



دانشگاه تبریز

دانشکده دامپزشکی

گروه علوم درمانگاهی

پایان نامه

جهت دریافت مدرک دکترای حرفه‌ای دامپزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی فراوانی سقط جنین‌های بروسلاهی در گوسفنداری‌های اطراف تبریز با روش‌های PCR و ELISA

استاد راهنما

دکتر حسین حملی

اساتید مشاور

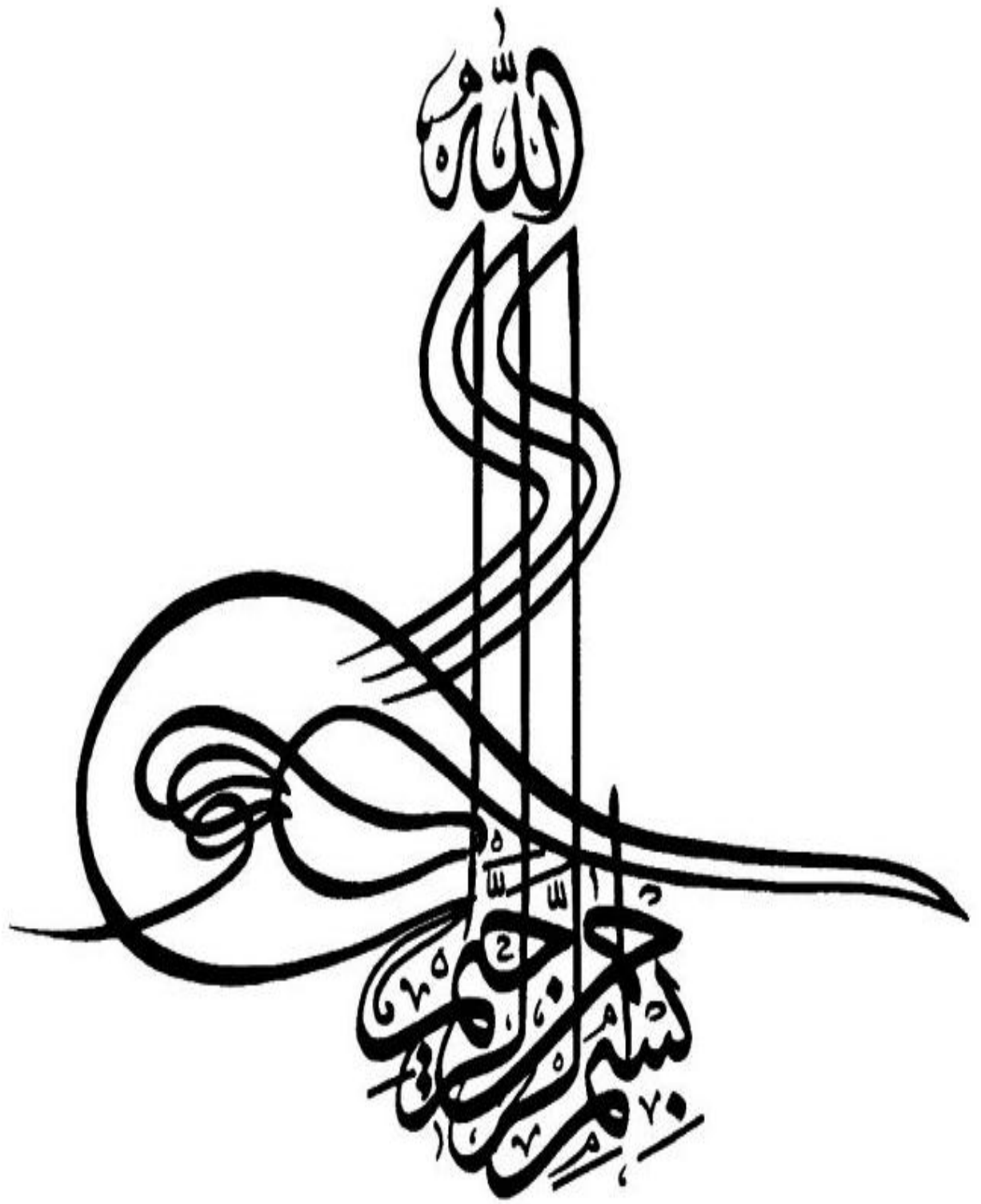
دکتر رضی‌اله جعفری جوزانی

دکتر کتایون نفوذی

پژوهشگر:

مهیار صابری حسن‌آبادی

زمستان ۱۳۹۰



نام خانوادگی دانشجو: صابری حسن نام: مهیار ابادی
عنوان پایان نامه: بررسی فراوانی سقط جنین های بروسلائی در گوسفنداری های اطراف تبریز با روشهای ELISA و PCR
استاد راهنما: دکتر حسین حملی اساتید مشاور: دکتر رضی اله جعفری جوزانی - دکتر کتایون نفوذی
مقطع تحصیلی: دکترای حرفه ای رشته: دامپزشکی دانشگاه: تبریز دانشکده: دامپزشکی تاریخ فارغ التحصیلی: صفحات: ۹۵
کلید واژه: بروسلوز، میش، سقط جنین، ELISA، PCR

حال که به لطف خداوند منان این پایان نامه به پایان رسیده است بر خود واجب

می دانم از زحمات و تلاشهای دلسوزانه

استاد راهنمای بزرگوار جناب آقای دکتر حسین حملی که همواره

در دوران تحصیل از راهنمایی های ایشان بهره جسته ام و از حسن

کردارشان درس انسانیت و اخلاق گرفته ام.

اساتید مشاور عزیز جناب آقای دکتر رضی اله جعفری جوزانی و

سرکار خانم دکتر کتایون نفوذی که تلمذ در محضر ایشان را مایه

افتخار و مباهات خویش دانسته و همواره از حسن خلق و غنای علمی

که توأم با خضوع و خشوع مثال زدنی می باشد بهره مند شده ام.

استاد گرانمایه جناب آقای دکتر رضا اسدپور که با روی گشاده ضمن

پذیرفتن داوری این پایان نامه، از تجربیات و دانش خود مرا بهره مند

کردند و در پربارتر شدن این مجموعه مرا یاری فرمودند.

اگر در این ناخیز عظمتی هست

تقدیم به از خودگذشتگی های پدرم

که تا ابد و امدار محبت های بی دریغش خواهم ماند

به نگاه پر مهر و امید مادرم

که سفره عشق را کستراند تا غنچه هایش بر سفره به گل بشینند.

و برادران همیشه حامیم مهندس محمد و استاد مهدی

ویگانه خواهر عزیزم دکتر مریم

چکیده:

بروسلوز گوسفند و بز یک بیماری مشترک مهم است که دارای اهمیت در هر دو بعد بهداشت انسانی و دامی بوده و در بسیاری از نقاط دنیا از جمله ایران انتشار گسترده ای دارد. هدف اصلی این تحقیق، بررسی سرولوژیکی بیماری بروسلوز در بین میش های سقط کرده و همزمان با آن بررسی DNA باکتریایی در بافت- های جنینی سقط شده بود. از اول مهر تا اسفند ماه ۱۳۸۹، تعداد ۱۰۰ جنین سقط شده به همراه ۱۰۰ نمونه خون محیطی و نمونه جفتی از میش های سقط کرده از گوسفندداری های اطراف تبریز جمع آوری گردید. بعد از کالبدگشایی جنین ها، از مغز، قلب، مایع شیردان، کلیه ها، ریه ها، طحال و جفت مربوطه نمونه برداری انجام گرفت و تا زمان انجام آزمایش PCR به فریزر 20°C - منتقل شده و نگهداری گردیدند. سرم ها نیز پس از جداسازی از خون توسط سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ و بمدت ۱۵ دقیقه به همان فریزر منتقل گردیدند. تعداد ۱۲ نمونه سرمی در آزمایش ELISA نسبت به گونه های بروسلا واکنش مثبت نشان دادند. تعداد ۱۲ نمونه بافتی تهیه شده از جنین های سقط شده هم در آزمایش PCR نسبت به سویه واکسنی بروسلا ملیتنسیس (Rev-۱) واکنش مثبت نشان دادند. هیچکدام از نمونه های جنینی نسبت به سویه استاندارد بروسلا ملیتنسیس (ATCC ۲۳۴۵۷) واکنش مثبت نشان ندادند. تجزیه و تحلیل آماری اختلاف معنی داری را میان دو آزمایش نشان نداد. با این حال آزمایش PCR نسبت به آزمایش ELISA از نظر دارا بودن توانایی تفریق سویه های واکسنی از وحشی مهمتر به نظر می رسد.

نتیجه گیری کلی این است که واکسیناسیون با واکسن Rev-۱ در میش های آبستن باید با احتیاط زیاد صورت بگیرد زیرا این واکسن می تواند باعث سقط جنین در میش های آبستن شود.

واژه های کلیدی: بروسلوز، سقط جنین، میش، PCR، ELISA

فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه و تاریخچه ۱

فصل دوم

کلیات ۴

۱-۲ سقط جنین ۵

۲-۲ علل سقط ۶

۱-۲-۲ عوامل غیر عفونی ۶

۲-۲-۲ عوامل عفونی ۹

۳-۲ تولید مثل گوسفند ۹

۴-۲ بررسی بیماری بروسلوز ۱۲

۱-۴-۲ پراکنش ۱۲

۲-۴-۲ شیوع بروسلوزیس در نواحی مختلف جهان ۱۴

۵-۲ خصوصیات عمومی بروسلاها ۱۶

۱-۵-۲ ژنیک ۱۷

۲-۵-۲ اپیدمیولوژی بروسلوز ۱۸

۶-۲ طبقه بندی بروسلا ۱۸

۱-۶-۲ تمایز جنس بروسلا از سایر جنس ها ۲۲

۲-۶-۲ جنبه بالینی بروسلوز ۲۳

۲۴	۳-۶-۲ پاتوژنز بروسلا.....
۲۵	۴-۶-۲ ورود و بقای بروسلا در سلول (فاگوزوم).....
۲۸	۵-۶-۲ بیماریزایی بروسلا.....
۳۳	علائم درمانگاهی، علائم کالبد گشایی، تشخیص.....
۳۶	۶-۶-۲ واکسیناسیون.....
۳۸	۷-۲ بروسلا ملی تنسیس.....
۳۸	۱-۷-۲ گونه ی بیماریزای گوسفندی و بزى.....
۳۸	عوامل محیطی موثر بر بقا و دفع بروسلا ملی تنسیس.....
۴۰	۲-۷-۲ تاثیر فصول سال بر روند بیماری.....
۴۰	۳-۷-۲ تاثیر شغل و موقعیت اجتماعی.....
۴۰	۸-۲ بیماریزایی در گوسفند.....
۴۱	۱-۸-۲ نشانه های بیماری.....
۴۲	۲-۸-۲ راه های انتقال بیماری.....
۴۴	۳-۸-۲ تشخیص بروسلا در آزمایشگاه.....
۴۶	۴-۸-۲ تست های ایمونولوژیک برای جداسازی آنتی بادی گونه های بروسلا.....
۴۷	۵-۸-۲ پیشگیری و کنترل بیماری در دام ها.....
۴۸	۶-۸-۲ محدودیت های واکسیناسیون در دام.....
۵۰	۷-۸-۲ درمان بیماری در دام.....
فصل سوم	
۵۲	مواد و روش کار.....
۵۳	۱-۳ انتخاب نمونه.....

۲-۳	بررسی ایمنوسوربنت (جاذب ایمنی) متصل شده به آنزیم (ELISA).....	۵۳
۳-۳	استخراج DNA.....	۵۵
۴-۳	PCR.....	۵۸
۵-۳	مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز.....	۵۹
۱-۵-۳	مبانی الکتروفورز.....	۶۱
۲-۵-۳	الکتروفورز ژل آگارز.....	۶۱
۳-۵-۳	بافر های الکتروفورز.....	۶۲
۴-۵-۳	بافر های بارگذار الکتروفورز.....	۶۴
۵-۵-۳	رنگ آمیزی ژل.....	۶۵
۶۶	فصل چهارم نتایج.....	۶۶
۱-۴	نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز.....	۶۸
۲-۴	نتایج ELISA READER محصولات ELISA.....	۷۰
۱-۲-۴	بیان نتایج از دستگاه ELISA منوط به جذب نوری.....	۷۰
۷۲	فصل پنجم بحث.....	۷۲
۸۸	نتیجه گیری.....	۸۸

فهرست شکلها و جداول مندرج در پایان نامه

شکل ۱-۲	سقط جنین مهمترین علامت بیماری در دام ها.....	۴۲
شکل ۲-۲	راه های انتقال بیماری.....	۴۳
شکل ۳-۲	راه های انتقال بیماری.....	۴۴

شکل ۲-۴ محل تزریق واکسن.....	۴۸
شکل ۳-۵ الکتروفورز بعد از استخراج DNA.....	۵۸
شکل ۳-۶ نتایجی از تقویت PCR از ژنوم DNA.....	۶۸
شکل ۳-۷ الکتروفورز محصولات PCR.....	۶۹
شکل ۳-۸ الکتروفورز محصولات PCR.....	۶۹
شکل ۳-۹ الکتروفورز محصولات PCR.....	۷۰
جدول ۲-۱ علل عفونی سقط جنین گوسفند.....	۱۱
جدول ۲-۲ طبقه بندی بروسلا.....	۱۹
جدول ۲-۳ میزان ها و بیماری های ناشی از گونه های بروسلا.....	۳۳
جدول ۲-۴ مدت زمان بقای باکتری بروسلا در محیط های مختلف.....	۳۹
جدول ۳-۵ پرایمرها و قطعات ژنی انواع بروسلا.....	۶۰
جدول ۳-۶ نتایج حاصل از انجام آزمایشات PCR,ELISA.....	۶۷
جدول ۴-۷ داده های حاصل از Elisa Reader.....	۷۱

فصل اول

مقدمه و تاریخچه

بر مبنای گفته های Hughes (۱۸۹۷)، اولین بار بروسلوز بوسیله بقراط در ۴۶۰ سال قبل از میلاد مسیح شرح داده شده است. توصیف دقیق بیماری در سال ۱۸۶۱ توسط Marston، یک کمک جراح ارتش انگلیس در جزیره مالت، انجام شد و نام آنرا تب مالت گذاشت. در سال ۱۸۸۷ یک پزشک انگلیسی به نام بروس Bruce جرمی از طحال سربازی که از نوعی بیماری با علامت تب موج تلف شده بود، جدا نمود و آن را میکروکوکوس ملی تنسیس نام گذاشت. ده سال بعد یک دامپزشک دانمارکی به نام بانگ Bang جرم مشابهی از یک جنین سقط شده گاو جدا نمود و آن را باسیلوس آبورتوس نامید. سپس در سال ۱۹۱۴ باکتری دیگری توسط تروم از موارد سقط جنین خوکها جدا شد و سرانجام در سال ۱۹۱۸ اوانس Evans متوجه شد که بین میکروبهای جدا شده از گاو و انسان و خوک که تا این تاریخ جدا شده بودند، شباهت کاملی وجود دارد. وی ثابت کرد که بیماری در انسان ممکن است به وسیله میکروبهای جدا شده از دام نیز ایجاد شود و نام کلی بروسلا را برای این دسته از باکتریها پیشنهاد نمود (۱۱).

بروسلوز یکی از پنج بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با باکتری های جنس بروسلا به وجود می آید. بروسلاها، باکتری های کوچک، غیر متحرک، گرم منفی کوکوباسیل و درون سلولی اختیاری که در طیف وسیعی از حیوانات ایجاد بیماری می کنند. بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی تنسیس عمده ترین گونه های عامل بروسلوز انسانی هستند (۱۱ و ۲۳).

بیماری بروسلوز از معضلات بهداشتی در بسیاری از کشورها از جمله ایران می باشد که به دلیل گسترده گی آلودگی در تمام مناطق کشور، سالانه موجب زیان های اقتصادی بسیار بزرگی می گردد. این بیماری در انسان با علایم آسیب شناسی بسیار متنوع و در دام با سقط جنین و عفونت دستگاه تناسلی حیوان نر همراه است. با توجه به فرارگرفتن ایران در منطقه شایع بروسلوز و همچنین عوارض و خطرات

بالقوة بروسلوز و هزینه هایی که بر اقتصاد و اجتماع تحمیل می کند ، اهمیت لزوم تحقیق در مورد میزان شیوع واقعی و هم چنین استفاده از بهترین ، دقیق ترین و به صرفه ترین روش برای تشخیص این شیوع روشن می شود (۳۴).

Alice Evans میکروبیولوژیست آمریکایی در سال ۱۹۱۸ ارتباط نزدیک بین باسیلوس ابورتوس و میکروکوکوس^۱ ملی تنسیس را گزارش نمود و بدلیل کشف عامل بیماری تب مالت توسط David Bruce در سال ۱۸۸۹ نام این بیماری توسط خانم Alice بروسلوزیس^۲ گذاشته شد. دو سال بعد (۱۹۲۰) Meyer و Shaw جنس بروسلا را معرفی کردند ، Mohler در سال ۱۹۱۴ میکروارگانیسمی از کبد ، کلیه و معده خوک نابالغ کشت داد که شبیه بروسلا ابورتوس بود به استثنای اینکه در فشار معمولی اتمسفر سریعاً رشد می کرد . در سال ۱۹۲۷ خانم Alice عامل سقط را در خوک بنام بروسلا سویس^۳ شناسایی کرد. Buddle و Boyes در سال ۱۹۵۳ عامل سقط در قوچ بنام بروسلاویس^۴ شناسایی نمودند. در سال ۱۹۵۷ Lackman و Stoenner گونه جدید بروسلا نئوتومه^۵ از موش صحرائی جداسازی کردند. در سال ۱۹۹۶ Carmichael دامپزشک آمریکایی عامل سقط در سگ پاکوتاه^۶ بنام بروسلاکانیس^۷ کشف کرد و اولین مورد بروسلا کانیس انسان ، در سال ۱۹۶۸ توسط سرویس بهداشت عمومی آمریکا از یک تکنیسن آزمایشگاه که با میکروارگانیسم زنده کار می کرد ، گزارش شد (۱۲).

^۱ .Micrococcus melitensis

^۲ .Brucellosis

^۳ .Beucella suis

^۴ . Brucella ovis

^۵ . Brucella neotomae

^۸ . Beagles

^۹ .Brucella canis

فصل دوم

کلیات

۲- اسقط جنین چیست؟

سقط جنین عارضه ای است که در آن دام ماده قادر به نگهداری جنین نبوده و آن را از بدن دفع می نماید که در این ارتباط عوامل عفونی و غیر عفونی می توانند منجر به سقط جنین گردند. از جمله عوامل یا بیماریهای ایجاد کننده سقط جنین، کمپیلوباکتر ژروناوی و کمپیلوباکتر فتوس-فتوس^{۱۰}، کلامیدیا پسی-تاسی (ابورتوس)^{۱۱} یا سقط جنین آنزوتیک، لپتوسپیروز، بروسلوز، کوکسیلا بروتی^{۱۲} (تب کیو)، بوردر دیزیز و بلو تانگ و از عوامل غیر عفونی می توان ضربه، کمبودهای تغذیه ای و مسمومیت حاصله از گیاهان سمی را نام برد (۱۳).

شیوع سقط جنین هایی که تا ۳ هفته اول آبستنی رخ می دهند اغلب به دلیل کمبودهای مواد غذایی و یا ناشی از استرس است که معمولاً به میزان ۲۵ درصد می رسد. سقط جنین هایی که تا میزان ۱/۵ الی ۲ و حتی ۵ درصد عادی بوده، چنانچه این میزان به حدود ۲۰ الی ۳۰ درصد برسد و اقدام بهداشتی لازم در مورد آن صورت نگیرد می تواند تا میزان ۸۰ درصد پیشرفت نماید که از این نظر باعث خسارات اقتصادی و بهداشتی در دامداری می گردد (۶).

در اقتصاد دامپروری که هدف تولید گوشت و یا شیر میباشد در صورتی توفیق حاصل می گردد که دامهای بارور دوره حساس را بطور کامل به پایان رسانده و نوزادان زنده و سالم بیار آورند. به این ترتیب در هر سال تعداد دامهای گله اضافه شده و با نتیجه گوشت و شیر بیشتر تولید می گردد و تعادلی بین هزینه ی

۱۰- Campylobacter. jejuni, Campylobacter fetus

۱۱- C.abortus=C.psittaci

۱۲- coxiella burneti

انجام شده و بهره حاصل بوجود می آید. در غیر اینصورت دامداری بصرفه نبوده و دامدار شکست خورده به عبارت دیگر از پای در می آید (۶).

سقط جنین یا بچه اندازی یکی از معضلات و مشکلات دامپروری ما محسوب میشود اگر بخواهیم تعریفی از سقط جنین را داشته باشیم باید بگوییم:

سقط جنین عبارت از قطع آبستنی قبل از موعد زایمان و خروج جنین کامل نشده است. وقتی که جنین در رحم مادر از بین می رود دیگر به عنوان یک جنس خارجی و ناشناخته بحساب آمده و توسط رحم مادر دفع می شود. سقط جنین در هر سنی از جنین میتواند اتفاق بیفتد. سقط زود رس جنین یعنی در گوسفند و بز ۱۲ روز اول آبستنی و در گاو روزهای ۱۷-۱۵ آبستنی می تواند اتفاق بیفتد که در این حالت جنین جذب شده و آثاری از جنین دفع شده دیده نمی شود. ممکن است دام دوباره به فحلی برگشته و آماده جفت گیری مجدد شود. زایمان های زود رس که تقریباً ۱۰ روز زودتر از موعد مقرر پایان آبستنی رخ میدهد جنین زنده متولد می شود ولی ضعیف بوده و رشد و تکامل پیدا نکرده و در اغلب موارد از بین میرود. اگر در گله های گوسفند و یا گاو بیش از ۵٪ از دامهای آبستنی سقط نمایندگله با یک مشکل جدی روبرو است و باید در جهت تشخیص عامل سقط اقدام نمود (۲۳).

۲-۲ علل سقط

علل سقط را می توان به دو دسته عوامل عفونی و عوامل غیر عفونی تقسیم می کنند:

۲-۲-۱ عوامل غیر عفونی

۱- علل هورمونی: عدم تعادل در مقدار استروژن و پروژسترون با توجه به اینکه رابطه حیاتی بین مادر و جنین را دچار اختلال کند موجب سقط میشود (۷).

۲ - عدم توانایی رحم و نگهداری جنین: گاهی در اثر نا هنجاریهای مادر زادی یا به علت جراحات حاصله و در موقع زایمان قبلی رحم قدرت انقباض خود را از دست داده و در ماه های آخر قادر به تهیه جای کافی برای جنین ندارد. رشد جنین متوقف میشود، بلاخره سقط میگردد (۸).

۳- چند قلو آبستنی: حیوانات تک قلو زا و (گاو، گوسفند و بز) که چند قلو آبستن می شوند بعلت عدم کفایت تغذیه بوسیله مادر و کمبود جا در رحم معمولاً در اثر کمترین استرس حیوانات سقط میکند.

۴- عوارض مربوط به مادر: تب شدید، اسهال های مزمن، خونریزی های شدید، بیماری های انگلی، دل درد ها و نفخ از جمله عوارضی هستند که موجب سقط میشوند (۹).

۵- تغذیه و مسمومیت ها: کمبود مواد تغذیه ای به ندرت موجب سقط جنین میشوند ولی ممکن است در تولد نوزادان ضعیف و سخت زایی موثر باشند (۱۰). کمبود ویتامین (A) به مدت طولانی منجر به سقط تولد نوزادان ضعیف و عقب ماندگی می شود. در صورتی که مواد غذایی خورده شده مانند شبدر، چغندر، و برگ کلم یخ زده و کپک باشند ممکن است موجب سقط جنین شوند.

۶- سموم آلی و معدنی مانند ترکیبات نیترات ها بعضی از داروها مانند کورتون ها، اکسی توسین و ترکیبات استروژن از جمله مواردی هستند که در دامها ایجاد سقط جنین مینمایند.

۷- عدم مراقبت صحیح: ننگه داری دام در جایگاه های سرد و در معرض کوران هوای سرد قرار گرفتن یا در گرمای زیاد دام به صورت طولانی دوامده شود ممکن است سقط جنین نماید.

۸- عوامل ضربه ای : پریدن ، افتادن شدید، ضربه شدید به سرو بینی و پا بر روی شکم از عواملی هستند که دام را وادار به سقط جنین میکند. ترس مستقیماً موجب سقط نمیشود ولی در اثر وحشتی که در دام بوجود می آید ممکن است از خود عکس العمل بصورت ناگهانی بروز دهد که منجر به سقط جنین میگردد.

۱۰- سقط جنین مکانیکی: ضربه زدن به جنین یا پاره شدن پرده ی جنین با دست هنگام آزمایش رکتال، برداشت جسم زرد، معاینه طولانی از عواملی هستند که ایجاد سقط جنین می کنند. ممکن است واکسیناسیون با توجه به شوکی که به دام وادار میشود موجب سقط گردد (۹).

دیگر عوامل غیر عفونی

۱- عوامل ژنتیکی و کروموزومی

۲- استرس مادری

۳- سوء تغذیه

۴- کمبودهای ویتامینی

۵- کمبودهای مواد معدنی

۶- گیاهان سمی و سایر سموم

۷- عوامل هورمونی

۸- عوامل محیطی

۹- عوامل فیزیکی

۲-۲-۲ عوامل عفونی

با کتریها، ویروسها، تک یاخته ها و قارچ ها می توانند تحت شرایط معین به رحم جنین و پرده های جنینی و یا کوتیلودون ها آسیب رسانده و باعث قطع ابستنی و متعاقب آن سقط جنین شوند. با توجه به وجود عوامل مختلف مسبب سقط جنین، جهت آشنایی بیشتر با این عوامل لیستی از علل عفونی و غیر عفونی سقط جنین در گاو و گوسفند به طور مختصر جمع آوری گردیده است. به پیوست راههای کنترل و پیشگیری از برخی عوامل ایجاد کننده سقط و موارد مورد تاکید در مشاهده سقط جنین و چگونگی برخورد با آنها به شرح ذیل ارائه می گردد (۹).

۳-۲ تولیدمثل گوسفند

تولیدمثل در گوسفند تحت تاثیر عوامل زیادی قرار می گیرد. این عوامل شامل پتانسیل ژنتیکی و عوامل محیطی همچون وضعیت تغذیه ای، اثرات طول روز یا دوره نوری، وضعیت سلامت و غیره می باشد. بطور کلی بیشتر نژادهای گوسفند الگوی تولیدمثلی فصلی دارند. بدین صورت که تنها در زمان های معینی از سال فحل^۹ می شوند که بنابر اصطلاح به آن فصل تولیدمثلی یا فصل جفت گیری گفته می شود.

^۹ Estrus

گوسفند از جمله حیواناتی است که دارای پلی استروس فصلی می باشد. بدین معنا که در هر فصل تولیدمثلی چندین بار فحل می شود. فصل تولیدمثلی در گوسفند و بز با کوتاه شدن دوره روشنایی روزانه آغاز می شود، از این رو آنها را «تولیدمثل کننده در روزهای کوتاه»^{۱۰} نامیده اند. لذا فصل آنستروس^{۱۱} آنها همزمان با روزهای بلند سال است. دانشمندان علت اصلی آغاز شدن چرخه های فحلی در گوسفند را بی تفاوت شدن میش در برابر تاثیر روزهای بلند در فصل غیرفحلی دانسته اند. چرخه فحلی زمانی آغاز می شود که طول روز هنوز شروع به کم شدن نکرده است. آنچه که سبب تغییرات هورمونی و تخمک گذاری می شود، کاهش حساسیت مغز در برابر تاثیر بازخورد^{۱۲} منفی استروئیدها بوده که باعث افزایش ترشح GnRH و گنادوتروپین ها و رشد فولیکولی می گردد. در فصل تولیدمثلی روزها بتدریج کوتاه می شوند و پس از مدتی که میش در شرایط روزهای کوتاه (تاریکی بیشتر) نگهداری شود، نسبت به روزهای کوتاه نیز بی تفاوت می شود. در روزهای کوتاه تراوش ملاتونین به تدریج افزایش می یابد. ملاتونین سبب افزایش حساسیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز به تاثیر بازخورد منفی استروئیدهای گنادها شده و بدین - ترتیب بسامد پالسهای GnRH و گنادوتروپین ها کاهش یافته که آن نیز به نوبه خود توقف چرخه های تخمدان و در نتیجه غیرفحلی را دربردارد (۱۱).

^{۱۰} Short-day breeder

^{۱۱} Unestrus

^{۱۲} Feedback