

# İnfertil ya da Endometritisli Kısıraklarda Rutin Contagious Equine Metritis (CEM) Taramalarında Pasif Hemaglutinasyon (PHA) Testi ve ELISA' nın Karşılaştırılması ve Değerlendirilmesi\*

N. Yakut ÖZGÜR

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Masashi EGUCHI

National Institute of Animal Health, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN

Toru ANZAI

Epizootic Research Station, Equine Research Institute, Japan Racing Association, Kokubunji-machi Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0412, JAPAN

Serkan İKİZ, Atilla ILGAZ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.10.2000

**Özet:** 1997-1999 yılları arasında Marmara Bölgesinde yarış atı yetiştiriciliği için kullanılan ve endometritis ya da infertilite sorunu olan 120 safkan damızlık kısırak *Taylorella equigenitalis* antikorlarının varlığı yönünden ELISA ve PHA testleriyle incelendi ve iki test karşılaştırıldı. PHA testi ile 58 (% 48,33), ELISA ile 52 (% 43,33) kısırak serumu pozitif olarak saptandı. PHA testi ile pozitiflik saptanan serumların 22'si 1/64, 27'si 1/128, 7'si 1/256 ve 2'si 1/512 titrede pozitiflik verdi. 44 kısırağın serumu her iki testte de pozitif saptanırken, 14 serum sadece PHA testi ile, 8 serum sadece ELISA ile pozitif olarak saptandı. PHA testi ile ELISA arasındaki % 8 farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmadı. Kısa sürede sonuç alınması ve kolay uygulanması nedeniyle rutin taramalarda PHA testi önerildi.

**Anahtar Sözcükler:** *Taylorella equigenitalis*, Contagious equine metritis, pasif hemaglutinasyon testi, ELISA, infertilite, endometritis

## Comparison and Evaluation of the Passive Haemagglutination Test and ELISA in Routine Screening of Contagious Equine Metritis (CEM) in Mares with Endometritis or Infertility

**Abstract:** One hundred and twenty thoroughbred breeder mares with endometritis or infertility were investigated for the detection of antibodies to *Taylorella equigenitalis* by the passive haemagglutination (PHA) test and ELISA between 1997 and 1999 in the Marmara region and the two tests were compared.

Fifty-eight (48.33 %) of 120 sera were found to be positive by the PHA test and 52 (43.33%) by ELISA. 22 of the sera were found to be positive by the PHA test reacted at 1/64 titer, 27 at 1/128, 7 at 1/256 and 2 at 1/512 titer. Sera from 44 mares were positive in both tests. Amongst these, 14 sera were positive in the PHA test and 8 sera were positive in ELISA. The difference between the PHA test and ELISA positivity was 8% and this was not statistically significant. In conclusion, the PHA test was recommended for routine screening of CEM because of its easy handling and rapidness.

**Key Words:** *Taylorella equigenitalis*, Contagious equine metritis, passive haemagglutination test, ELISA, infertility, endometritis

## Giriş

*Taylorella equigenitalis*'in neden olduğu Contagious Equine Metritis (CEM) kısıraklarda servisit, vajinitis, endometritis ve infertilite ile karakterize, çok bulaşıcı venereal bir hastalıktır (1,2,3).

Hastalık ilk kez 1977 yılının Nisan ayında İngiltere (4) ve aynı yılın sonlarına doğru İrlanda'da (5) saptanmıştır. Daha sonra safkan yetiştiriciliği yapılan bir çok ülkede salgınlar halinde ortaya çıkmış ve günümüzde 25 ülke resmi olarak CEM'in varlığını bildirmiştir. Türkiye'de ise

\* Bu araştırma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1058/031297 no'lu projeye desteklenmiştir.

İlk kez 1998 aşım sezonunda Özgür ve ark. (6) tarafından iki kısraktan *T.equigenitalis* izole edilmesi üzerine hastalığın varlığı saptanmıştır.

Kısıraklarda hastalığın klinik tanısının diğer mikroorganizmalardan ileri gelen üreme sistemi infeksiyonlarına benzerliği nedeniyle yapılamadığı, bu nedenle mutlaka etken izolasyonu yapılması gerektiği bildirilmiştir (7,8). Yakın zamanda infekte olmuş kısırakların yüksek bir antikör titresi gösterdikleri fakat bu durumun kısırakların çoğunda birkaç aydan daha fazla sürmediği belirlenmiştir (9). İnfeksiyonu geçiren kısırakların taşıyıcı olarak kalmaları nedeniyle bu hayvanlarda çoğunlukla antikör titresi oluşmadığı ve taşıyıcı kısırakların sadece bakteriyolojik inceleme ile saptanabildiği bildirilmiştir (1,9). Aygırlarda ise asemptomatik bir taşıyıcılık durumu söz konusu olduğu için, immun yanıt şekillenmediği ve bu nedenle de serolojik tanının geçerli olmadığı, tanıda sadece etken izolasyonun geçerli olduğu vurgulanmıştır (2,9,10).

İnfeksiyonun akut dönemindeki kısıraklar etken izolasyonunun yanı sıra serolojik testlerle de saptanabilmektedir. Benson ve ark. (11) serum aglutinasyon (SA) ve antiglobulin (AG) testi, Croxton-Smith ve ark. (12) komplement fikzasyon (CF) testi, Fernie ve ark. (13) pasif hemaglutinasyon (PHA) testi, Sahu ve ark. (14) ELISA geliştirmişlerdir.

Bu araştırmada Özgür ve ark. (6) tarafından endometritis ya da infertilite sorunu nedeniyle CEM yönünden bakteriyolojik olarak incelenmiş kısırakların kan serumlarında *T.equigenitalis* antikörlerinin PHA testi ve ELISA ile araştırılması ve iki testin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**1. Serumlar:** 1997 Ekim-1998 Haziran döneminde 61 ve 1998 Ekim-1999 Haziran döneminde 59 olmak üzere toplam 120 kısraaktan kan alınarak serumları ayrıldı ve inceleninceye kadar -20°C'de saklandı. Örnek alınan kısıraklar yarış atı yetiştiriciliği için damızlık olarak kullanılan ve endometritis ya da infertilite sorunu olan, 6-12 yaşlı kısıraklardı.

**2. Referens suşlar:** PHA test antijeni hazırlanması için Dr. M. Kamada (Equine Research Institute, JRA, Tochigi, Japan)'dan sağlanan *T.equigenitalis* K188 suşu, ELISA antijeni hazırlanması için Dr. T. Anzai (Equine

Research Institute, JRA, Tochigi, Japan)' den sağlanan *T.equigenitalis* T11 suşu kullanıldı.

**3. Pozitif ve negatif serum serum:** Dr. Toru Anzai' den sağlandı.

## 4. PHA testi

*T.equigenitalis* K188 suşu ile ES antijeni hazırlandı. Hazırlanan antijen glutraldehidle fikze edilen eritrositlerle sensitize edildi ve PHA test antijeni olarak kullanıldı (15).

**a. ES antijeninin hazırlanması:** *T.equigenitalis* K188 suşundan 20 adet %10 ısıtılmış at kanı içeren Eugon chocolate agara (ECA) ekim yapılarak %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C de 4 gün inkube edildi. Koloniler 40 ml steril PBS (pH 7.2) ile toplandı, iki kez PBS ile yıkandı ve 100 ml distile su ile yeniden süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu eşit miktarda % 0,5'lik hiyaluronidaz ile karıştırıldı, 37°C de 2 saat inkube edildi ve 5 dakika kaynatıldı. Bundan sonra iki kez PBS ile yıkandı ve 100 ml distile su ile yeniden süspansiyon edildi, süspansiyon MSE-7100 sonikatör ile 30 dakika süreyle parçalandı. Parçalanmayan hücreler ve hücre artıklarını uzaklaştırmak için 1000 g de 30 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı antijen olarak kullanıldı.

**b. Eritrositlerin Glutraldehidle fikze edilmesi:** Atlardan Alsever solusyonu içine kan alınarak eritrositler elde edildi. Eritrositler Cho ve ark. (16)' nın yöntemine göre glutraldehidle fikze edildi, %0,85' lik FTS ile 10 kez yıkandı ve kullanılıncaya kadar 4°C de saklandı.

**c. Glutraldehidle fikze edilmiş eritrositlerin *T.equigenitalis* antijeni ile sensitizasyonu:** Fikze edilmiş eritrositler iki kez PBS ile yıkandı, PBS'de % 20'lik süspansiyonu hazırlandı ve PBS'de hazırlanan 1:20 000'lik tannik asidin eşit miktarıyla karıştırıldı. Karışım su banyosunda 37°C de 10 dakika inkube edildi. Sonra bir kez PBS (pH 6,4) ile yıkandı ve final olarak 100 ml PBS (pH 6,4) ile yeniden süspansiyon edildi. Sensitizasyon için, tannik asitle muamele edilmiş hücrelerin 1 volümü eşit miktarda antijen ve 8 volüm PBS (pH 6,4) ile karıştırıldı. Karışım su banyosunda 37°C de 1 saat inkube edildi ve her 5 dakikada bir çalkalandı. Eritrositlerin sensitizasyonundan sonra hücreler % 0,5 BSA içeren PBS (pH 7,2) ile bir kez yıkandı. Sensitize edilmiş hücreler % 0,1 sodyum azid içeren PBS (pH 7,2) ile %1 konsantrasyonda yeniden süspansiyon edildi ve kullanılıncaya kadar 4°C de saklandı.

d. **Test:** Serumlar testten önce 56°C de 30 dakika süreyle inaktive edildi ve V-tabanlı mikropleytlerde 1/4'den 1/4096'ya kadar PBS (pH 7,2) ile çift katı sulandırıldı. Her mikropleytin birer sırası kontrol amacıyla pozitif seruma ayrıldı. Mikropleytlerin ilk çukurlarına 75 µl, diğerlerine 50 µl PBS ilave edildi. Her serum örneğinden mikropleytlerin ilk çukurlarına 25 µl konularak diğer çukurlara 50 µl aktarıldı. Tüm çukurlara 50 µl sensitize edilmiş hücre süspansiyonu konuldu. Mikropleytler hafifçe çalkalanarak oda ısısında 2 saat inkube edildi. 1/64 ve üzerindeki titreler pozitif, 1/32 ve altındaki titreler negatif olarak değerlendirildi (17).

## 5. ELISA

a. **Antijen hazırlanması:** ELISA antijeni Dolan ve ark. (18)'in bildirdikleri yöntemle yapıldı. Liyofilize referans *T. equigenitalis* T11 suşu 1 ml Eugon brothda (DIFCO) süspanse edildi ve Columbia chocolate agara ekim yapılarak %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C de 5 gün inkube edildi. Daha sonra 7 adet Columbia chocolate agara subkültürleri yapılarak %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C de 5 gün daha inkube edildi. 7 besiyerindeki koloniler 8 ml steril FTS ile toplandı ve FTS ile 1500 g de 10 dakika süreyle 2 kez yıkandı. 100°C lik su banyosunda 2 saat bekletildi. Sediment steril FTS ile tekrar bir kez yıkandı ve final volüm steril FTS ile 15ml' ye tamamlandı.

b. **Test:** ELISA prosedürü Sahu ve ark. (14) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek uygulandı. Antijen pH 9 karbonat-bikarbonat buffer (1.50g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, 1000 ml distile su) ile 1:100 oranında sulandırıldı ve U tabanlı mikropleytin her çukuruna 100 µl ilave edildi. Pleytlerin üzeri kapatılarak 37°C de 20 saat inkube edildi. Bu süre sonunda pleytler her çukura 250 µl dolacak şekilde PBS:T20:BA buffer [%0,05 Tween-20 (SIGMA) ve %1 bovine albumin fraction V (SIGMA) içeren 0.01M PBS (pH 7,4)] ile 3 kez yıkandı. Serumlar (test,

pozitif ve negatif) PBS:T20:BA buffer ile 1:100 oranında sulandırıldı. Her serum örneği iki kez kullanıldı ve her çukura 100 µl ilave edildi. 37°C de 30 dakika inkube edildi. 3 kez yıkandı. Rabbit anti-equine IgG alkaline phosphatase konjugat (SIGMA A-6063), PBS:T20:BA buffer ile 1:750 oranında sulandırıldı ve her çukura 100 µl ilave edildi. 37°C de 1 saat inkube edildi. 3 kez yıkandı. Bir adet pNNP substrat tableti (SIGMA N2640), pH'sı 19N NaOH ile 10,4'e ayarlanan 0,1M glycine buffer, 1M MgCl<sub>2</sub>, 1mM ZnCl<sub>2</sub> çözeltisinde (7,51g glisin, 203mg MgCl<sub>2</sub>, 136mg ZnCl<sub>2</sub>, 980 ml deiyonize su) çözdürüldükten sonra her çukura 150 µl substrat solusyonu ilave edildi. Pleytler oda ısısında 30 dakika inkube edildi. Her çukura 150 µl stop solusyonu (3M NaOH) ilave edildi. ELISA okuyucusu (Organon Technica Microwell System) ile 405 nm dalga boyunda okundu. Negatif, pozitif ve test serumlarının ortalamaları hesaplandı. Negatif serum ortalamasının 2,5 katı ve daha yüksek değer veren serumlar pozitif olarak değerlendirildi.

İki serolojik testin istatistiksel analizi için T-test kullanıldı (19).

## Bulgular

1. **PHA testi bulguları:** 120 safkan kısrağın kan serumları ile yapılan PHA testi sonucunda; 58 (% 48,33) serum pozitif ve 62 (% 51,67) serum negatif olarak saptandı. 1997 Ekim-1998 Haziran ayları arasında incelenen 61 kısrağın 35'i seropozitif, 26' sı sero-negatif; 1998 Ekim-1999 Haziran ayları arasında incelenen 59 kısrağın 23' ü sero-pozitif, 36' sı sero-negatif olarak saptandı (Tablo 1).

Serumların 22'si 1/64, 27'si 1/128, 7'si 1/256 ve 2'si 1/512 titrede pozitiflik verdi.

	PHA testi		Toplam	%
	1997 Ekim-1998 Haziran	1998 Ekim-1999 Haziran		
Pozitif	35	23	58	48,33
Negatif	26	36	62	51,67

  

	ELISA		Toplam	%
	1997 Ekim-1998 Haziran	1998 Ekim-1999 Haziran		
Pozitif	32	20	52	43,33
Negatif	29	39	68	56,67

Tablo 1. Kısrağın serumlarının PHA testi ve ELISA sonuçları ve yüzdeleri

**2. ELISA bulguları:** 120 safkan kısrağın kan serumları ile yapılan ELISA sonucunda; 52 (%43,33) serum pozitif ve 68 (%56,67) serum negatif olarak saptandı. 1997 Ekim-1998 Haziran ayları arasında incelenen 61 kısrağın 32'si sero-pozitif, 29'u sero-negatif; 1998 Ekim-1999 Haziran ayları arasında incelenen 59 kısrağın 20'si sero-pozitif, 39'u sero-negatif olarak saptandı (Tablo 1).

Daha önceki çalışmada *T.equigenitalis* izole edilen iki kısrağın kan serumlarının da PHA ve ELISA ile pozitif olduğu belirlendi. PHA testinde bu kısraklardan birinin serumunda 1/128, diğerinin serumunda ise 1/64 titrede pozitiflik saptandı.

Kırkdört kısrağın serumu her iki testte de pozitif saptanırken, 14 serum sadece PHA testi ile, 8 serum sadece ELISA ile pozitif olarak saptandı (Tablo 2). PHA testi ile ELISA arasındaki % 8 farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Tablo 2. PHA testi ve ELISA 'da pozitiflik oranlarının karşılaştırması

Serum sayısı	PHA	ELISA
44	+	+
14	+	-
8	-	+

## Tartışma

CEM ilk kez 1977 yılında İngiltere'de saptandıktan sonra, kısrağın ve aygırların uluslararası transportu ile safkan at yetiştiriciliği yapılan diğer bir çok ülkeye hızla yayılmıştır (10,20,21). Ülkemizde at popülasyonunun önemli bir kısmını yarım atı yetiştiriciliği için kullanılan safkan atlar oluşturmaktadır ve her yıl safkan at yetiştiriciliği yapılan ülkelere kısrağın ve aygır ithali yapılmaktadır.

Endometritis ve infertiliteyle karakterize olan CEM'in kesin tanısının etken izolasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (7,9). Ancak 1998 yılına kadar yapılan izolasyon çalışmaları ile ülkemizde hastalığın varlığı saptanmamıştır. Ülkemizde CEM ile ilgili ilk araştırma Sevinç ve ark. (22) tarafından gerçekleştirilmiş, bunu diğer araştırmacıların (23,24,25,26) kısrağın ve aygırlardan *T.equigenitalis* izolasyonuna yönelik çalışmaları izlemiş, ancak *T.equigenitalis* izole edilmediği bildirilmiştir. Etken ilk kez 1998 yılında Özgür ve ark. (6) tarafından endometritis ya da infertilite sorunu olan 120 safkan kısrağa ait 81 intrauterin ve 39 klitoral fossa swab

örneklerinin bakteriyolojik incelemesi sonucunda, 2 kısrağın klitoral fossa swablarından izole edilmiştir. Bu çalışmada, genital swab örnekleri alınan kısraklardan aynı zamanda alınan kan serumları PHA testi ve ELISA yöntemleri ile incelendi. Her iki test sonucuna göre elde edilen pozitiflik oranları ülkemizde infeksiyonun seroprevalansının yüksek olduğunu ortaya çıkardı.

Kısıraklarda CEM'in serolojik tanısına yönelik ilk araştırma Benson ve ark. (11) tarafından SA testi ve AG testi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve araştırmacılar kısraklarda *T.equigenitalis* ile infeksiyonu takiben serolojik bir yanıt geliştiğini açıklamışlardır. Daha sonra Fernie ve ark. (13) formalinle fikze edilmiş hindi eritrositlerini kullanarak geliştirdikleri PHA testinin hızlı ve sensitif bir test olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar klinik metritisli ve sağlıklı kısraklardan alınan kan serumlarını PHA testi ile incelemişler, sağlıklı kısraklarda titrenin 1/64'den daha düşük, metritisli kısraklarda ise 1/256-1/4096 arasında olduğunu bildirmişler, 1/64 ve 1/128'lik titrelerin görünüşte sağlıklı kısraklarda subklinik bir infeksiyonun göstergesi olabileceğini belirtmişlerdir. Eguchi ve ark. (15) ise PHA testi için glutraldehidle fikze edilmiş at eritrositlerinin uygun olduğunu ve hiyaluronidaz ile muameleyi takiben *T.equigenitalis* 'in sonikasyonu ile elde edilen antijenin infekte kısrakları saptamada çok daha iyi sonuç verdiğini belirtmişler, sağlıklı kısraklardan elde edilen 156 serum örneğinin tümünün 1/64'ün altında, infekte kısrakların %92'sinde ise 1/64'ün üstünde titre verdiğini bildirmişlerdir. Eguchi ve ark. (17) PHA testini modifiye ederek yaptıkları bir çalışmada, doğal infeksiyona yakalanan 10 kısrağın 8'inin pozitif reaksiyon verdiğini, 3'ünden *T. equigenitalis* izole edildiğini ve bu 3 kısrağın kan serumlarının da pozitif olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar (15,17,27,28) testin sensitif, hızlı ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle saha taramalarında kullanılabileceğini ve salgın durumunda infeksiyonun özellikle erken dönemde saptanarak yayılmasının kontrol altına alınabileceğini vurgulamışlardır.

Kısıraklarda CEM'in ELISA ile serolojik tanısına yönelik sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır. Sahu ve ark. (14), *T.equigenitalis*'e karşı oluşan antikorların saptanması için uyguladıkları ELISA sonuçlarını lam aglutinasyon, tüp aglutinasyon ve AG testi ile karşılaştırmışlar, deneysel olarak infekte edilen 15 kısrağın serumundan 13'ünü ELISA ile pozitif olarak saptamışlar ve ELISA'nın diğer testlere oranla daha sensitif olduğunu belirtmişlerdir. Dolan ve

ark. (18), *T.equigenitalis* ile infekte olduğu bilinen aygırla çiftleştikten sonraki 12. günde alınan kan serumlarını ELISA ile inceledikleri 10 kısrağın serumundan 9'unda antikor saptadıklarını, aynı serum örneklerini komplement fiksasyon testi ile incelediklerinde 7'sinin pozitif olduğunu belirlemişler ve ELISA'nın daha sensitif olduğunu belirtmişlerdir. Sahu ve ark. (28), değişik miktarlarda *T.equigenitalis* ile infekte ettikleri kısrağların humoral immun yanıtlarını değişik serolojik yöntemlerle araştırmışlar ve bu yanıtın verilen miktar ile direkt ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar safkan kısrağların çoğunda agar jel immunodiffüzyon testi dışında tüm serolojik testlerin özellikle infeksiyonun akut dönemi süresince oluşan antikorları saptadığını, ancak infekte kısrağları saptamada ELISA ve PHA testlerinin diğer yöntemlere oranla daha üstün olduğunu saptamışlardır.

Bu araştırmada, Özgür ve ark. (6) tarafından yapılan çalışmada bakteriyolojik olarak incelenmiş olan 120 safkan kısrağın alınan serumların 58 (%48,33)' inde PHA testi ile, 52 (%43,33)' sinde ELISA ile pozitiflik saptandı. Bakteriyolojik olarak CEM saptanmış olan iki kısrağın serumlarının da PHA testi ve ELISA ile pozitif olduğu belirlendi. PHA testi ile, bu kısrağlardan birinin serumu 1/64, diğerininki 1/128 titrede pozitiflik verdi. Ancak bakteriyolojik olarak *T.equigenitalis*'in izole

edilmediği kısrağlardan 50'sinin ELISA, 56'sının PHA testi ile pozitif sonuç vermesinin önemli bir nedeni, diğer araştırmacıların da (29,30) bildirdiği gibi genital sistemdeki kontaminant bakterilerin *T.equigenitalis*'in üremesini önlediği düşüncesidir.

Endometritisli ya da infertilite sorunu olan kısrağların CEM yönünden PHA testi ve ELISA ile incelendiği bu araştırmada, elde edilen pozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmasa da PHA testi ile saptanan pozitif kısrağ sayısı ELISA' ya göre daha fazladır. Bunun yanısıra ELISA ile yapılan çalışmaların (14,18,28), deneysel koşullarda oluşturulan infeksiyonun serolojik tanısına yönelik olduğu görülmektedir. ELISA'nın doğal koşullarda oluşan infeksiyonun tanısında kullanılabilmesine dair herhangi bir literatüre rastlanılmadığı için bu konudaki araştırmaların yoğunlaştırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak her iki testle elde edilen pozitiflik oranları, safkan kısrağlarda infeksiyonun seroprevalansının yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak PHA testi kolay uygulanabilir olması, 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi, sonuçların gözle değerlendirilebilmesi gibi üstünlükleri nedeniyle her yıl aşım sezonu öncesi rutin taramalarda öncelikle tercih edilmesi gereken test olmalıdır.

## Kaynaklar

1. Brewer, R.A.: Contagious equine metritis: A review/Summary. Vet. Bull.1983; 53(10):881-891.
2. Eaglesome, M.D., Garcia, M.M.: Contagious equine metritis: A review. Can. Vet. J. 1979; 20: 201-206.
3. Swann, A.I.: Contagious equine metritis. Auburn Veterinarian.1978; 84-86.
4. Crowhurst, R.C.: Genital infection in mares. Vet. Rec.1977; 100: 476.
5. Timoney, P.J., Ward, J., Kelly, P.: A contagious genital infection of mares. Vet. Rec. 1977; 101:103.
6. Ozgur, N.Y., İkiz, S., Carioglu, B., Kilicarslan, R., Yılmaz, H., Akay, O., Ilgaz, A.: Contagious equine metritis in Turkey: First isolation of *Taylorella equigenitalis* from mares. Vet. Rec. Baskıda.
7. Kamada, M., Oda, T., Ohishi, H., Wada, R., Fukunaga, Y., Kumanomido, T.: Studies on contagious equine metritis III. Evaluation of media for isolation, subculture and storage of *Haemophilus equigenitalis*. Bull. Equine Res. Inst. 1983; 20: 126-132.
8. Timoney, P.J.: Contagious equine metritis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1996; 19 (3): 199-204.
9. Frank, C.J., David, J.S.E., Smith, H.: Code of practice for the control of CEM and other equine venereal diseases for the 1980 covering season. Vet. Rec. 1979; 105(17): 395-397.
10. Swerczek, T.W.: The first occurrence of contagious equine metritis in the United States. JAVMA. 1978; 173(4): 405-407.
11. Benson, J.A., Dawson, F.L.M., Durrant, D.S., Edwards, P.T., Powell, D.G.: Serological response in mares affected by contagious equine metritis 1977. Vet. Rec. 1978; 102: 277-280.
12. Croxton-Smith, P., Benson, J.A., Dawson, F.L.M., Powell,D.G.: A complement fixation test for antibody to the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 1978; 103: 275.
13. Fernie, D.S., Cayzer, I., Chalmers, S.R.: A passive haemagglutination test for the detection of antibodies to the contagious equine metritis. Vet. Rec. 1979; 104: 260-262.
14. Sahu, S.P., Hamdy, F.M., Dardiri, A.H.: Contagious equine metritis: Development of enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody to contagious equine metritis organism. Proc. Annu. Meet. US. Anim. Health. Assoc. 1979; 83: 243-252
15. Eguchi, M., Kuniyasu, C, Kishima, M.: Passive hemagglutination test for detection of antibodies against *Taylorella (Haemophilus) equigenitalis* in sera of mares. Vet. Microbiol. 1988; 18: 155-161

16. Cho, H.J., Ruhnke, H.L., Langford, E.V.: The indirect hemagglutination test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with mycoplasmas. *Can. J. Comp. Med.* 1976; 40: 20-29.
17. Eguchi, M., Kamada, M., Tsukuda, S., Nishimori, K., Anzai, T., Kuniyasu, C.: Use of the modified passive haemagglutination test for detection of *Taylorella equigenitalis*-infected mares. *Equine Infectious Diseases VII. Proceedings of the Seventh International Conference. Tokyo, 8<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> June 1994*; 207-210.
18. Dolan, M., Cargill, C., Martin, F., Davenport, P., Franks, D., Lightfoot, J.: Serological and bacteriological survey of three horse studs for Contagious equine metritis. *Aust. Vet. J.* 1984; 61(1): 17-19.
19. Evrim, M., Güneş, H.: Biyometri. İ.Ü. Vet. Fak. Yay. Ders Notu. 1994; No: 41, 33-34.
20. Day, F.T., Crowhurst, R.C., Simpson, D.J., Greenwood, R.E.S., Ellis, D.R., Eaton-Evans, W. : An outbreak of contagious equine metritis in 1977 and its effect the following season. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1979; 27: 351-354.
21. Powell, D.G.: Contagious equine metritis. *Equine Vet. J.* 1978; 10(1): 1-4.
22. Sevinç, A., İstanbulluoğlu, E., Yurdaydın, N., Çelebi, M.: Çifteler Arap aygırlarının spermatolojik özellikleri, spermalarındaki bakteriyel flora ve dölverimleri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Derg.* 1984; 8: 288-293.
23. Yurdaydın, N., Erdeğer, J., Tekin, N., Daşkın, A., Keskin, O., Klug, E.: Atlarda infertiliteye neden olan mikrofloranın saptanması. *Etlük Vet. Mikrob. Derg.* 1992; 7(2): 93-107.
24. Özgür, N.Y., Ilgaz, A., Yılmaz, H., Kılıçarslan, R.: İnfertilite sorunu olan kısırakların vajinal akıntılarının mikrobiyolojik incelemesi. *İ.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1994; 20 (2-3): 341-345.
25. Ak, S., Hasöksüz, M., Horoz, H., Kılıçarslan, R., Ak, K., Minbay, A., İleri, İ.K.: İnfertilite problemi olan kısıraklarda uterus ve aygırlarda sperma mikroflorasını incelenmesi. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.* 1995; 25: 149-154.
26. Ülgen, M., Seyrek-İntaş, K., Kocabıyık, L., Uzman, M.: İnfertilite problemi olan atlarda bakteriyolojik incelemeler. III. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Bursa, 23-25 Eylül 1998, Kongre Özet Kitabı, 160.
27. Rogerson, B.A., Condron, R.C., Baker, J., Craven, A.: Experimental infection of mares with *Haemophilus equigenitalis*. *Aust. Vet. J.*, 1984; 61(12): 392-395
28. Sahu, S.P., Rommel, F.A., Fales, W.H., Hamdy, F.M., Swerczek, T.W., Younquist, R.S., Bryans, J.T.: Evaluation of various serotests to detect antibodies in ponies and horse infected with contagious equine metritis bacteria. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44(8): 1405-1409.
29. Kikuchi, N., Tsunoda, N., Kawakami, Y., Murase, N., Kawata, K.: An outbreak of contagious equine metritis in Japan: Isolation of *Haemophilus equigenitalis* from thoroughbred mares with genital infection in Hokkaido. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1982; 44: 107-114.
30. Kamada, M., Akiyama, Y., Oda, T., Fukuzawa, Y.: Contagious equine metritis: Isolation of *Haemophilus equigenitalis* from horses with endometritis in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1981; 43: 565-568.