 21. gündeki EGF ve 21. gündeki P<sub>4</sub> ölçümlerinin, gebe ve gebe olmayanları belirlemedeki doğruluk oranları.

Gebelik Testleri	45.gündeki rektal muayene sonuçlarına göre testlerin doğruluk yüzdesi (%)	
	Gebe	Gebe Değil
7. gün EGF	54.7	100
21. gün EGF	70.7	100
21. gün P <sub>4</sub>	67.4	100

**Tablo 3.** Rektal muayene sonuçlarına göre gebe ve gebe olmayan ineklerdeki 7. ve 21. güne ait Rozet İnhibisyon Titre'leri.

R. Muayene Bulguları	Hayvan Sayısı	Rozet İnhibisyon Titre'leri	
		7. Gün	21. Gün
Gebe	29	5.79 ± 0.10	5.76 ± 0.12
Gebe Değil	31	4.90 ± 0.26	3.80 ± 0.33
Fark		P<0.01	P<0.001

**Tablo 4.** Yedi ve 21. gündeki RIT 21. gündeki P<sub>4</sub> konsantrasyonu ve 45. gün rektal muayene sonuçlarının değerlendirilmesi

İnek Sayısı	R I T		P <sub>4</sub> (ng/ml)	Rektal Muayene	Yorum
	7. Gün	21. Gün			
7	< 4 (-)	< 4 (-)	< 2.3 (-)	(-)	Fertilizasyon başarısızlığı ya da 7. güne kadar şekillenen erken embriyonik ölüm ?
10	> 4 (+)	< 4 (-)	< 2.3 (-)	(-)	Erken embriyonik ölüm ? (7-16. günlerde)
29	> 4 (+)	> 4 (+)	> 2.3 (+)	(+)	Gebelik
2	> 4 (+)	< 4 (-)	> 2.3 (+)	(-)	Geç embriyonik ölüm ? (16-21. günlerde)
12	> 4 (+)	> 4 (+)	> 2.3 (+)	(-)	Geç embriyonik ölüm ? (21. günden sonra)

(+) : Gebe

(-) : Gebe değil

**Şekil 1.** Boğa lenfositleri ile koyun eritrositleri arasında oluşan hale şeklindeki bir E-rozetin mikrofotograf (x320) görüntüsü.**Şekil 2.** Boğa lenfositleri ile koyun eritrositleri arasında oluşan tam E-rozetin mikrofotograf (x320) görüntüsü.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Tohumlama sonrası gebe kalan ve kalmayan hayvanların en erken dönemde tespiti önemlidir. İnek yetiştiriciliğinde amacın her yıl bir buzağı elde etmek olduğu göz önünde tutularak, doğum ile yeni bir gebeliğin şekillenmesi arasındaki sürenin mümkün olduğunca uzamaması için, özellikle gebe kalmayan hayvanların teşhisine imkân veren yöntemler üzerinde çalışmalar devam etmektedir (2). Günümüzde erken gebelik teşhisinde kullanılan yöntemler içinde RIT ile EGF tespiti, bu konuda erken sonuç almayı sağlayan uygulamadır (42).

Yasuda ve ark. (44), sun'i tohumlamadan 15 gün sonra, ineklerden alınan serum örneklerinde, gebe hayvanlardaki Rozet İnhibisyon Titre'sini ortalama  $6.6 \pm 1.28$ , gebe olmayanlarda ise  $2.0 \pm 0.94$  olarak tespit etmişlerdir. Sakunju ve ark.(30) da sun'i tohumlamayı müteakip 6-9. günlerdeki ortalama Rozet İnhibisyon Titre'sini gebelerde,  $6.25 \pm 0.89$ , gebe olmayanlarda ise  $5.33 \pm 2.16$ ; 13-16. günlerdeki Rozet İnhibisyon Titre'lerini ise gebe ve gebe olmayanlarda sırasıyla  $6.63 \pm 0.92$  ve  $3.50 \pm 1.05$  olarak belirlemişler ve ineklerde 13-16. günlerdeki gebe ve gebe olmayan hayvanların Rozet İnhibisyon Titre'leri arasındaki farkın önemli olduğunu bildirmişlerdir. Shimizu ve ark. (33) da sun'i tohumlamayı izleyen 15. günde, gebe ve gebe olmayan ineklerin Rozet İnhibisyon Titre'leri arasındaki farkın önemli olduğunu açıklamışlardır. İto ve ark. (12), in vitro fertilizasyon sonrası 6-7. günlerde blastosit gelişimi olanlarda, serum EGF aktivitesi oranının, olmayanlardan önemli ölçüde ( $p<0.05$ ) daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada da tohumlama sonrası 7. günde elde edilen verilerin (gebelerde  $5.79 \pm 0.10$ , gebe olmayanlarda  $4.90 \pm 0.26$ ), yukarıda zikredilen çalışmaların bulgularıyla uyum içerisinde olduğu görüldü.

Gebe hayvanlarda tohumlamadan sonraki 21. günde elde edilen progesteron değerlerine ait çalışmalarda (1, 6, 34, 36), progesteron düzeyinin 2.3 ile 14 ng/ml arasında değiştiği bildirilmektedir. Bu çalışmada, gebe hayvanlarda tohumlamadan sonraki 21. günde elde edilen progesteron değerleri ( $4.07-8.54$  ng/ml), Shin ve ark.(35)'nin tespitlerinden ( $3-5$  ng/ml) biraz daha yüksek olup, yukarıda anılan diğer çalışmalarda bildirilen değerlere yakındır.

Progesteron östrüsti hayvanlarda düşük seviyelerdedir. Bu zamanda yapılan örnekleme, tekrar östrüs gösteren inekleri ayırt etmeye imkân vereceğinden, 21. gündeki progesteron miktarının tespiti, gebeliğin tahmininden ziyade, gebe olmayanların belirlenmesinde

daha çok güvenilir olmaktadır. Bazı araştırmacılar (1, 15, 22, 23, 40, 41), %87-%100 oranında bir doğrulukla, gebe olmayanları belirlemişlerdir. Bu çalışmada da gebe olmayanlar %100'lük bir doğrulukla tespit edildi.

Sakunju ve ark (30), gebe ineklerde 5'in üzerinde olan RIT'lerinin, embriyoların alınmasından 3 gün sonra 4'ün altına düştüğünü göstermişlerdir. Bu bulgu, Rozet İnhibisyon Titre'lerinin, ineklerde doğrudan doğruya embriyonun canlılığını yansıttığının göstergesidir ve oluşturulan aborttan sonra, inekte EGF aktivitesinin bulunmaması sebebiyle, embriyonik kaybın en erken belirleyicisidir. Bu çalışmada, 21. gün progesteron ölçümü sonucu, gebe olmayan hayvanların %41.2'sinin, 7. gün EGF aktivitelerinin 4'ün altında olduğu görüldü. Bu, daha ziyade fertilizasyonun şekillenmemesi ya da erken embriyonik ölüm şekillendiği şüphesini uyandırmaktadır. Yirmibirinci gün progesteron ölçümü sonucuna göre gebe olmayan hayvanların %58.8'inde ise, 7. gündeki EGF aktivitesine ait titre 4'ün üzerinde iken, 21. günde 4'ün altına düştü. Bu, embriyonun gelişmemesini yansıtır ve EGF üretimiyle, erken embriyonik ölümlerin ilişkili olduğunu göstermektedir.

Birkısım araştırmacılar (5, 35, 43), tabii ya da sun'i tohumlamadan sonra fertilizasyon oranını %85-95 olarak bildirirken, tohumlama sonrası 42. günde gebelik oranının sadece %50-60 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da 7. gündeki EGF aktivitesine ait RIT'i fertilizasyon olarak değerlendirildiğinde, %88.3 oranında bir fertilizasyonun şekillendiğinin tespit edilmesi, bu bulguları doğrulamaktadır.

Barth ve Horsch (3), embriyonik ölümlerin %10'dan %65'e kadar çıkabileceğini, Diskin ve Sreenan (5) ise embriyonik ölümlerin %30'dan fazla olduğunu bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada da tohumlamayı izleyen 45. gündeki embriyo kayıpları %45.3 bulundu. Ancak, 7. gündeki RIT bulgularının fertilizasyon olarak değerlendirilmesi dolayısıyla bu oranın, gerçek embriyonik ölüm oranından biraz daha düşük olması muhtemeldir.

Sonuç olarak, tüm kantitatif yöntemler gibi, laboratuvar donanımına gerek duyulması, saha şartlarında uygulanmasının güçlüğü, olumsuz bir yön olmakla birlikte, ineklerde tohumlama sonrası EGF aktivitesinin ölçülmesi, fertilizasyon başarısızlığını ve erken embriyonik kayıpların ortaya konmasında değerli bir yöntem olarak kullanılabilir. Tohumlamayı izleyen 7. günde RIT kullanılarak, EGF teşhisi yardımıyla, özellikle

gebe olmayan ineklerin kısa sürede belirlenip yeniden tohumlanmaları mümkün olabilir.

Kısaca, tohumlamadan sonraki 7. günde gebe ve gebe olmayan inekler arasında, Rozet İnhibisyon Titre'leri arasında önemli bir fark olduğundan ( $p < 0.01$ ), EGF

aktivitesine bakılarak gebeliğin, diğer metodlara göre, daha erken dönemde teşhisinin yapılabileceği kanaatine varıldı.

#### KAYNAKLAR

1. Alaçam E, Tekeli T, Sezer AN. İneklerde Erken Gebelik Tanısı Amacıyla Kan ve Sütte Progesteron Hormonu Düzeylerinin Araştırılması. SÜ Vet Fak Derg 1987; 3: 13-23.
1. Alaçam E, Tekeli T, Türkarlan T. İneklerde Erken Gebeliğin Enzim İmmunoassay Kiti ile Pratik Tanısı. LHAED 1987; 27: 12-18.
2. Barth T, Horsch F. Occurrence, Diagnosis and Avoidance of Embryonic and Fetal Losses in Cattle. Vet Bull 1983; 53: 304-305.
3. Clark IQ, Orozco C, Cock IE, Clarke FM. The 'Early Pregnancy Factor' Revisited: the Effect of Ammonium Sulfate on the Capacity of Pregnant Mouse Sera at Express Activity in the Rosette Inhibition Assay. J Reprod Fert 1994; 100: 297-289.
4. Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and Embryonic Mortality Rates in Beef Heifers after Artificial Insemination. J Reprod Fert 1980; 59: 463-468.
5. Eraldo S, Bono G, Fanti CD. Possibilita' di Diagnosi di Gravidanza Nella Bovina Mediante la Valutazione del Tasso Plasmatico del Progesterone al 19 deg -22 deg Giorno Dalla Fecondazione. Atti della Societa Italiana di Buiatria 1973; 5: 500-510.
6. Fan XG, Zheng ZQ. A Study of Early Pregnancy Factor Activity in Preimplantation. Am J Reprod Immunol 1997; 37: 359-364.
7. Feldman D, Gagon J. StatViewTM, BrainPower, Inc., Calabasas, CA. 1985.
8. Hubel V, Straube W, Loh M, Wodrig W, Weber A, Klima F. Human Early Pregnancy Factor and Early Pregnancy Associated Protein before and after Therapeutic Abortion in Comparison with Beta-hCG, Estradiol. Exp Clin Endocrinol 1989; 94: 171-176.
9. Hunter RHF. Differential Transport of Fertilised and Unfertilised Eggs in Equine Fallopian Tubes: a Straight Forward Explanation. Vet Rec 1989; 125: 304.
10. Igarashi S. Clinical Significance of Early Pregnancy Factor. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 1986; 38: 896-902.
11. Ito K, Takahashi M, Kawahata K, Goto T, Takahashi J, Yasuda Y. Supplementation Effect of Early Pregnancy Factor-Positive Serum into Bovine in Vitro Fertilization Culture Medium. Am J Reprod Immunol 1998; 39: 356-361.
12. Jainudeen MR, Hafez ESE. Pregnancy Diagnosis. In: Hafez ESE, Editor. Reproduction in Farm Animals. 6 th ed. Philadelphia. Lea and Febiger 1993; 446-459.
13. Kayguzoğlu E. İneklerde Tohumlama Sırasında Uygulanan GnRH'nin Gebelik Oranları ve Kan Progesteron Seviyesi Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ. 1997.
14. Kishimoto Y, Kato H, Mitani M. Enzyme Immunoassays of Progesterone in Bovine Plasma and Skim Milk and its Application to Early Pregnancy Diagnosis. J Jpn Vet Med Assoc 1987; 40: 161-164.
15. Klima F, Katzwinkel S, Tiemann U, Mehlis B, Kauffold P, Pitra Ch. Untersuchungen zum Frühträchtigkeitsfaktor beim Rind. Fertilität 1990; 6: 61-65.
16. Klima F, Schadow D, Frölich K, Lengwinant Th, Baugatz C, Pielowski Z, Seidel B, Göltenboth R. Nachweis eines Bovinen Trächtigkeitsproteins bei Cerviden und dessen Eignung zur Charakterisierung phylogentischer Verwandtschaftsbeziehungen. Verh ber Erkrz Zootiere 1994; 36: 67-72.
17. Klima F, Schadow D, Schröder HD, Pitra Ch. Detection of Bovine Early Pregnancy Factor (EPF) Active Polypeptide in Different Species of Mammals. EOS-J Immunol Immunopharmacol 1993; 8: 189-192.
18. Klima F, Tiemann U, Pitra CH, Kauffold P. Serological Detection of Early Pregnancy in Cattle and Partial Characterization of a Serum

- Glycoprotein Associated with Early Pregnancy. *J Reprod Immunol* 1987; 11: 31-39.
19. Klima F, Tiemann U, Schadow D, Fasinski M, Savoly SB, Loose R, Pitra C. Bovine Early Pregnancy Factor (EPF) Activity Dependent on A 67-kDa Polypeptide. *J Reprod Immunol* 1992; 21: 57-70.
  20. Koch E. Early Pregnancy Factor: its Significance as an Indicator of Fertilization and Embryonic Viability. In: Sreenan JM, Diskin MG, Editors. *Embryonic Mortality in Farm Animals*. Dordrecht, Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers 1986; 74-92.
  21. Kovacevic R, Krsmanovic L, Maric D, Perkucin R, Veselinovic S, Mandic L. Use of a Progesterone Test in Early Pregnancy Diagnosis-Analysis of the Incidence of False Positive Results. *Acta Veterinaria* 1985; 35: 267-272.
  22. Laing JA, Eastman SAK, Boutflower JC. The Use of Progesterone Concentrations in Milk and Plasma for Pregnancy Diagnosis in Cattle. *Br Vet J* 1979; 135: 204-209.
  23. Mesroglu M, Maas DH, Schneider J. Early Abortion Rate in Sterility Patients: Early Pregnancy Factor as a Parameter. *Zentralbl Gynakol* 1988; 110: 555-561.
  24. Morton H, Clunie GJA, Shaw FD. A Test for Early Pregnancy in Sheep. *Res Vet Sci* 1979; 26: 261-262.
  25. Morton H, Nancarrow CD, Scaramuzzi RJ, Evison BM, Clunie GJA. Detection of Early Pregnancy in Sheep by The Rosette Inhibition Test. *J Reprod Fert* 1979; 56: 75-80.
  26. Nancarrow CD, Evison BM, Scaramuzzi RJ, Turnbull KE. Detection of Induced Death of Embryos in Sheep by the Rosette Inhibition Test. *J Reprod Fert* 1979; 57: 385-389.
  27. Öcal H. İneklerde İntrauterin İlaç Uygulamasının Ovaryum Faaliyetleri ve Uterus Üzerine Etkileri. Doktora Tezi. F.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Elazığ. 1991.
  28. Quinn ZH, Zheng ZQ. Detection of Early Pregnancy Factor in Human Sera. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987; 13: 15-18.
  29. Sakonju I, Enonoto S, Kamimura S, Hamana K. Monitoring Bovine Viability with Early Pregnancy Factor. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 271-274.
  30. Shahani SK, Moniz C, Chitlange S, Meherji P. Early Pregnancy Factor (EPF) as a Marker for the Diagnosis of Subclinical Embryonic Loss. *Exp Clin Endocrinol* 1992; 99: 123-128.
  31. Shahani SK, Moniz CL, Bordekar AD, Gupta SM, Naik K. Early Pregnancy Factor as a Marker for Assessing Embryonic Viability in Threatened and Missed Abortions. *Gynecol Obstet Invest* 1994; 37: 73-76.
  32. Shimizu K, Goto T, Takahashi J, Yasuda Y. Detection of Early Pregnancy Factor in Cattle and its Clinical Application. *J Jpn Vet Med Assoc* 1990; 43: 325-329.
  33. Shin WJ, Kim HS, Lee KS. A Study on Early Pregnancy Diagnosis in Korean Native Cattle. Research Reports of the Office of Rural Development. Suweon Livestock and Veterinary 1981; 23: 64-67.
  34. Sreenan JM, Diskin MG (1986). The Extent And Timing of Embryonic Mortality in the Cow. In: Sreenan JM, Diskin MG, Editors. *Embryonic Mortality in Farm Animals*. Dordrecht, Netherlands. Martinus Nijhoff Publishers 1986; 1-7.
  35. Sreenan JM, Gosling J. Peripheral Plasma Progesterone Levels in Cycling and Pregnant Beef Heifers. *Ir Vet J* 1975; 29: 105-108.
  36. Straube W, Tiemann U, Loh M, Schutz M. Detection of Early Pregnancy Factor (EPF) in Pregnant and Nonpregnant Subjects with the Rosette Inhibition Test. *Arch Gynecol Obstet* 1989; 246: 181-187.
  37. Sueoka K, Dharmarajan AM, Michael E, Atlas SJ, Wallach EE. Detection of Early Pregnancy Factor (EPF) Using the Rabbit Ovary and Oviduct Perfused In Vitro. *J Reprod Fert* 1988; 84: 325-331.
  38. Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik. Ankara. Hatiboğlu Yayınevi. 1989.
  39. Thibier M, Petit M, Humblot P. Use of Progesterone Concentrations in Peripheral Plasma or Milk in Cattle Herd Management. Control of Reproduction in the Cow. A Seminar in the EEC Programme of Coordination of Research on Beef Production held at Galway, September 27-30, 1977. 1978; 576-595.
  40. Thompson JA, Marsh WE, Etherington WG, Moment HW, Kinse ML. Evaluation of the

- Benefits of the Timing of Pregnancy Testing by Transrectal Palpation in Dairy Cattle. JAVMA 1995; 207: 1462-1465.
41. Threlfall RW. Immunosuppressive Early Pregnancy Factor (ISEPF) Determination for Pregnancy Diagnosis in Dairy Cows. Theriogenology 1994; 41: 317.
  42. Weigelt B, Weigelt R, Barth T, Bach S, Eulenberger K, Schulz J. Untersuchungen zur embryonalen Mortalität in einer Milchkuhherde. Monatshefte für Veterinärmedizin 1988; 43: 157-160.
  43. Yasuda Y, Moriyama Y, Takahashi J. Immunoreproductive Study on Cattle, with Special Reference to Detection of Early Pregnancy Factor (EPF) and its Clinical Application. Journal of the Faculty of Agriculture, Iwate University 1991; 20: 231-247.
  44. Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. Application of Anti-Bovine CD2 Monoclonal Antibody to the Rosette Inhibition Test for Detection of Early Pregnancy Factor in Cattle. J Vet Med Sci 1995; 57: 721-725.