

İNEKLERDEKİ KİMİ İNFERTİLİTE OLGULARI İLE ANTİ-SPERMA AGLUTİNİNLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİLER ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Hazım GÖKÇEN*
Ahmet MİNBAŞ**
Erol ÇEKĞÜL***
Tayfun ÇARLI****

ÖZET

Boğa spermasına karşı agglutinin'lerin varlığı jelatin spermagglutinasyon testi ile saptandı. Çalışmada Karacabey Tarım İşletmesindeki donmuş sperma laboratuvarı boğaları ve işletmenin inekleri materyal olarak kullanıldı.

Spermagglutinasyon testinde antijen olarak taze ve donmuş spermalardan hazırlanan, 50×10^6 spermatozoon/ml konsantrasyona ayarlanmış sperma solusyonun eşit miktarda % 5 jelatinli tuzlu su karışımı kullanıldı ($20-30 \times 10^6$ spermatozoon/ml) Spermagglutinin'ler, boğa kan serumu, boğa seminal plazması; düve, gebe inek ve kısır ineklerin kan serumları ve servikal mukus'larında arandı. Test için önce, plastik hemagglutinasyon kaplarındaki çukurlara antikor içeren materyalin % 2.5 jelatinli tuzlu suda iki katlı sulandırılması yapıldı. Sonra serum sulandırılmalarında 50 mikrolitre ayrı bir çukura alındı ve üzerine 50 mikrolitre sperma antijeni ilave edilerek karıştırıldı. Karışım bir kapillar pipete emdirildikten sonra cam macuna batırılıp oda derecesinde iki saat inkube edildi. Kapillar tüpte flakulasyon oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Antisperma agglutinin'leri boğa seminal plazmasında 0-1 : 4; boğa kan serumunda 0-1 : 8; gebe inek kan serumunda 0-1 : 2; düve kan serumunda 0-1 : 4 ve kısır ineklerde 1 : 8-1 : 32 arası titrelerde bulundu. Kontrol tüplerde reaksiyon görülmedi. Servikal mukus viskozitesi giderilemediğinden spermagglutinasyon testleri yapılmadı.

Kısır ve dönen ineklerin kan serumlarında yüksek titrede spermagglutininlerinin saptanması, kimi kısırılık olgularında spermagglutinin'lerinin etkisi olabileceği kanısını vermektedir.

* Doç. Dr.; Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa.

** Prof. Dr.; Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa.

*** Uzm. Veteriner Hekim; Karacabey Tarım İşletmesi, Bursa.

**** Araş. Gör.; Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Bursa.

SUMMARY

Studies on The Relationship Between Presence of Anti-Sperm Agglutinins and Some Cases of Infertility

Presence of high titer agglutinins in some infertile cow serums against bull sperm were determined by spermagglutination test. Fresh and/or frozen semen was diluted a concentration of 50×10^6 spermatozoa/ml in physiologic saline. An equal volume of semen solution and 5 % gelatin solution in physiologic saline was mixed to prepare antigen. Blood serum and seminal plasma of bulls and blood serums obtained from heifers, pregnant cows and infertile cows and some cervical mukus of cows were used as agglutinin sources. For the test double dilution of the serum samples were made in physiologic saline containing 2.5 % gelatin. In plastic hemagglutination wells 50 microlitre of each serum dilution was placed in a clean well and equal volume of sperm antigen ($20-30 \times 10^6$ spermatozoa/ml) was added to each well and the contents mixed gently. The mixture in each well was allowed to rise and fill into the capillary tube. The tubes are placed upright in clay and are incubated at room temperature. Results were recorded at 2 hours. The appearance of white floccules along with clearing of the suspending medium was evaluated as pozitif reaction. The lowest anti-sperm agglutinins were determined in blood serum of pregnant cows and heifers. Agglutinins were detected in some blood serums of bulls and cows. Increased titers of agglutinins (1: 32) were found in infertile cows. Presence of high titer of spermagglutinins in most of infertile cows might be an explanation of some cases of infertility in cows.

GİRİŞ

Hayvanlarda en önemli verim dölvimidir. Ekonomik değeri olan et, süt, yağı gibi verimlerin sürekliliği ancak dölviminin üstünlüğü ve devamlılığı ile gerçekleşebilir. Dölvrimi düşüklüğü (infertilite) hayvancılık işletmelerinde verimi dolayısıyla geliri azaltıcı önemli sorunlardan biridir.

İneklerde infertilite nedenleri çok çeşitlidir. Bunlar arasında herediter, işlevsel (anöstrus, suböstrus, kalıcı corpus luteum, luteal ve folliküler kistler v.b.), enfeksiyöz hastalıklar, bakım ve beslenme bozuklukları gibi nedenler sayılabilir^{1.2}. Günümüzde yukarıda sayılan bu nedenlerin bulunmadığı durumlarda bile yapılan çok sayıda tohumlamaya rağmen kimi ineklerde gebe kalamama (repeat breeder) olgularının görülmesi dikkat çekicidir³.

Son yıllarda yukarıda belirtilen nedenlere bağlı olmayan infertilite olguları immun tepkiler yönünden incelenmekte^{5.6.7} ve geliştirilen tekniklerle boğaların kan serumu ve seminal plazmalarında otoantikörlerin varlığı⁸, ineklerin kan serumu ve servikal mukus'unda spermatozoon'ları aglutine edici faktörlerin saptandığı bildirilmektedir^{9.10.11.12}.

Spermatozoon'ların antijenik özellikleri ve spesifik antikörlerin oluşmasına neden oldukları bilinmektedir^{13.14.15}. Reprodüktif sistem hücrelerinin antijenik uyarımları ile oluşan otoantikör ve isoantikörler ile insan ve hayvanlarda görülen infertilite olguları arasındaki ilişki üzerinde durulmaktadır.^{16.17.18} İnsan ve hayvanlarda infertiliteye yol açabilecek oto-immunizasyon ve iso-immunizasyon oluşmasında sperma seminal plazması ve diğer yapılar antijenik uyarıma neden olabilmektedir^{15.18.19.20}.

Sperma çeşitli komponentlerden oluşan kompleks bir antijenik yapıya sahiptir²⁰. Spermatozoon'lar ve seminal plazmada bulunan antijenik maddeler bireylerde immun sistemin gelişmesinden ve toleransın oluşmasından sonraki dönemde şekillendiklerinden bu maddeler vücut için yabancı madde özelliği taşımaktadır^{13,15,20,21}.

Spermatozoonlar oluştukları andan ejakülasyona kadar normal koşullarda kan dolaşımından uzak tutulurlar. Kan ve testisler arasındaki doğal yapısal engeller sperma antijenlerinin immun sistemi uyarmasına olanak vermez. Ancak bu doğal engellerle oluşan ciddi zedelenmeler sonucu sperma antijenlerinin immun sistemi uyarılması ve otoimmunizasyon gerçekleşmektedir^{19,21}.

Sperma antikollarının saptanmasında uygulanan serolojik testlerin temelini aglutinasyon yöntemi oluşturmaktadır. Franklin ve Dukes uyguladıkları tüp aglutinasyon testinde serum sulandırılmalarına sperm ilave ederek 37°C'de 1-2 saat inkubasyon sonunda tüp dibinde aldıkları bir damla karışımı lam üzerinde incelemişler ve aglutinasyon saptamışlardır²². Jelatin aglutinasyon testini geliştiren Kibrick ve arkadaşları, spermatozoonları % 5 jelatin içeren bufferli tuzlu suda antijen olarak hazırlamışlar ve eşit miktarda serum sulandırmaları ile sperma antijenini kapillar tüplerde birleştirerek spermatozoonların flokulasyonunu makroskopik olarak gözleme olanağını bulmuşlardır²³. Daha sonraları geliştirilen Tray aglutinasyon testi²⁴ ve sperm immobilizasyon yöntemleri²⁵ çeşitli araştırmalarda kullanılmıştır.

Hayvanlarda infertilite olgularının immunolojik yönden incelenmelerine deneysel çalışmalarla başlanmıştır. Düveler üzerinde yapılan bir çalışmada araştırmacılar homolog antisperma serumu ile karıştırılan sperma ile sun'i tohumlama uygulanan düvelerin gebe kalmadıklarını ortaya koymuşlardır²⁶. İnek ve tavşanlar üzerinde yapılan bir araştırmada Menge ve arkadaşları serum ve vaginal mukusta antisperm agglutinin titrelerini jelatin agglutination yöntemi ile saptamışlar ve ineklerde tohumlamadan önce antisperma serum ile spermaların karıştırılmasının fertilizasyonu engellediğini bildirmişlerdir¹¹. Diğer deneysel çalışmalarda sperma ve testis materyali ile iso-immunize edilen ineklerde infertilite oluşturulduğu¹⁶, sperma ve embriyo materyali ile iso-immunize edilen düvelerde erken embriyonik ölümlerin meydana geldiği ortaya konulmuştur¹⁷. Griffin ve arkadaşları, sperma sulandırılmasında kullanılan yumurta sarısına karşı oluşan antikolların ineklerin vagina, uterus ve kan serumlarında saptandığını bildirmişler ve yüksek antikor titresi görülen ineklerde fertilitte oranının düştüğünü ileri sürmüşlerdir²⁷. Spermaya karşı oto-aglutininler boğa kan serumunda da saptanmıştır. Araştırmacılar fertilitte yönünden oto-aglutinin bulunan boğalarla oto-aglutinin saptanmayan boğalar arasında fark bulunmadığını bildirmişlerdir²⁸.

Araştırmalar servikal mukusun spermaglutination aktivitesi gösterdiğini ortaya koymaktadır. İnfertil ineklerin servikal mukusu ile yapılan bir çalışmada santrifüj ile mukustan ayrılan materyalde sperma aglutine aktivasyonunun daha fazla olduğu saptanmıştır²⁹.

Karacabey Tarım İşletmesi Donmuş Sperma Laboratuvarında yürütülen bu çalışmada Jelatin Spermaglutinasyon Tekniği uygulanarak boğaların kan serumu ve seminal plazmasında oto-antikolların ve ineklerin kan serumu ile servikal mukus'unda iso-antikolların saptanması ve iso-antikollarla kimi infertilite olguları arasındaki ilişkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada Karacabey Tarım İşletmesi Donmuş Sperma Laboratuvarı boğalarının taze ve dondurulmuş spermaları ile işletmede yetiştirilen ineklerin kan serum ve servikal mukusları kullanıldı. Boğalardan sperma ya taze olarak sun'i vajenle alındı ya da sperma numunesi olarak payetlerde dondurulmuş sperma kullanıldı. Servikal mukus ise kateterle servix'ten alındı.

Repeat Breeder ineklerin seçiminde genellikle Tarım İşletmesinde yapılan sun'i tohumlamalardan 5-6 kez dönmeleri ve rektal muayenede fertiliteye engel herhangi bir bozuklukları bulunmaması dikkate alındı. Gebe ineklerin seçiminde ise rektal muayene ile gebelik kontrolü yapıldı ve gebe olan ineklerden yeterli sayıda araştırmaya alındı. Düveler yaşlarına göre hiç sıfat almamışlar arasından seçildi. Otoantikorlar taze sperma alınan boğaların sperma plazması ve kan serumlarında saptandı.

Oto ve isoantikor saptanmasında jelatin spermaglutinasyon testi kapillar tüplerde uygulandı²⁸. Boğaların taze veya dondurulmuş spermalarından hazırlanan 50×10^6 spermatozoon/ml konsantrasyona ayarlanmış sperma solusyonu eşit miktarda % 50 jelatinli tuzlu su ile karıştırılarak test antijeni hazırlandı ($20-30 \times 10^6$ spermatozoon/ml). Boğa kan serum ve seminal plazması, inek kan serum ve servikal mukusu oto ve iso-aglutinin materyalini oluşturdu.

Jelatin Spermaglutinasyon Testinde plastik hemaglutinasyon kaplarındaki çukurlarda önce test materyalinin % 2.5 jelatinli tuzlu suda iki katlı sulandırılması yapıldı. Her bir sulandırmadan 50 mikrolitre test çukurlarına aktarıldı. Her bir sulandırma üzerine 50 mikrolitre sperma antijeni ilave edildi ve karıştırıldı. Karışım bir kapillar pipete emdirildikten sonra pipetler cam macuna dikine batırıldı. Oda derecesinde iki saat inkubasyondan sonra reaksiyon okundu. Kapillar tüplerde flakulasyon oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Dokuz boğa kan serumu ve seminal plazmalarında kendi spermatozoonlarına karşı aglutinin varlığının incelenmesinde üç boğa kan serum spermaglutinasyon titreleri 1: 2, 1: 8 ve 1: 8 bulundu. İncelenen seminal plazmaların beşinde oto-aglutinin'ler saptandı. Seminal plazma sperm aglutinin titreleri dört boğada 1: 2, bir boğada 1: 4 hesaplandı. Kontrol testlerde reaksiyon görülmedi (Tablo: I).

Toplam 32 inek kan serumu iso-aglutinin yönünden incelendi. Beş düve, beş doğum yapmış henüz tohumlanmamış inek, onbir gebe inek ve onbir infertil inek kan serum iso-aglutinin titreleri Tablo II ve Tablo III'de özetlenmiştir. Tablolardan da görüleceği gibi, beş düveden dördünde titreler 1: 2-1: 4 arasında bulundu. Bir düve kan serumunda reaksiyon görülmedi. Doğum yapmış inek kan serumlarında benzeri düşük titreler görüldü. Gebe ineklerin beşinde iso-aglutinasyon görülmedi, dördünde 1: 2, bir inekte 1: 8 titre hesaplandı. İnfertil onbir ineğin kan serum iso-aglutinin titrelerin en düşük 1: 4 ve en yüksek 1: 32 hesaplandı. Değişik sperm antijenlerle tekrarlanan testlerle de sperm-aglutinin titreleri yüksek bulundu.

Tablo: I
Boğaların Kan Şerumu ve Seminal Plazmasında Kendi Spermatozoon'larına Karşı Oto-Aglutinin'lerin Varlığı

BOĞA NO:	SPERMAGLUTİNASYON TİTRELERİ		
	KAN SERUMU	SEMİNAL PLAZMA	KONTROL*
624	1 : 2	1 : 2	—
169	—**	1 : 2	—
769	—	1 : 2	—
435	1 : 8	—	—
880	—	—	—
733	—	—	—
738	1 : 8	—	—
605	—	1 : 2	—
684	—	1 : 4	—

* % 2.5 Jelatinli Tuzlu Su + Sperma Antijeni

** (—): Reaksiyon görülmedi.

Tablo: II
Düve, Doğum Yapmış ve Gebe İnek Kan Serumlarında Boğa Spermatozoon'larına Karşı İso-Aglutinin'lerin Varlığı

İNEKLER NO:	BOĞALAR NO:	İSOAGLUTİNASYON TİTRELERİ					
		1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
640/85 (D)	435/84	+	—	—	—	—	—
642/85 (D)	733/84	—	—	—	—	—	—
627/85 (D)	010/73	+	+	—	—	—	—
672/85 (D)	010/73	+	+	—	—	—	—
692/85 (D)	435/84	+	—	—	—	—	—
431/84 (DY)	435/84	+	+	—	—	—	—
592/83 (DY)	733/84	+	—	—	—	—	—
450/84 (DY)	435/84	+	+	+	—	—	—
12/86 (DY)	435/84	—	—	—	—	—	—
231/82 (DY)	733/84	+	—	—	—	—	—
91/80 (G)	435/84	+	—	—	—	—	—
341/77 (G)	435/84	+	—	—	—	—	—
506/83 (G)	733/84	+	—	—	—	—	—
86/83 (G)	109/85	+	+	+	—	—	—
459/79 (G)	109/85	—	—	—	—	—	—
289/83 (G)	109/85	—	—	—	—	—	—
178/81 (G)	603/81	—	—	—	—	—	—
69/79 (G)	435/84	—	—	—	—	—	—
474/79 (G)	603/81	—	—	—	—	—	—
370/79 (G)	58/83	+	—	—	—	—	—
399/78 (G)	58/83	+	—	—	—	—	—

+ Pozitif reaksiyon
— Reaksiyon görülmedi.

D Düve

DY Doğum yapmış inek

G Gebe

Tablo: III
İneklerin Kan Serumlarında İso - Aglutinin'lerin Varlığı

İNEK NO:	BOĞA NO:	İSO - AGLUTİNİN TİTRELERİ					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
636/74*	614/81	+	+	+	—	—	—
734/77*	614/81	+	+	+	—	—	—
482/84**	58/83	+	+	+	—	—	—
445/78**	58/83	+	+	+	+	+	—
474/84	738/84	+	+	+	—	—	—
554/84	605/84	+	+	+	+	+	—
421/84	684/84	+	+	+	+	—	—
265/84	738/84	+	+	+	—	—	—
204/82	684/84	+	+	—	—	—	—
530/84	010/84	+	+	—	—	—	—
278/77	010/84	+	+	+	—	—	—

* 605/81 No. lu boğa sperm antijeni ile aynı titre verdi.

** Değişik 5 boğa sperm antijeni ile benzer titre verdi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

İneklerde başkaca bir nedeni saptanamayan infertilite olgularında immunolojik reaksiyonların etkili olduğu insan ve hayvanlarda yapılmış çalışmalarla ortaya konmuştur^{14.15.16.19.21.29}. İneklerden başarılı bir dölverimi alınabilmesinin koşulu her ikisi de canlı ve fertil olan spermatozoon'la ovum'un uygun yer ve koşullarda birleşmesi yani başarılı bir fertilizasyondur. Spermanın immun sistemi uyarması sonucu oluşan humoral ve hücresele immun tepki, spermatozoon'ların immobilize olması, servikal kanaldan geçişinin ve ovum membranına tutunmasının engellenmesi suretiyle oluşmakta¹⁹ ve fertilizasyon sonrası embriyo ölümlerine neden olmaktadır¹⁷.

İmmunolojik çalışmalarda infertil kadınların ve ineklerin kan serumlarında spermatozoon'ları aglutine edici faktörlerin varlığı saptanmıştır^{23.24.26.29}. Yapılan çalışmalarda oto-aglutinin'lerin varlığı kimi boğalarda saptanmış, kimi boğalarda da görülmemiştir. Araştırmacılar boğalarda saptanan oto-aglutinin'lerin dölverimini etkilemediği görüşündedir⁸. İnfertil erkekler üzerinde yapılan çalışmalarda 1:32'yi geçen oto-aglutinin düzeyinin fertilite yönünden önemli olduğu belirtilmektedir¹⁹.

Araştırmamızda boğa kan serumu ve seminal plazmasında genellikle oto-aglutinin saptanmadı. Birkaç örnekte çok düşük düzeyde oto-aglutinin görüldü. Kanımızca da boğalardaki oto-aglutinin'ler fertilite yönünden büyük bir önem taşımaktadır. Ancak Lord ve arkadaşları¹⁵'nin insan seminal plazmasında immunosuppressive bir komponentin saptandığını bildirmeleri, boğaların spermalarının da bu yönden incelenerek değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

Düvelerde ve gebe ineklerde iso-aglutinin'lerin saptanmaması veya çok düşük düzeylerde bulunmalarına karşın, repeat breeder olgularında iso-aglutinin titrelerinin (1:32) yüksek bulunması dikkati çekicidir.

Sonuç olarak ineklerde kimi infertilite olgularında immun tepkilerin rolü olabileceği kanısına varılmıştır. Belli infertilite nedenlerine bağlı olmayan gebe kalma (repeat breeder) durumlarında bu özelliğin dikkate alınması pratik önlenmelerle sorunun çözümü gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. MORROW, A.D. (1980): *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
2. GÖKÇEN, H., MINBAY, A. ve E. ÇEKGÜL (1986): Karacabey Harası Sun'ı Tohumlama Boğalarında Klinik, Spermatolojik ve Bakteriyolojik Araştırmalar. U.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 4 (1-2-3): 53-62.
3. ARDA, M., MINBAY, A. ve N. AYDIN (1982): Özel Mikrobiyoloji. Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar. A.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları: 386, Ders Kitabı: 284. A.Ü. Basımevi, Ankara.
4. GRUNERT, E. und M. BERCHTOLD (1982): *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind*. Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg.
5. FRANK, T., K.L. ANDERSON, P.R. SMITH, H.L. WHITMORE and B.K. GUSTAFSSON (1983): Phagocytosis in the uterus: A review *Theriogenology* 20 (1): 103-110.
6. GRIFFIN, J.F.T., W.R. HUN and P.J. HARTIGAN (1971): An immune response to egg-yolk semen diluent in dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 25: 193-199.
7. KIDDY, C.A., W.H. STONE, W.J. TYLER and L.E. CASIDE (1959): Immunological studies on fertility and sterility. III. Effect of iso-immunization with blood and semen on fertility in cattle. *J. Dairy Sci.*, 42: 110.
8. PURSWELL, B.J., A.B. CAUDLE, D.J. WILLAMS and J. BROWN (1983): Spermaglutinins in serum and seminal fluid of bulls and their relationship to fertility classification. *Theriogenology*, 20 (4): 375-381.
9. MENGE, A.C. (1967): Induced infertility in cattle by iso-immunization with semen and testis. *J. Reprod. Fert.*, 13: 445-456.
10. MENGE, A.C. (1968): Harly embryo mortality in heifers iso-immunized with semen and conceptus. *J. Reprod. Fert.*, 18: 67-74.
11. MENGE, A.C. and S. JAN. BEHRMAN (1980): Immunologic problems of infertility. (*Gynecology Endocrinology*: Jay J. Gold ve J.B. Josimovich. Harper and Row).
12. SATO, M.T.E., T. IZUMI and A. IRITANI (1982): Sperm agglutinating factors in the cervical mucus of an infertile cow. *Jap. J. Animal Reprod.* 28 (1): 16-19.
13. CARPENTER, P.L. (1975): *Immunology and Serology*. W.B. Saunders Company. Third Edition.
14. LI, T.S. (1974): *Sperm Immunology. Infertility and fertility Control*. Obst. et Gynecol. 44: 607.
15. LORD, E.M., SENSABAUGH, G.F. and D.P. STITES (1977): Immunosuppressive activity of human seminal plasma I. Inhibition of in-vitro lymphocyte activation. *Journal of Immunology*. 118 (5): 1704-1711.

16. MENGE, A.C. (1967): Induced infertility in Cattle by iso-immunization with semen and testis. *J. Reprod. Fert.*, 13: 445-456.
17. MENGE, A.C. (1968): Early embryo mortality in heifers iso-immunized with semen and conception. *J. Reprod. Fert.*, 18: 67-74.
18. MENGE, A.C., STONES, W.H., TYLER: W.J. and CASIDA, L.E. (1962): Immunological studies and fertility and sterility. IV. Fertility of cattle and rabbits inseminated with semen treated with antibodies produced against semen, spermatozoa and erythrocytes. *J. Reprod. Fert.*, 3: 331.
19. MENGE, A.C. and BEHRMAN, J.: Immunologic problems of infertility (Alınıştir). Quinlivan, W.L.G., Sullivan, H. (1977): The immunologic effects of human semen on donor spermatozoa during mixed insemination. *Fertility and sterility*. 28: 448.
20. SHULMAN, S. and HEKMAN, A. (1971): Antibodies to spermatozoa. I.A. new macroscopic agglutination technic for their detection, using motil sperm. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 137-146.
21. ROSE, N.R., HJORT, T., RUMKE, P., HARPER M.J.K. and O. VYAZOV (1976): Techniques for detection of iso and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clin. Exp. Immunol.* 23: 175-199.
22. FRANKLIN, R.R. and DUKES, C.D. (1964): Further studies on sperm agglutinating antibody and unexplained infertility. *JAMA.* 190: 682.
23. KIBRICK, S., BELDING, D.L. and MERRIL, B. (1952): Methods for the detection of antibodies against mammalian spermatozoa. II. A gelatin agglutination test. *Fert. and ster.* 3: 430.
24. FRIBERG, J. (1974): Clinical and immunological studies on sperm agglutinating antibodies in serum and seminal fluid. *Acta obstet. Gynecol scand.* 36: 1.
25. ISOJIMA, TSUCHIYE, K., KOYAMA, K., TANAKA, O. and ADACHI, H. (1972): Further studies on sperm-immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 112: 199.
26. KIDDY, C.A., STONE, W.H., TYLER, W.J. and CASIDA, L.E. (1959): Immunological studies on fertility and sterility. III. Effect of iso-immunization with blood and semen on fertility in cattle. *J. Dairy Sci.*, 42: 110.
27. GRIFFIN, J.F.T., NUNN, W.R. and P.J. HARTIGAN (1971): An immune response to egg yolk semen diluent in dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 25: 193-199.
28. PURSWELL, B.J., CAUDLE, P.B., WILLIAMS, D.J. and J. ROWN (1983): Spermagglutinins in serum and seminal fluid of bulls and their relationship to fertility classification. *Theriogenology*, 20 (4): 375-381.
29. TAKASHI, M., SATO, E., IZUMI, T. and A. IRITANI (1982): Sperm agglutinating factors in the servical mucus of an infertile cow. *Japanese J. of Animal Reproduction.* 28 (1): 16-19.