

# SÜT PROGESTERON TEST KİTLERİNİN ERKEN GEBELİK VE ÖSTRUSLARIN SAPTANMASINDA ULTRASONOGRAFİ İLE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK KULLANILMASI

Hakkı İzgür\*

Şükrü Küplülü\*\*

Rıfat Vural\*\*

Rıfat Salmanoğlu\*\*

Çetin Kılıçoğlu\*

İsmail Özdemir\*\*\*

Ümit Çerçel\*\*\*\*

The use of bovine rapid progesteron test kits as compared with ultrasonography in determining the early pregnancy and oestrus

**Summary:** *In this study, it was aimed to test the practicablity of bovine rapid progesteron kits (Ovucheck Cowside-Rapid tube kit, Ovucheck 30- rapid well kit, Bayer), which is interpreted visually with color changes, in determining the early pregnancy and oestrus by comparison with ultrasonography between 20 and 24 days after artificial insemination under field conditions in dairy cows.*

*Twenty Brown Swiss cows were used as material. All the cows were examined by ultrasonography and rectal palpation to determine the follicular and luteal structures on the ovaries and the pregnancy. The progesteron concentration in milk was measured by using the rapid progesterone test.*

*The results that were found by milk progesteron level were similar with %100 accuracy, when compared with ultrasonography and rectal palpation results. According to these results, follicular structures and early pregnancy had been detected 6 of the 20 cows and 14 of the 20 cows respectively.*

*As a result; it is concluded that rapid progesteron test kits, which is on the basis of the color changes, are recommended as effective methods in determining the early pregnancy and silent heat and can be employed simply, quickly and with accuracy in the field conditions.*

**Özet:** Bu çalışmada, ineklerde tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasında erken gebeliklerin ve östrusların saptanmasında kullanılan, renk değişim esasına göre çalışan, çabuk süt progesteron test (Ovucheck tüp ve Ovucheck plak) metotlarının, ultrasonografi ile karşılaştırılarak, bu testlerin saha şartlarında uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlandı.

Tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasındaki 20 adet İsviçre esmeri inek, çalışmanın hayvan materyalini oluşturdu. Luteal ve folliküler yapıları belirlemek amacıyla her hayvana rektal palpasyon, gebelikleri belirlemek için ultrasonografik görüntüleme uygulandı. Ayıca süt progesteron düzeyini belirlemek amacıyla de renk esasına dayalı çabuk süt progesteron test kitleri kullanıldı.

Süt progesteron test kitleri ile elde edilen bulgular, rektal palpasyon ve ultrasonografi ile elde edilen bulgularla %100 doğrulukla benzerlik gösterdi. Bu bulgulara göre, 20 inekten 6'sında folliküler yapı, 14'ünde ise, erken gebelik saptandı.

Sonuç olarak; erken gebeliklerin ve gizli seyirli östrusların belirlenmesinde renk esasına dayalı çabuk progesteron test kitlerinin etkili bir metot olduğu ve saha şartlarında kısa sürede, kolaylıkla ve yüksek doğruluk oranı ile kullanılabileceği kanısına varıldı.

## Giriş

\* Prof. Dr. AÜ Veteriner Fak. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

\*\* Doç Dr. AÜ Veteriner Fak. Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara

\*\*\* Veteriner Hekim, Bayer İlaç A.Ş., İstanbul

\*\*\*\* Veteriner Hekim, Anadolu Tarım İşletmesi, Çifteler/Eskişehir.

İneklerde süt, plazma ve serum progesteron seviyesi, fonksiyonel bir korpus luteumun varlığının veya yokluğunun göstergesidir. Süt ineklerinde progesteron değerinin ölçülebilmesi ve bilinmesi, tohumlama anında östrus zamanının doğrulanması, erken gebeliklerin sap-

tanması, postpartum ovaryum aktivitesinin değerlendirilmesi, ovaryum fonksiyon bozukluklarından ileri gelen infertilite nedenlerinin araştırılmasında ve embriyonik ölümlerin belirlenmesinde, önemli rol oynamaktadır (8,12,13, 15,18,19). Süt, plazma ve serum progesteron düzeyleri, gelişmiş altıtle donanmış endokrinoloji laboratuvarlarında uzman kişilerce radio immunoassay (RIA) ve enzim immunoassay (EIA) yöntemleri ile nanogram (ng) düzeyinde saptanabilmektedir (10-13). Ancak laboratuvarların kurulmasında büyük parasal kaynaklara ve uzmanlara ihtiyaç göstermesi, numunelerin laboratuvara ulaştırılması esnasında ortaya çıkan aksaklıklar ve numunelerin belli bölgelerdeki laboratuvara gönderilmesi, değerlendirilmesi ve sonucun bildirilmesi için gerekli zamanın uzun olması, araştırmacıların saha şartlarında uygulanabilir progesteron ölçüm testlerine yönlendirmiştir (8, 11, 13, 18). Çabuk progesteron test kitlelerinin çalışma prensipleri, test edilen serum, plazma veya sütteki progesteronun alkalın fosfatazla işaretli progesteronla birlikte bilinen ve belli miktardaki antikorla karşı karşıya getirilmesi (rekabet esasına göre) ve ilave edilen substratla renk değişikliğinin oluşturulmasıdır. Burada rengi, 5-bromo-4 kloro-3 indolil ve tetrazolium blue şekillendirmektedir. Süt, plazma veya serum örneğinde yeterli miktarda progesteron yok ise, enzim alkalın fosfatazla işaretli progesteronlar tüp yüzeyindeki antikorlara bağlanır ve sonradan ilave edilen substratla bu bileşik reaksiyona girerek değişik tonlarda renk açığa çıkar (örn: mavi renk). Hayvanlardan alınan örneklerde progesteron düzeyi yüksek ise, enzim alkalın fosfatazla işaretli progesteronlar tüp yüzeyindeki antikorlara bağlanamaz ve dolayısıyla substratla da renk reaksiyonu oluşmaz (11). Dionysius (7) sütçü keçi ve inekler üzerinde yaptığı bir çalışmada, renk esasına dayalı kalitatif (Ovucheck Cowside, Calfcheck Reprorip) progesteron test kitleleri ile miktar esasına dayalı kantitatif (Noctech Progesteron EIA, Ovucheck Milk Progesteron EIA ve Enzygnost Milk Progesterone Vet) progesteron test kitlelerini karşılaştırmış, her iki progesteron test kitleleri ile keçilerde gebe olmayanları %80-100, gebe olanları %83-88, ineklerde ise bu oranları sırası ile %90-91 ve %66-68 olarak belirlemiş ve sonuç olarak; renk esasına dayalı kalitatif progesteron test kitlelerinin basit, daha kısa sürede uygulanabilir olduğunu ve doğruluk oranının miktar esasına dayalı progesteron test kitleleri ile benzer sonuçlar verdiğini belirtmiş ve bu testlerin özellikle gebe olmayan ve östrusda olan hayvanların belirlenmesinde oldukça etkili olduğunu vurgulamıştır. Elmore (11) 1986 yılında kalitatif ve kantitatif test kitlelerini karşılaştırdığı çalışmada, bir çok sığır işletmesinde fonksiyonel bir korpus luteumun varlığının tesbitinde renk

esasına dayalı kalitatif testlerin yeterli olabileceğini vurgulamıştır.

Davies ve ark. (6) 1987 yılında 950 süt örneğini kalitatif bir test olan Ovucheck Cowside ve radioimmunoassay tekniği ile karşılaştırmalı olarak incelemişler ve sonuç olarak, sütte yüksek ve düşük progesteron seviyelerinin belirlenmesinde Ovucheck Cowside testinin etkili olduğunu, uygulamanın kısa sürede tamamlandığını ve işletmelere rahatlıkla kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Birçok araştırmacı (4, 5, 16, 24) ineklerde erken gebeliğin tanısında ultrasonografik görüntülemenin de önemli bir yeri olduğunu vurgulamışlardır. Bu araştırmacılar, 5 MHz linear-array problu B mode real-time ultrasonografi ile yaptıkları çalışmalarda, gebeliğin 20. gününde, 3 mm uzunluğundaki embriyonun, 6mm çapındaki anekojenik embriyo kesesinin merkezinde yer aldığını, 22. günde yaklaşık 6 mm uzunluğa ulaşan embriyonun kesenin orta kesiminde çap uzunluğuna yerleştiği ve allontois kesesinin belirlemeye başladığını, 24. günde ise embriyonun anekojenik kese içinde "C" şeklini aldığını belirtmişlerdir.

İneklerde tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasında erken gebeliklerin ve östrusların saptanmasında, renk esasına göre çalışan çabuk süt progesteron testinin (Ovucheck tüp ve Ovucheck plak), rektal palpasyon ve ultrasonografi ile karşılaştırmalı olarak saha şartlarında uygulanabilirliği bu çalışmada amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Hayvan Materyali

Bu çalışmanın hayvan materyalini, Türkiye Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü'ne bağlı Çiftler Anadolu Tarım İşletmesi'ne ait en az bir doğum yapmış, uygun bakım ve beslenme koşullarına sahip, aşım tarihleri 20-24 gün arasında değişen, laktasyondaki 20 adet Brown Swiss (Montofon) ırkı inek oluşturdu.

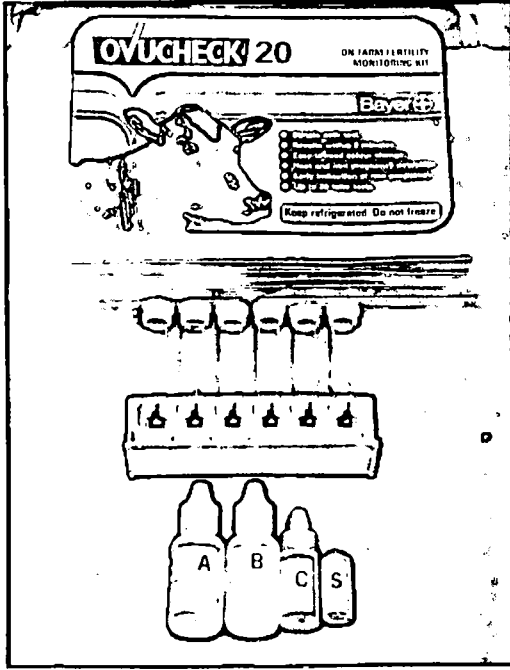
### Ultrasonografi

İneklerde ovaryum ve uterus muayeneleri için Shimadzu (SDL 452) marka, 5.5 Mhz, linear array prob ve resimleyici (printer) donanımlı taşınabilir B mode ultrasonografi kullanıldı.

### Progesteron Test Kitleleri

Çalışmaya alınan hayvanlarda süt progesteron düzeylerini belirlemek amacıyla ovucheck 30 plak test (Ovucheck 30-rapid well kit, Bayer) ve Ovucheck 20 tüp test (Ovucheck Cowside-Rapid tube kit, Bayer) kullanıldı. Ovucheck 30 plak test, standart, solusyon A (enzim konjugat), solusyon B (substrat buffer),

Solusyon C (substrat reagent) plastik pipet ve antiprogesteron monoklonal antikorla kaplanmış, içinde stabilize buffer bulunan 30 adet mini plak içerirken, Ovucheck 20 tüp test, standart, solusyon A(enzim konjugat), solusyon B (substrat buffer), Solusyon C(substrat reagent) ile antiprogesteron monoklonal antikorla kaplanmış 20 adet deney tüpü ve plastik pipetleri kapsamaktaydı (Resim 1,2).



Resim 1: Ovucheck 20 tüp test kiti  
Ovucheck 20 Cowside rapid tube kit

### Rektal Palpasyon Uygulaması

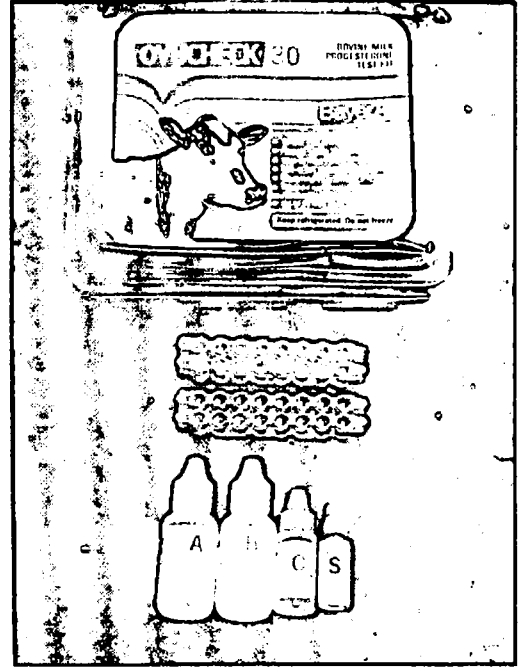
Seçilen hayvanlara rektal palpasyon (25) uygulaması yapılarak ovaryumlardaki folliküller, luteal ve kistik yapılar saptanarak kayıt edildi.

### Ultrasonografi Uygulaması

Çalışmaya alınan tüm ineklere rektal yolla ultrasonografi (21) uygulanarak uterus ve ovaryum bulguları görüntülendi. Bu bulgular doğrultusunda gebe ve gebe olmayan hayvanlar belirlendi.

### Progesteron Test Kit Uygulamaları

Süt progesteron düzeylerini belirlemek amacı ile klinik mastitis bulunmayan meme loblarından ilk beş sağım atıldıktan sonra her bir hayvandan 10'ar mililitre süt alındı. Bu sütler, test kitlelerinin prospektus talimatlarla (2,3) uygun olarak 15 dakika içinde değerlendirilerek sonuçlar kayıt edildi.



Resim 2: Ovucheck 30 plak test kiti.  
Ovucheck 30 rapid well kit.

## Bulgular

### Rektal Palpasyon Bulguları

Rektal palpasyon uygulaması yapılan 20 inekten dördünde graff folikülü saptandı. Palpasyon uygulaması esnasında ise vulvadan çarşak akıntısı gözlemlendi. İki olguda folliküler kist şüpheli atipik ovaryum bulunurken geriye kalan 14 inekte korpus luteum belirlendi (Tablo 1).

### Ultrasonografi Bulguları

Ultrasonografik muayenesi yapılan 20 inekten 14'ünde gebelik pozitif bulundu. Gebeliklerde aneojenik uterus lumeni içinde "C" şeklinde veya fetal kese çapı boyunca yerleşmiş ekojenik embriyo taslağı gözlemlendi (Resim 3).

Tablo 1: Rektal palpasyon, ultrasonografi ve süt progesteron test kit bulguları. (Results of rectal palpation, ultrasonography and milk progesteron).

Ovaryum Palpasyon Bulguları	Ultrasonografi Bulguları		Süt progesteron Bulguları		Tanı	
	F	Cl	Gebelik (+) (-)	Plak Tüp		
-	-	14	14	-	solgun solgun	gebe
2	-	-	-	2	Stand. eşit	ovar. kisti
-	4	-	-	4	koyu koyu	östrus

F: Follikül  
Cl: Corpus luteum

stand. eşit: Standart renge eşit  
ovar. kisti: Ovaryum kisti

Gebelik saptanan hayvanların ovaryumlarında ise ovaryum dokusuna göre daha az anekojenik ve sınırları belirgin gebelik korpus luteumları saptandı. Embriyo taslağı saptanamayan 4 olguda çapları yaklaşık 1.5 cm olan anekojenik yapıda düzgün ince çeperli follüküller bulundu. Çalışmaya alınan 20 hayvandan ikisinde ise, yaklaşık 2 cm anekojenik lumenli, 2mm kalınlığında follükül çeperi olan kistik yapılar belirlendi (Tablo 1).



Resim3: 23 günlük embriyonun ultrasonografik görünümü  
Embriyo taslağı (beyaz ok)  
Ultrasonographic appearance of embryo on day 23 Task of embryo (White arrow).

### Plak Test Kitleri İle Elde Edilen Süt Progesteron Bulguları

Süt progesteron test sonuçlarının değerlendirilmesinde, rektal palpasyon ile korpus luteum ve ultrasonografi ile gebelik pozitif belirlenen hayvanlarda elde edilen plak test renkleri, standart mavi renkten solgun bulundu ve bu örnekler gebelik pozitif olarak değerlendirildi. Standart mavi renkten daha koyu bir renk elde edilen ineklere östrus tanısı konuldu. Palpasyonda atipik ovaryum, ultrasonografide kistik yapı olarak belirlenen iki olguda ise plak test renk sonuçları, standart renk ile eşit bulundu (Tablo 1-2).

### Tüp Test Kitleri İle Elde Edilen Süt Progesteron Bulguları

Tüp test kitleri ile elde edilen sonuçlar, plak test kitleri ile elde edilen test sonuçları ile paralellik göstermiştir (Tablo 1-2).

Her iki test, 15-20 dakika içinde gerçekleştirildi.

Tablo 2: Ultrasonografi ve progesteron test sonuçlarının gebelik tanısında karşılaştırılması (Comparison of progesteron test and ultrasonography results in pregnancy diagnosis)

Yöntem	Hayvan Sayısı	Gebeliğin Tanısı	
		(+)	(-)
Süt progesteron	Tüp	14	6
	Plak	14	6
Ultrasonografi	20	14	6
Yöntemlerin Birbirini Doğrulama Oranı		100	100

### Tartışma ve Sonuç

Birçok (6, 10, 13, 15, 20, 21, 22) araştırmacı, saha şartlarında, progesteron test kitlerinin, doğum sonrası ovaryum aktivitesinin izlenmesinde, aktif luteal evrenin belirlenmesinde, tohumlama gününün doğrulanmasında ve tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasında şüpheli gebeliklerin ve gebe olmayanların ortaya çıkartılması amacı ile güvenle kullanılabilirliğini vurgulamışlardır. Çalışmada ise çabuk progesteron test kitleri, ineklerde tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasında ultrasonografi ile karşılaştırmalı olarak, erken gebeliklerin ve östrusların saptanması amacı ile kullanılmıştır.

Eddy (9) 1984-1985 yıllarında iki işletmede yaptığı bir çalışmada tohumlamayı izleyen 18-24. günler arasında tekrar östrus gösterenlerin, gözlemlenmesi için %40'ını belirlerken, Ovucheck-96 plak süt progesteron test kitleri ile %70'ını belirlemiştir. Thomas ve Dobson (26) gebelik esnasında östrus gösteren 35 inek üzerinde, Ovucheck cowside çabuk progesteron test kitlerini kullanarak, östrusun görsel belirtileri ile süt progesteron düzeyi arasında bir paralellik olmadığını belirlemişlerdir. Davies ve ark. (6) İngiltere'nin MMB (Milk Marketing Board) Veteriner Araştırma laboratuvarında, gebe olmayan sıklık ineklerden alınan 131 süt örneğindeki progesteron düzeylerini Ovucheck Cowside çabuk tüp progesteron test kitleri ile belirlemeye çalışmışlar ve elde ettikleri sonuçları laboratuvar bulguları ile karşılaştırmışlar; sonuç olarak 131 süt örneğinden 74'ünde yüksek progesteron, 55'inde düşük progesteron saptamışlar; 2 örneği ise şüpheli olarak değerlendirmişler ve bu bulgular doğrultusunda testin duyarlılığının %96.4 (53/55), spesifitesini %98.6 (73/74) olarak belirlemişlerdir.

Kastelic ve ark. (17) progtaglandin ile sinkronize edilmiş inekler de 5 mHz linear-array problu, B-mode ultrasonografi kullanarak östrusu izleyen 10. günden itibaren 3 operatörle

gebelik takibi yapmışlardır. Her 3 operatörde gebeliğin 20-27. günleri arasında, anekojenik embriyo kesesi ve embriyo kesesi içinde değişik şekil (C ve L şeklinde) ve konumdaki ekojenik embriyoyu tanıyarak gebe ve gebe olmayan hayvanları %100 oranında belirlemişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda araştırmacılar, tohumlamayı izleyen özellikle 20-24. günler arasında gebe ve gebe olmayan hayvanların ve bu günlerden sonra ortaya çıkan embriyonik ölümlerin belirlenmesinde ultrasonografinin önemli yeri olduğunu vurgulamışlardır. Farin ve ark. (14) Aiumlamai ve Fredriksson (1) Pierson ve Ginther (23) ovaryum kistlerinin ultrasonografi ile %100 doğruluk oranı ile rahatlıkla belirlenebileceğini belirtmişlerdir.

Çiftleşmeyi izleyen 20-24. günler arasında Ovucheck plak ve Ovucheck tüp progesteron test kitlerinin saha şartlarında etkinliğini belirlemek amacı ile ultrasonografi ile karşılaştırmalı olarak yapılan bu çalışmada düşük ve yüksek progesteron değerlerinin belirlenmesinde %100 doğruluk oranı ile bu konuda daha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak; yapılan çalışma ile, renk esasına dayalı Ovucheck plak ve Ovucheck tüp progesteron test kitlerinin, tohumlamayı izleyen 20-24. günler arasında gebe olmayan hayvanların ve gizli seyirli östrusların belirlenmesinde oldukça etkili olduğu ve saha şartlarında, kolaylıkla, kısa sürede ve yüksek doğruluk oranı ile rahatlıkla kullanılacağı kanısına varılmıştır.

#### Kaynaklar

1. Aiumlamai, S. and Fredriksson, G. (1989): *Influence of repeated proglactandin F2 alpha injections on the ovarian function in the heifer*. J. Vet. Med., 36, 530-538.
2. Anon. (1993): *Uses of Cowside rapid tube kit, Instructions*, Bayer UK Ltd. Veterinary Business Group London. 57 pp.
3. Anon. (1993): *Uses of Ovucheck 30 rapid well kit, Instructions*, Bayer UK Ltd Veterinary Business Group London. 7 pp.
4. Chaffaux, S., Reddy, G.N.S., Valon, F. and Thibier, M. (1986): *Transrectal real-time ultrasound scanning for diagnosing pregnancy and for monitoring embryonic mortality in dairy cattle*. Anim. Rep. Sci., 10, 193-200.
5. Curran, S., Pierson, R.A. and Ginther, O.J. (1986): *Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 through 60*. J.A.V.M.A., 189 (10), 1295-1302.
6. Davies, J., Fletcher, N.A. and Newstead, R.A. (1987): *Evaluation of an enzyme immunoassay kit for the qualitative assessment of progesterone in bovine milk samples*. Vet. Rec., 120, 206-207.
7. Dionysius, D.A. (1991). *Pregnancy diagnosis in dairy goats and cows using progesteron assay kits*. Aust. Vet. J, 68 (1), 14-16.
8. Drew, B. (1986): *Milk progesterone testing as an aid to cow fertility management*. In Practice, (1), 17-20.
9. Eddy, R.G. (1985): *The use of an ELISA milk progesterone test as an aid to oestrus prediction in dairy cows*. The Bovine Proceedings 18, 176-179.
10. Eddy, R.G. and Clark, P.J. (1987): *Oestrus prediction in dairy cows using an ELISA progesterone test*. Vet. Rec., 120, 31-34.
11. Elmore, R.G. (1986): *Rapid progesteron assays: The latest in kit technology*. Vet. Med., (7), 659-663.
12. Elmore, R.G. (1986): *Using rapid progesteron assay kits to detect open cows*. Vet. Med., (10), 969-973.
13. Elmore, R.G. (1987): *Better reproductive management through rapid progesterone assay kit technology*. Vet. Med., (1), 84-88.
14. Farin, P.W., Youngquist, R.S., Parfet, J.R. and Garve, H.A. (1990): *Diagnosis of luteal and follicular ovarian cysts in dairy cows by sector scan ultrasonography*. Theriogenology, 34 (4), 633-642.
15. Foulkes, J.A. and Goodey, R.G. (1988): *Fertility of Friesian cow after insemination on the second, third and fourth days of low milk progesteron concentrations*. Vet. Rec., 122, 135.
16. Kastelic, J.P., Curran, S. and Ginther, O.J. (1989): *Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10-22 in heifers*. Theriogenology, 31 (4), 813-820.
17. Kastelic, J.P., Curran, S., Pierson, R.A. and Ginther, O.J. (1988): *Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus*. Theriogenology, 29, 39-54.
18. Leitch, J. (1986): *Progesterone testing: A positive success*. Dairy Farmer, (4), 3-6.
19. Lynch, E.P. and Abbott, P.B. (1988): *Progesteron assays in dairy practice: Seven questions, seven answers*. Vet. Med., (5), 522-528.
20. Markusfeld, O. (1987): *Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: Aetiology and effect on conception*. Vet. Rec., 121, 149-153.
21. McDougall, S. and Hampson, A. (1992): *Efficacy of detection of oestrus in a dairy herd*. Aust. Vet. J., 69 (4), 96-98.
22. Nakao, T., Harada, A., Kimura, M., Takagi, H., Kaneko, K., Sugiyama, S., Saito, A., Moriyoshi, M. and Kawata, K. (1993): *Effect of fenprostalene 14 days after fertirelin treatment on intervals from treatment to conception in cows with follicular cysts diagnosed by milk progesteron test*. J.Vet.Med. Sci., 55 (2), 207-210.
23. Pierson, R.A. and Ginther, O.J. (1984): *Ultrasonography of the bovine ovary*. Theriogenology, 21 (3), 495-504.
24. Pierson, R.A. and Ginther, O.J. (1984): *Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers*. Theriogenology, 22(2), 225-233.
25. Roberts, S.J. (1986): *Veteriner obstetrics and genital diseases (Theriogenology)*. Woodstock, Vermont, pp. 14.
26. Thomas, I. and Dobson, H. (1989): *Oestrus during pregnancy in the cow*. Vet. Rec., 124, 387-390.