

MİKROTİTRASYON PLAK ENZYMEİMMUNOASSAY (EIA) YÖNTEMİYLE
İNEKLERDE DOĞUM SONRASI SÜT PROGESTERON DÜZEYLERİNİN
TAYİNİ¹

Bülent Güven²

Fahri Bölükbaşı³

Determination of milk progesterone levels during post partum period in cows by using micro-titration plate enzymeimmunoassay (EIA)

Summary: *In this study, skim milk progesterone levels in dairy cows during post partum period. were determined by using microtitration plate enzymeimmunoassay. In the quality control studies of EIA, intra-assay coefficients of variation were 13.9 %, 8.1 % and 6.9 % for low, medium and high levels of control samples, respectively. The inter-assay coefficients of variation of 9.6 %, 9.3 % and 10.6 % were obtained for low, medium and high levels of control samples respectively. The correlation between RIA and EIA was $r=0.91$ and statistically significant ($p<0.001$). The average recovery of the assay was found to be 91.7 % and the detection limit was 4 pg / well.*

The post partum interval from parturition to the resumption of ovarian activity (first elevation o progesterone) was 33.44 ± 11.5 days and skim milk progesterone levels were less than 0.5 ng / ml during this period. The duration of first post partum cycle was significantly ($p<0.001$) shorter (13.8 ± 1.07 days) than subsequent normal cycle (21.38 ± 1.07 days) and the luteal phase progesterone levels between these two cycles were also significantly different ($p<0.001$). On the other hand, the post partum periods up to the first short cycles were generally shorter than those of normal cycles. The rate of silent heat during the first ovulation of post partum was 76.1 %. The mean duration of post partum period was 125.5 ± 43.9 days in pregnant animals. The progesterone values between the pregnant (> 1 ng / ml) and non-pregnant (< 0.5 ng / ml) animals on days 19.—23. were highly significant ($p < 0.001$).

1. Bu çalışma, aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

2. Doç. Dr. Başbakanlık, TAEK, Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara.

3. Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Özet: *Bu çalışmada, süt ineklerinde doğum sonrası dönemde yağsız süt progesteron seviyeleri mikrotitrasyon plak enzimeimmunoassay yöntemi ile tayin edildi. EIA'nın kalite kontrolü çalışmalarında deney içi varyasyon katsayıları düşük, orta ve yüksek düzey kontrol örnekleri için sırasıyla % 13.9, % 8.1, % 6.9, deneyler arası varyasyon katsayıları ise yine üç kontrol örneği için sırasıyla % 9.6, % 9.3 ve % 10.6 olarak bulundu. RIA ve EIA arasındaki korelasyonun ($r=0.91$) önemli ($p<0.001$), EIA testindeki ortalama verim oranının % 91.7 ve tayin edilebilen en düşük miktarın 4 pg | delik olduğu saptandı.*

Doğumdan ovaryum aktivitesinin başlamasına (ilk progesteron yükselmesine) kadar geçen sürenin 33.44 ± 11.5 gün olduğu ve bu süre içinde progesteronun yağsız süte 0.5 ng | ml'den aşağıda bulunduğu görüldü. Post partum dönemdeki ilk siklus süresi (13.8 ± 1.07 gün), bunu takip eden normal siklus süresinden (21.38 ± 1.07 gün) önemli ölçüde ($p<0.001$) kısa bulundu ve bu iki siklusun luteal evrelerindeki progesteron miktarları arasındaki fark önemli ($p<0.001$) oldu. Ayrıca kısa siklus öncesi post partum sürenin normal siklus öncesi süreden daha kısa olduğu tespit edildi. Post partum dönemin ilk ovulasyonundaki gizli kızgınlık oranı % 76.1 olarak belirlendi. Gebe kalan hayvanların ortalama post partum süresi 125.5 ± 43.9 gün olarak bulundu. Gebe olanlar (> 1 ng | ml) ve olmayanlar ($0.5 < \text{ng | ml}$) arasında 19.-23. günler aralığındaki progesteron değerleri farkının önemli ($p<0.001$) olduğu hesaplandı.

Giriş

İneklerden optimum verim elde etmek için bir ineğin doğumu izleyen 85. güne kadar gebe kalması arzu edilir (21, 24). Doğum sonrası siklik aktivitenin geç başlaması veya hiç başlamaması, tohumlanmanın zamanında yapılmaması, gizli kızgınlık, gebe olmayanların erken teşhis edilememesi, embriyonik ölüm ve çeşitli genital hastalıklar buzağılama aralığının uzamasına sebep olmaktadır (2, 4, 12). Bu da, hem bakım ve besleme masrafı hem de süt kaybı yoluyla ekonomik zarara neden olmaktadır (7). Doğum sonrası dönemde oluşan ilk ovulasyondaki fertilité oranı düşük olduğundan ovaryum aktivitesinin bir an önce başlaması tercih edilir. Süt ineklerindeki en uygun sürenin 20-45 gün olduğu bildirilmektedir (9, 17, 32). Bununla beraber doğum sonrası dönemde ovaryum aktivitesinin başlamasını yaş, mevsim, besleme, barındırma, emzirme ve sağım, doğum sonrası oluşan hastalıklar etkileyebilmektedir (7, 23, 26).

Üremenin kontrolü ve doğum sonrası dönemde hayvanların uygun zamanda gebe kalınmalarının sağlanması için teşhis ve tedavide veteriner hekimlere yardımcı bir metodun rutin olarak kullanılması gereklidir. Bu konularda en fazla güvenilirliği kanıtlanmış ve rutin çalışmalarda yaygın olarak kullanılan parametre progesterondur. Bu hormon miktarının süt veya serumda tayininde çoğunlukla radioimmunoassay (RIA) ve enzymeimmunoassay (EIA) teknikleri kullanılmaktadır. Radioizotopların ve organik solventlerin insan sağlığına olan zararlı etkileri ve pahalı bir yöntem olması gibi nedenlerden dolayı özellikle rutin hormon laboratuvarlarında RIA'nın yerini EIA tekniği almaya başlamıştır. Kolay uygulanabilirliği ve duyarlı oluşu gibi özellikler, EIA metodunun tercih edilmesindeki diğer önemli faktörler arasında sayılmaktadır (1, 27, 31). Ülkemizde bugüne kadar EIA metodu ile progesteronun tayin edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Yurdumuzda pek az laboratuvarında sürdürülen hormon tayini çalışmalarında RIA yönteminin uygulanmakta olduğu görülmektedir. Bunların çoğunda ithal edilen hazır hormon kitleri kullanılmakta ve bu da önemli bir döviz kaybına sebep olmakla hayvancılık alanında ekonomik bir uygulama olmamaktadır.

Bu çalışmada, güvenilir, duyarlı ve ekonomik bir metot olan mikrotitrasyon plak EIA tekniğinin Türkiyede ilk kez kullanılması ele alınmış, infertilite sorunu bulunmayan süt ineklerinde doğum sonrası dönemde yağsız sütte progesteron tayini suretiyle yöntemin uygulanması ve progesteron değişmelerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada 4 yaşlarında 21 süt ineği kullanıldı. Kışın ahırda bağlı olarak bulundurulmuş hayvanlara iyi bir beslenme programı uygulanmaktaydı. Kızgınlık gösteren her hayvan suni olarak tohumlandı ve belirli zamanlarda rektal palpasyonla muayene edildi.

Süt numuneleri yeni doğum yapan hayvandan haftada 3 kez ve sabah sağımindan alındı, 3.000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildikten sonra yağsız kısım -20°C 'de saklandı.

Antiserum üretimi için 5 aylık, dişi 4 tavşan ve $11\alpha\text{-OH-Progesteron-HS-BSA}$ antijeni kullanıldı. Elde edilen antiserum, titresi ve özgüllüğü RIA ile tayin edilerek karakterize edildi. Bu antiserumdan IgG fraksiyonu belirtilen yöntemle (6) izole edildi.

11 α -OH-Progesteron-HS, Horse Radish Peroxidase enzimi ile bildirilen metoda göre işaretlendi (25). Konjugat ilk önce dialize edildi, daha sonra Sephadex G-25 kolon kromatografisinden geçirilerek saflaştırıldı. EIA ile progesteron tayini van de Wiel'in (30) bildirdiği şekilde yapıldı.

Yağsız sütte progesteron tayini 1, 2, 6, 7-³H-Progesteron (80, 110 Ci / mmol) kullanılarak yapıldı ve bağlı kısım, % 0.4 dextran kaplı aktif kömür ile ayrıldıktan sonra sintilatör (Xyloflour) içinde Likit Sintilasyon Sayacında sayıldı.

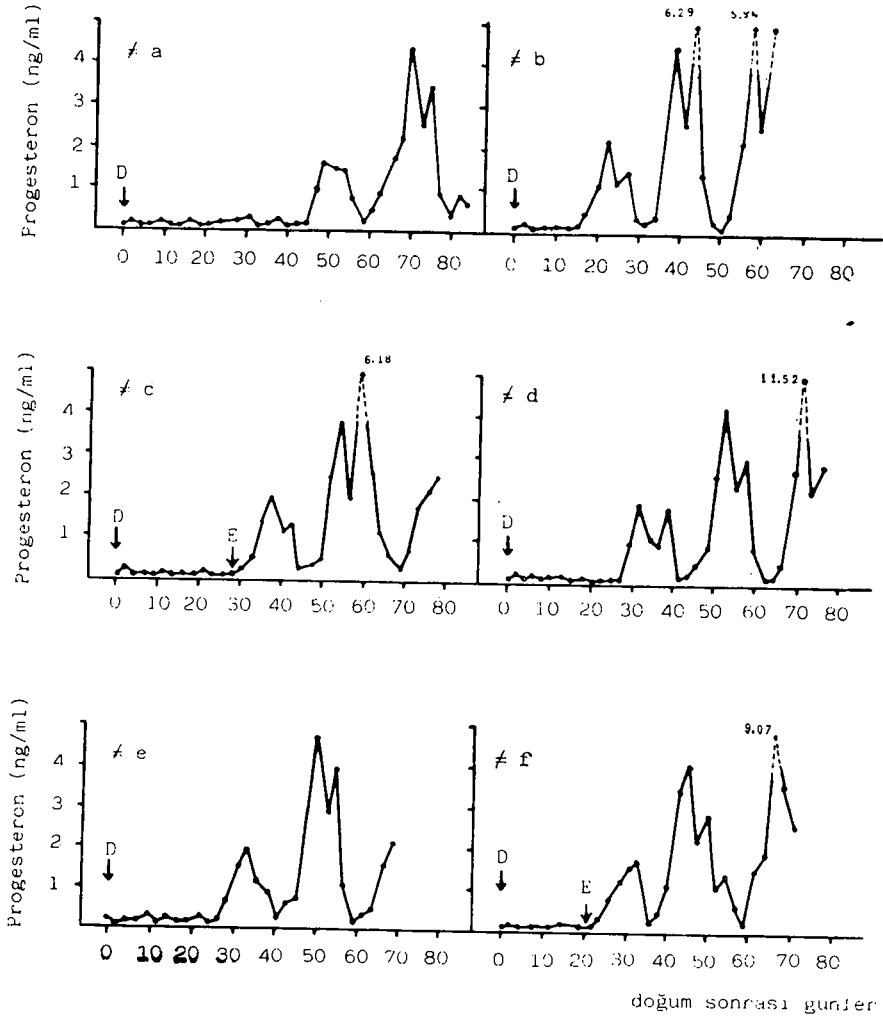
Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiki hesaplar Hewlett Packard (HP-41 CX) mini bilgisayarda "Klinik Laboratuvar ve Nükleer Tıp" modülü kullanılarak yapıldı.

Bulgular

Deneye alınan 21 ineğin hepsinde doğumu izleyen dönemde yağsız sütteki progesteron miktarları 0.5 ng / ml'nin altında bulundu (Şekil 1-4). Sadece bir hayvanda (Şekil 3-c) bu değer başlangıçta 1.5 ng / ml civarındaydı ve yaklaşık bir hafta sonra diğerlerindeki düzeye indi. Progesteronun bu düşük düzeyinin tüm ineklerde ortalama 33.44 \pm 11.5 (14-51) gün olduğu saptandı.

Şekil 1-4 incelendiğinde ineklerde ilk siklus süresinin farklı olduğu görülmektedir. Nitekim ineklerin 11'inde (% 52) siklus süresi (Şekil 1, 2) 13.8 \pm 1.07 (12-16) gün (kısa süreli), diğer 10'unda (Şekil 3,4) ise 21.38 \pm 1.07 (19-23) gün (normal süreli) bulundu. Kısa süreli siklus gösteren ineklerde birinciyi izleyen ikinci siklusun normal sürede oluştuğu (21.18 \pm 1.08) ve iki siklusun süreleri arasındaki farkın önemli olduğu (p<0.001) (Tablo 1) görüldü. Kısa süreli siklus ile bunu izleyen normal siklusun luteal dönemindeki progesteron düzeyleri de farklı bulundu (Tablo 1). Nitekim ilk siklusun luteal evresinde 1.59 \pm 0.18 ng / ml olan yağsız süt progesteron düzeyi, ikinci siklusun aynı evresinde 3.77 \pm 1.27 ng / ml değerine yükseldi (p<0.001). Ayrıca siklus uzunlukları ile post partum süre arasında bir ilişki olduğu ve kısa siklus gösteren hayvanlardaki doğum sonrası sürenin normal siklusa sahip olanlarınkinden daha kısa olduğu saptandı (Tablo 2).

Progesteron değerlerine göre tesbit edilen ovulasyon zamanında, 5 hayvan dışında diğerlerinin tümünde (% 76.1) gözle izlenebilir bir

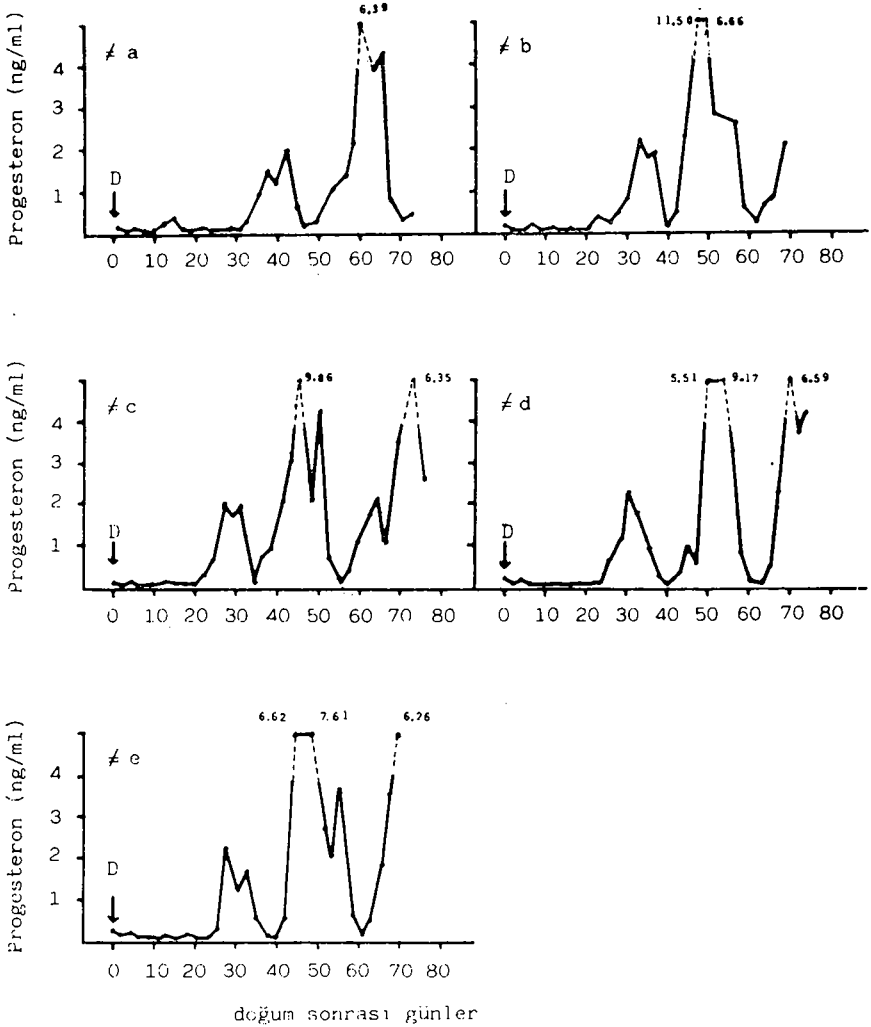


Şekil 1: Doğum sonrası dönemde ilk siklusun kısa süreli olduğu ineklerde yağsız süt progesteron düzeyleri. E= Östrus, D= Doğum

Fig. 1: Post partum skim milk progesterone levels of cows showing short cycles. E= Estrus, D= Parturition

kızgınlık saptanamadı. İkinci ovulasyonda ise kızgınlığı gözlenen hayvan sayısı 11'e yükseldi.

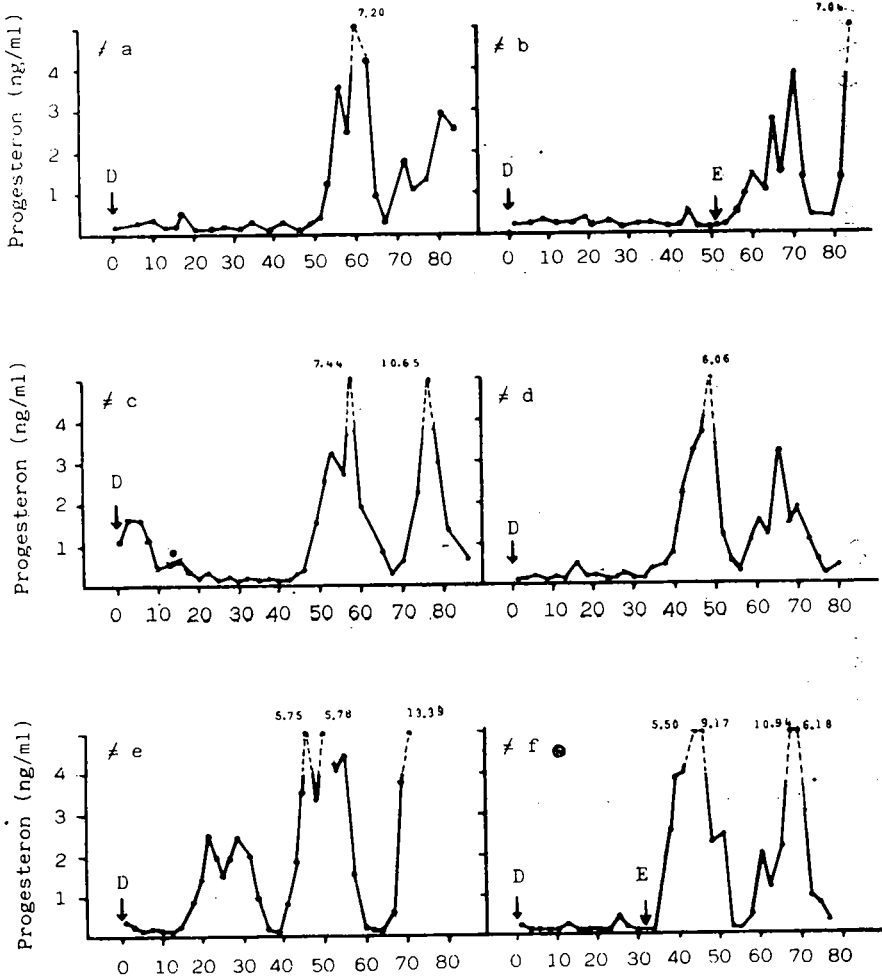
Deneyimizde kullandığımız 21 inekten kızgınlık gösteren 14'ü suni olarak tohumlandı ve bunlardan 8'inin gebe kaldığı hem rektal



Şekil 2: Doğum sonrası dönemde ilk siklusun kısa süreli olduğu ineklerde yağsız süt progesteron düzeyleri. D— Doğum

Fig. 2: Post partum skim milk progesterone levels of cows showing short cycles.
D - Parturition

hem de yağsız sütte progesteron tayini suretiyle doğrulandı. Gebelerde ortalama post partum süre 125.5 ± 43.9 (60-210) gün olarak bulundu. Bunların süt progesteron seviyeleri tohumlama gününde en düşük düzeyde idi. Daha sonra artmaya başlayan progesteron miktarı, siklusun 17. gününden sonra da 1 ng/ml'nin üzerinde seyretti (Şekil 5). Gebe

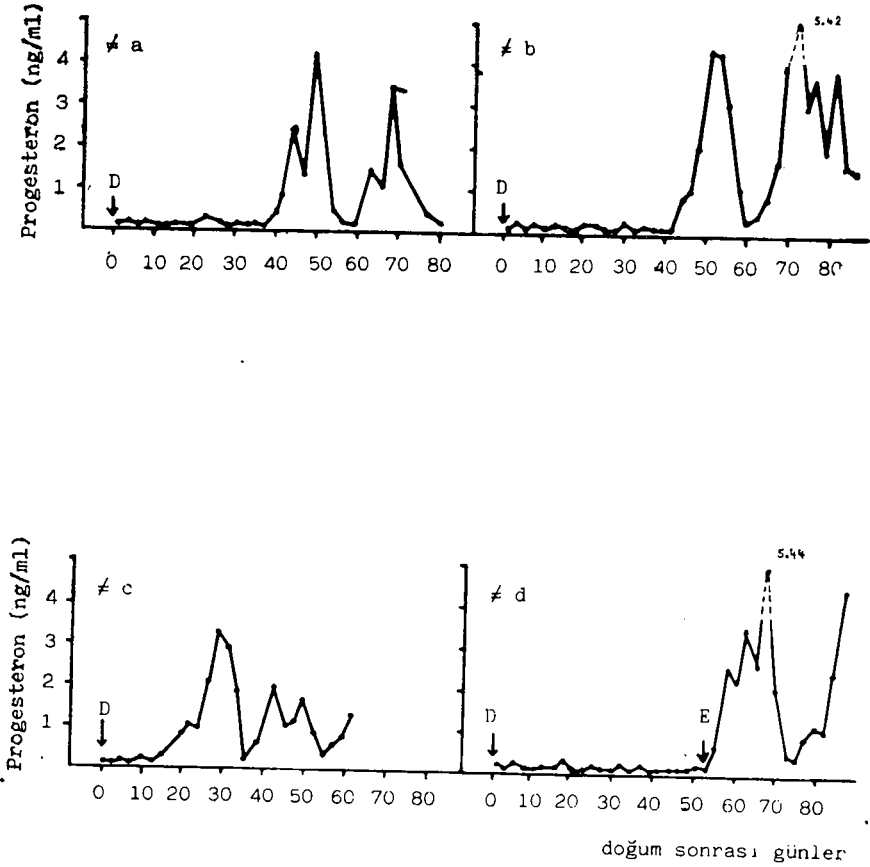


doğum sonrası günler

Şekil 3: Doğum sonrası dönemde ilk siklusun normal süreli olduğu ineklerde yağsız süt progesteron düzeyleri. E= Östrus, D= Doğum

Fig. 3: Post partum skim milk progesterone levels of cows showing normal cycles E=Estrus, D= Parturition

olmayanlarda ise progesteron miktarı 17. günden itibaren azalarak 0.5 ng / ml'nin altına indi (Şekil 6). Bunların iki tanesinde (Şekil 6-b, d) tohumlama zamanındaki progesteron miktarı tohumlamadan önceki günlerdekinden daha yüksek bulundu. Tohumlanan hayvanların 19.-23. günlerdeki progesteron miktarları Şekil 7'de görülmektedir.



Şekil 4: Doğum sonrası dönemde ilk siklusun normal sürelili olduğu ineklerde yağsız süt progesteron düzeyleri. E= Östrus, D= Doğum

Fig. 4: Post partum skim milk progesterone levels of cows showing normal cycles E= Estrus, D= Parturition

Gebe olan hayvanların bu günlerdeki yağsız süt progesteron düzeyleri 1 ng/ml'den yüksek idi.

Antiserumun diğer steroidlerle olan çapraz reaksiyon oranları testosteron ve aldosteron için sırasıyla % 0.21 ve % 0.18 olarak bulundu. Hydrocortisone, cortisone, estrone, estradiol, estriol ve estrone sulfat hormonları ile olan çapraz reaksiyon oranları ise % 0.1 den az bulundu.

EIA testinin deney içi ve deneyler arası varyasyon katsayıları tablo 3 ve 4'de görülmektedir. RIA ve EIA metotları ile tayin edilen

Tablo 1: Kısa süreli siklus gösteren ineklerde ilk iki siklusun süreleri ve yağsız sütteki progesteron düzeyleri (n=11)

Table 1: The duration of first two cycles and skim milk progesterone levels of cows showing short cycles (n=11)

	İlk siklus	İkinci siklus	İlk iki siklus farkı
Süre (gün)	13.8 ± 1.07 (12—16)	21.38 ± 1.07 (19—23)	p < 0.001
Progesteron miktarı (ng / ml)	1.59 ± 0.18	3.77 ± 1.27	p < 0.001

Tablo 2: Siklus uzunluğu ile post partum süre arasındaki ilişki (* hayvan sayısı)

Table 2: The correlation between post partum interval and cycle length

Doğum ile ilk ovulasyon arası süre (gün)	1. ve 2. ovulasyon arasındaki süre	
	12—16 (gün)	19—23 (gün)
< 35	9*	3*
> 36	2*	7*

Tablo 3: Deney içi varyasyon katsayıları

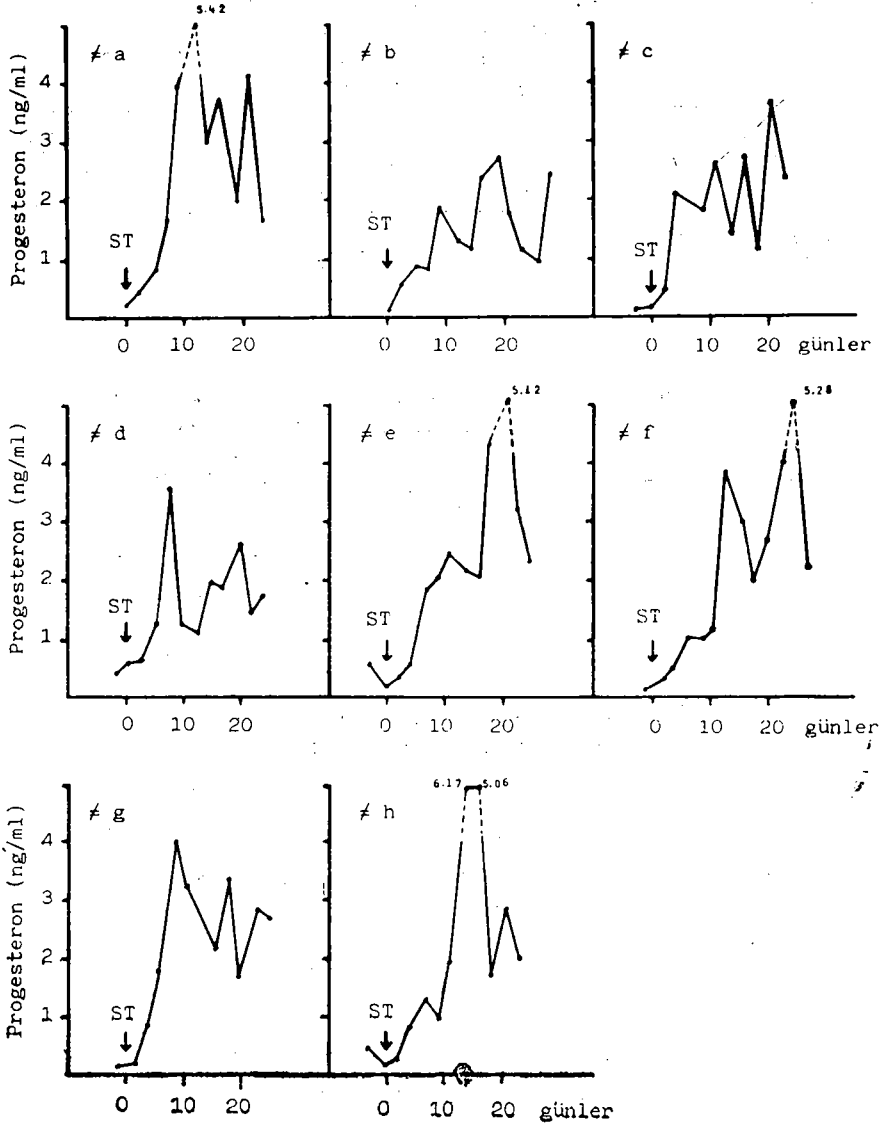
Table 3: Intra-assay coefficient of variation

	\bar{X} (ng / ml)	VK (%)	n	SD;
Kontrol 1	0.364	13.9	6	0.05
Kontrol 2	1.447	9.1	6	0.11
Kontrol 3	5.780	6.9	6	0.30

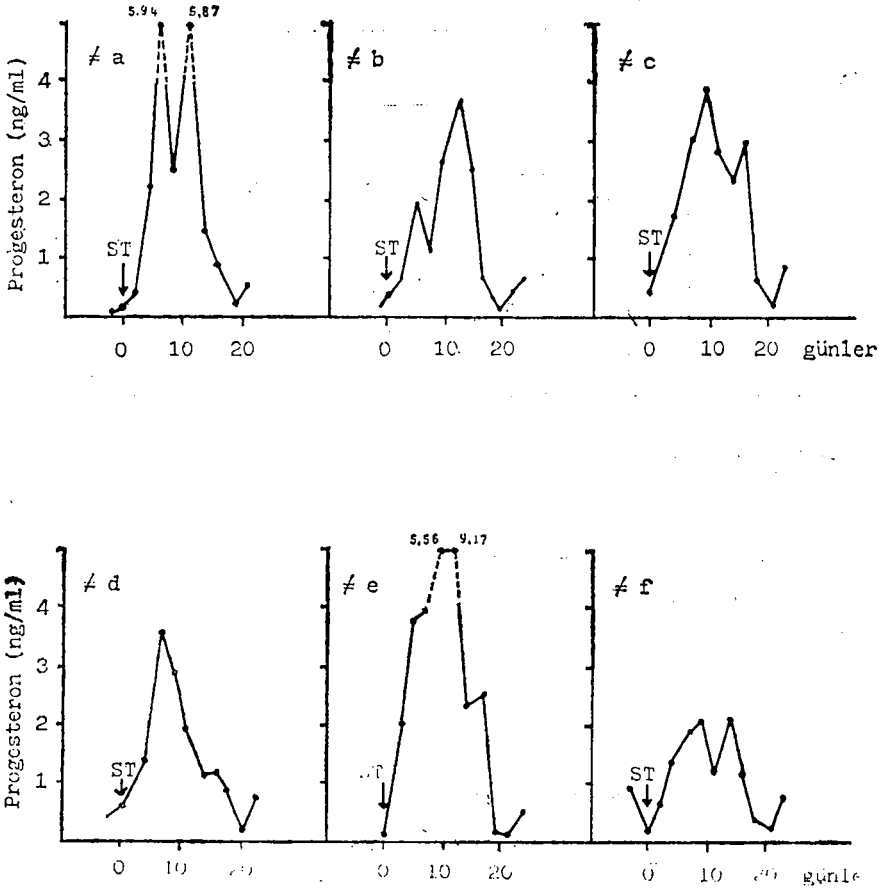
Tablo 4: Deneyler arası varyasyon katsayıları

Table 4: Inter-assay coefficient of variation

	\bar{X} (ng / ml)	VK (%)	n	SD
Kontrol 1	0.328	9.6	13	0.03
Kontrol 2	1.026	9.3	12	0.09
Kontrol 3	1.543	10.6	12	0.16

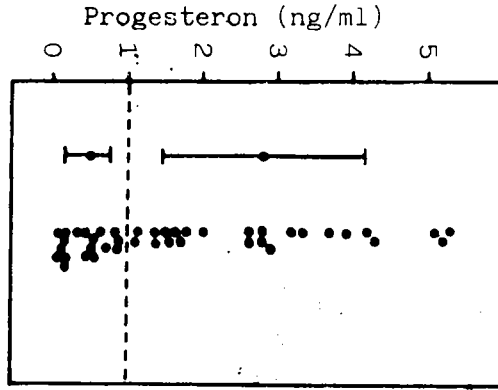


Şekil 5: Gebe kalan ineklerde progesteron düzeyleri. ST= Suni tohumlama
 Fig. 5: Progesterone levels in pregnant cows. ST= Artificial Insemination



Şekil 6: Gebe kalmayan ineklerde progesteron düzeyleri. ST = Suni tohumlama
 Fig. 6: Progesterone levels in non-pregnant cows. ST = Artificial Insemination

38 yağsız süt örneğindeki progesteron değerleri arasındaki korelasyon $r=0.91$ olarak hesaplandı ve bunun istatistiki olarak önemli olduğu ($p<0.01$) anlaşıldı (Şekil 8). EIA testindeki kantitatif verim (recovery) % 91.7, bu testteki korelasyonun $r=0.99$ olduğu anlaşıldı (Şekil 9). EIA testinin duyarlılığı 4 pg/delik olarak hesaplandı.

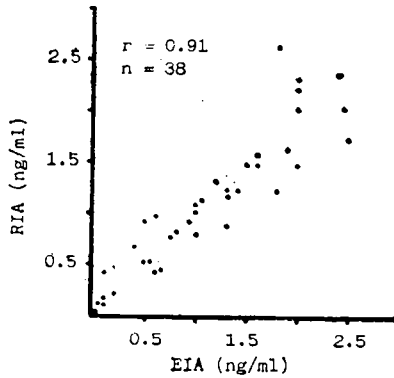


Şekil 7: Tohumlanan hayvanların 19.—23. günlerindeki progesteron miktarları

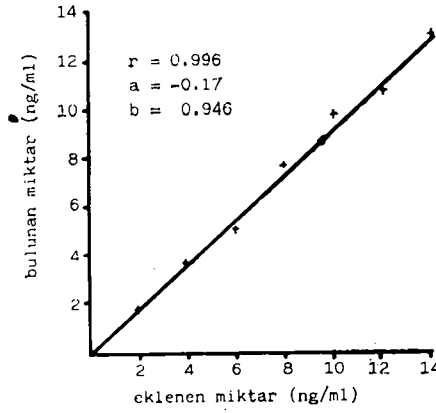
- Gebe olmayan \bar{X} : 0.4 ± 0.3
- Gebe \bar{X} : 2.8 ± 1.3
- I Standart sapma

Fig. 7: Progesterone levels of inseminated cows on days 19.—23.

- Non-pregnant \bar{X} : 0.4 ± 0.3
- Pregnant \bar{X} : 2.8 ± 1.3
- I Standart deviation



Şekil 8: RIA ve EIA ile tayin edilen progesteron miktarlarının karşılaştırılması
Fig. 8: The correlation between RIA and EIA techniques



Şekil 9: Kantitatif verim (recovery)
Fig. 9: Quantitative recovery

Tartışma ve Sonuç

Deneyde kullanılan 21 inekten 1'inde (şekil 3-c) doğum sonrası elde edilen yüksek progesteron düzeyi (1.5 ng / ml) Hoffmann ve ark. (15) tarafından da bildirilmektedir. Schams ve Karg. (29) özellikle gebelik sırasında devamlı salınan progesteronun yağ dokuda depolandığını ve bu nedenle lutealiz sonucunda düşmesi beklenen progesteron miktarında, yağ dokudan oluşan salınma sonucu bir gecikme olabileceğini kaydederek doğumu izleyen 10 gün içinde bazı ineklerde görülen yüksek progesteron düzeyini açıklamaya çalışmışlardır.

İneklerde ovaryum aktivite başlangıcına kadar geçen ve ortalma 33.44 ± 11.5 gün olarak bulunan post partum süre, literatür bildirimlerine paralel bulunmaktadır. Nitekim Hackett ve ark. (14) bu süreyi 24, Schams ve ark. (28) 28, Eldon ve ark. (11) 35. Mather ve ark. (20) 21 ve Caudle ve ark. (3) 49 gün olarak bildirmişlerdir.

Süt ineklerinde post partum dönemde kısa siklusların oldukça sık rastlanan bir durum olduğu çalışmamızda da görülmüş ve 21 hayvandan 11'inde (% 52) siklus süresi 13.8 ± 1.07 gün olarak saptanmıştır (Şekil 1. 2). Schams ve ark. (28) post partum kısa siklusa hayvanların yaklaşık % 50'sinde rastlamışlar (13.1 ± 2.9 gün), Edqvist ve ark. (10) da aynı oranda ve 7-12 gün olarak bildirmişlerdir. Eldon ve

ark. (11) ise hayvanların % 63'de 9-17 günlük kısa sikluslar kaydetmektedirler. Kısa siklus gösteren hayvanların ilk siklusu ile bunu izleyen ikinci siklusun hem süreleri hem de luteal dönem progesteron miktarları arasındaki farkın önemli oluşu ($p < 0.001$) (Tablo 1), Mather ve ark. (20) nın sonuçları ile uygunluk içerisinde.

Post partum dönemde oluşan kısa siklusları Schams ve ark. (28) ovaryuma yeterli kan gelememesi sonucu LH reseptörlerinin yeterli uyarılamaması ve bu nedenle korpus luteumun gelişmemesi şeklinde açıklamakta ve ovulasyon öncesi oluşan LH artışını yetersiz bulmaktadırlar. Aynı yazarlar (28) bu miktarı, normal siklus öncesi oluşan LH artışından düşük bulmuşlar ve aynı durum Echternkamp ve ark. (8) tarafından da bildirilmiştir. Edqvist ve ark. (10) kısa siklusların prematüre prostaglandin salınımı nedeniyle oluşabileceklerini kaydetmektedirler. Nitekim, Kindhal ve ark. (16) da ovulasyondan kısa süre sonra salınan endojen prostaglandinin kısa ve düzensiz siklulara neden olabileceğini bildirmektedirler. Eldon ve ark. (11) ise kısa süreli ve düşük progesteron düzeyli ilk siklusun, ineğin normal ovaryum aktivitesine başlamasına yardım edebileceği ihtimalinden söz etmektedirler.

Kısa siklus öncesi post partum sürenin normal siklus öncesi post partum süreden daha kısa olduğu bulgusu (Tablo 2). Larsson ve ark. (19)'nın süt ineklerinde, King ve ark. (18)'nin hem sütçü hem de etçi sığırlarda bildirdiği sonuçlara benzer bulunmaktadır.

Çeşitli araştırmacılar ilk ovulasyonun gözlenemiyen bir kızgınlıkla seyretme oranlarını % 31.7 (3), % 56.2 (2) ve % 58.7 (13) olarak kaydetmektedirler. Çalışmamızda ise kullanılan 21 inekten sadece 5'inde ilk ovulasyonda kızgınlık saptanmış ve gizli kızgınlık oranı % 76.1 gibi yüksek bir düzeyde bulunmuştur. Hayvanların deneme süresince ahırda bağlı olarak bulundurulmuş olmaları bu yüksekliğin nedenini açıklayabilir. Nitekim, Claus ve ark. (5) ahırda bağlı tutulan hayvanlarda gizli kızgınlığın daha fazla oranda oluşabileceğini bildirmektedirler. Ayrıca bu tip barındırma sırasında östrusta oluşan klinik belirtilerin (vaginal sekresyon, hiperemi vs.) kaybolabileceği ve böylece kızgınlık tesbitinin zorlaşabileceği bildirimlerine de rastlanmaktadır (5, 11). Bu açıklamaların da gösterdiği gibi stres doğurucu barındırma, hayvanları kızgınlık belirtileri göstermekten alıkoyabilmekte ve böylece post partum dönemde kızgınlığın tesbit edilememesi sonucu bu süre uzamış görünmektedir. Bununla beraber Schams ve ark. (28) klinik olarak post partum dönemde gözlenemiyen kızgınlığın, siklusun

hiç oluşmadığı (acyclia) şeklinde düşünülmemesi gerektiğini vurgulamışlardır. Nitekim bilgisiz yetiştiriciler, bu tip hayvanları kesime göndermekle ekonomik kayıplara neden olabilmektedirler.

Denemedeki 14 hayvandan ancak 8'inin gebe kaldığı hem rektal hem de progesteron değerleri ile tespit edilmiştir. Çeşitli zamanlarda tohumlanan bu hayvanlarda doğum ile bunu izleyen gebe kalma arasındaki süre 60-210 gün gibi geniş bir aralığa yayılmış bulunuyordu. Gebe kalma oranının biraz düşük olmasının ve doğum sonrası dönemin uzamasının başlıca nedenleri gizli kızgınlık, tohumlanıp geri dönen hayvanların zamanında tesbit edilememesi ve tohumlamanın zamanında yapılamaması gibi etmenler olabilir. Nitekim gizli kızgınlığın % 76.1 gibi yüksek bir oranda olması bunu kanıtlar niteliktedir. Ayrıca iki hayvanın (Şekil 6-b, d) progesteron profillerine göre, yanlış zamanda yapılan tohumlama sonucu gebe kalamadığı belli olmaktadır. Nitekim Claus ve ark. (4) tohumlamanın erken veya geç yapıldığının progesteron miktarındaki değişikliklerle tesbit edilebileceğini göstermişler ve çalıştıkları hayvanların % 9.9'da bu durumun oluştuğunu bildirmişlerdir.

Gebe kalan hayvanların 19.-23. günlerinde elde edilen yağsız sütteki 1 ng / ml ve daha yukarı progesteron değerleri (Şekil 7) Nakao ve ark. (22)'nin bildirimlerine uyumlu bulunmaktadır.

Sonuç olarak, süt ineklerinde yağsız süt progesteron düzeylerinin tayini, buzağılama ile ovaryum aktivitesinin başlamasına kadar geçen zamanın araştırılması, post partum dönemde oluşan gözlenemiyen veya gizli kızgınlıkların tesbiti, tohumlamanın uygun zamanda yapılıp yapılmadığının tayini ve tohumlanan hayvanların en erken süre içinde (21. gün) geri dönüp dönmediğinin teşhisi açısından çok önemli bulunmaktadır. Diğer testlere kıyasla çok daha ekonomik olan mikrotitrasyon plak EIA tekniği ile yağsız sütte progesteronun 3 saat gibi kısa bir süre içinde hassas ve doğru olarak tayin edilebilmesi mümkün bulunmaktadır.

Türkiye'de ilk kez uygulaması yapılan ve ekonomik oluşu yanında, radyoaktivite tehlikesi de bulunmayan EIA yönteminin rutin tayinler için laboratuvarlara sokulması, ülkemiz hayvancılığının en büyük problemlerinden biri olan fertilité sorunlarının çözümü yanında son yılların güncel bir konusu olan embryo transferi çalışmalarında da büyük yararlar sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. **Arnstadt, K.I. and Schmidt, B.A.** (1982): *Direct enzymeimmunoassay for determination of progesterone in milk from cows.* Br. Vet. J., 138: 436—438.
2. **Ball, P.J.H.** (1982): *Milk progesterone profiles in relation to dairy herd fertility.* Br. Vet. J., 138: 546—551.
3. **Caudle, A.B., Thompson F.N., Purswell, B., Sharlin, J.S., Brooks, P.M. and Smith, C.K.** (1982): *Effects of monitoring corpus luteum function on days open.* J. Dairy Sci., 65: 638—643.
4. **Claus, R., Karg, H., Rattenberger, E. und Pirchner, F.** (1982): *Analyse von Fortpflanzungsproblemen bei Kühen mit Hilfe der Progesteronbestimmung in Milchfett.* Zucht-hyg., 17: 203—213.
5. **Claus, R., Karg, H., Zwiauer, I., Butler, I.V., Pirchner, F., Rattenberger, E.** (1983): *Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk fat.* Br. Vet. J., 138: 29—37.
6. **Claus, R., Munster, E. und Heinzmann, B.** (1985): *Development of microtitrationplate enzymeimmunoassay for progesterone determination in pig blood plasma and its validation and comparison to radioimmunological methods for progesterone determination.* Zuchthyg., 20: 184—191.
7. **De Kruijff, A.** (1978): *Factors influencing the fertility of a cattle population.* J. reprod. Fert., 54: 507—518.
8. **Echternkamp, S.E. and Hansel, W.** (1973): *Concurrent changes in bovine plasma hormone levels prior to and during the first post partum estrus cycle.* J. Anim. Sci., 37: 1362—1370.
9. **Edqvist L.E., Haggström, A., Kindahl, H. and Stabenfeldt, G.H.** (1976): *Radioisotopic techniques for the study of reproductive physiology in domestic animal: I. Assay procedures.* IAEA—SM—205/3: 513—524.
10. **Edqvist, L.E., Fredericksson, G., Kindhall, H., Larrson, K. and Madej, A.** (1984): *Short oestrus cycles of post partum in cattle. The use of nuclear techniques to improve domestic buffalo production in Asia.* IAEA, Vienna, 79—83.
11. **Eldon, J., Olafsson, T.H. and Thorsteinsson, T.H.** (1985): *A survey of the post partum reproductive performance of dairy cows with fertility problems in southern Iceland.* Acto Vet. Scand., 26: 431—441.
12. **Günzler, O., Rattenberger, E., Gorlach, A., Hahn, R., Hocke, P., Clause, R. and Karg, H.** (1979): *Milk progesterone determination as applied to the concentration of oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinarian and biotechnical measures in cows.* Br. Vet. J., 135: 541—549.
13. **Günzler, O., Müller, S., Claus, R., Karg, H. und Pirchner, F.** (1982): *Analyse von Fortpflanzungsproblemen bei Kühen mit Hilfe der Progesteronbestimmung im Milchfett.* Zuchthyg., 17: 193—202.
14. **Hackett, A.J., Lin, C.Y. and Mc Allister, A.J.** (1985): *Resumption of ovarian activity and estrus of post partum in dairy cows maintained indoors year-round.* Can J. Anim. Sci. 65: 391—398.

15. **Hoffmann, B., Schams, D., Gimenez, T., Ender, M.L., Hermann, Ch and Karg, H.** (1973): *Changes of progesterone, total oestrogens, corticosteroids, prolactin and LH in bovine peripheral plasma around parturition with special reference to the effect of exogenous corticoids and a prolactin inhibitor, respectively.* Acta. Endoc., 73: 385--395.
16. **Kindahl, H., Fredriksson, G., Madej, A. and Edqvist, L.E.** (1984): *Role of prostaglandins in uterine involution.* 10 th Int. Cong. on Animal Rep. and A.I. June 10--14 Urbana., Champaign. 4, XI--9--16.
17. **King, G.J., Hurnik, J.F. and Robertson, H.A.** (1976): *Ovarian function and estrus in dairy cows during early lactation.* J. Animal Sci., 42: 688--692.
18. **King, G.J.** (1984): *Normal, short and long post partum estrus cycles in dairy and beef cows.* 10 th Int. Cong. on Animal Rep. and A.I. June 10--14, Urbana, Champaign, 3: 399.
19. **Larsson, K., Jansson, L., Berglund, B., Edqvist, L.E. and Kindahl, H.** (1984): *Post partum reproductive performance in dairy cows.* Acta Vet. Scand., 25: 445--461.
20. **Mather, E.C., Camper, P.M., Vahdat, F., Whitmore, H.L., Gustaffsson, B.G.** (1978): *Assessment of ovarian activity in the post partum dairy cow by use of a milk progesterone assay.* Theriogenology, 10: 119--129.
21. **McDonald, L.E.** (1980): *Veterinary Endocrinology And Reproduction*, 3 rd ed., Lea and Febiger, Philadelphia.
22. **Nakao, T., Sugishashi, A., Saga, N., Tsunoda, N. and Kawata, K.** (1983): *Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst and cystic corpus luteum in cows.* Am. J. of Vet. Research., 44: 888--890.
23. **Paisley, L.G., Mickelsen, W.D. and Anderson, P.B.** (1986): *Mechanism and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: A review.* Theriogenology., 25: 353--381.
24. **Peters, A.R. and Riley, G.M.** (1982): *Milk progesterone profiles and factors affecting post partum ovarian activity in beef cows.* Anim. Prod., 34: 145--153.
25. **Prakash, B.S., Meyer, H.H.D., Schallenberger, E. and Van de Wiel, D.F.M.** (1987): *Development of a sensitive enzymeimmunoassay for progesterone determination in unextracted bovine plasma using the second antibody technique.* J. Steroid Biochem., 28: 623--627.
26. **Rosenberg, M.** (1977): *Seasonal variations in post-partum plasma progesterone levels in primiparous and multiparous dairy cows.* J. Reprod. Fert., 51:363--367.
27. **Sauer, M.J., Cookson, A.D., Mc Donald, B.J. and Foulkes, J.A.** (1982): *The use of enzyme immunoassay for measurement of hormones with particular reference to the determination of progesterone in unextracted whole milk.* Eds. R.C. Wardley and J.R. Crowter, Nijhoff, The Hague., 271--301.
28. **Schams, D., Schallenberger, E., Menzer, C. Stangl, J., Zottmeier, K., Hoffmann, B. and Karg, H.** (1978): *Profiles of LH, FSH and progesterone in post partum dairy cows and their relationship to the commencement of cyclic functions.* Theriogenology, 10: 453--468.

29. Schams, D. and Karg, H. (1984): *Hormones in milk*. Int. Cong. on Endoc. of the Breast. Torino, Italy, September 19—22.
30. Van de Wiel, D.F.M. (1983): *Enzymeimmunoassay techniques in animal production and health*. Int. Workshop. Zeist, Netherlands, 11—23 April, Report B-237, 111—123.
31. Van de Wiel, D.F.M., Koops, W. and Vos E. (1986): *Enzyme and radioimmunoassay techniques for hormone determination in livestock*. IAEA. SM- 292 /7, 243—253.
32. Webb, R., Lamming, G.E., Haynes, N.B. and Foxcroft, G.R. (1980): *Plasma progesterone and gonadotrophin concentrations and ovarian activity in post-partum dairy cows*. J. Reprod. Fert., 59: 133—143.