

דו"ח מדעי מסכם לתכנית 14-0345-362

אנליזות פיסיולוגיות וגנטיות להבנת הקשר בין תגובה לעקה ורגישות למחלות נשימה בבקר
Physiological and genetic approaches to shed light on the relations between stress
response and susceptibility to BRD

מוגש למועצת החלב ע"י אריאל שבתאי

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : לא!



חתימת החוקר _____

תקציר

תחלואה ותמותה מקומפלקס מחלות דרכי הנשימה בבקר גורמות לנזק הבריאותי המשמעותי ביותר בעגלי מפתמה בכל העולם. ההפסדים הכלכליים השנתיים הנגרמים למגדלים מ-BRD נאמדים בישראל בכ-35 מיליון ₪, ובארה"ב בין 700 מיליון למיליארד דולר. התפתחות BRD בעגלים צעירים מואצת על ידי גורמי עקה, שהבולטים שביניהם הם העברה ממקום למקום וגמילה. לא כל הפרטים מגיבים באופן דומה לעקה. בעולם נמצאה תגובה לחשיפה לוירוסים גורמי BRD הנבדלת באופן ניכר בחומרת הסימפטומים הקליניים של פרטים בני אותו גיל ומאותה סביבת גידול. בעבודה שפרסמנו לאחרונה דווחנו כי העברה מרפת בית דגן ליונקיה בנוה יער גרמה להגברת ריכוז הקורטיזול בפלסמה, ולביטוי גבוה יותר של חלבוני עקה בתאי הדם רק בחלק מהעגלים, בזמן שעגלים אחרים מאותם מועדי העברה לא הגיבו כלל. באותה עבודה הראנו עוד כי רמת עקת החמצון ברקמת הדם של העגלים בעקבות ההעברה, הייתה במתאם מובהק עם פנוטיפי הכשרות בבית המטבחים כשנה לאחר מכן. מתוך האמור לעיל ניתן לשער כי שונות בתגובה לעקה עשויה להיות מרכיב חשוב בשונות הרגישות לתחלואה, וכי הבנת מקור השונות הזאת יכולה לספק מידע לריסון BRD. התורשתיות הריאלית של העמידות ל BRD עשויה להיות קרובה ל 0.5. כיום אין כלל אמצעים להערכה מוקדמת של רגישות העגלים לתחלואה. שימוש בסמנים גנטיים לניבוי הסיכון של עגלים לפתח BRD נראה כאמצעי היעיל ביותר, מאחר והוא מצריך דיגום אחד בלבד, לאו דווקא חודרני. מטרת המחקר אם כך היא לבדוק קשר בין השונות בתגובה לעקה לשונות ברגישות ל BRD, על ידי שימוש משולב באנליזות גנטיות ופיסיולוגיות. בשנת המחקר הראשונה התמקדנו בשונות הקיימת בין עגלים בעקת החמצון המתפתחת אצלם בעקבות אירועי העברה מהרפת ביגור אל היונקיה בנוה יער. הראנו כי ניתן לנבא (חודשיים ויותר מראש) את הסיכון של עגל לפתח מחלות נשימה לאחר הגמילה באמצעות ה redox state שלו, כפי שנמדד בדם, עובדה שיכולה לאפשר פיתוח של "תרפיה

אנטיאוקסידטיבית" טרם העברת עגלים ממקומם, כדי לנסות ולמזער התפתחות של מחלות נשימה. בשנת המחקר השנייה בחנו את יכולת החיזוי של רמת הנוגדנים בגיל שלושה ימים, זאת מאחר ורמת נוגדנים מתחת לריכוז של 5.5 g/dl מוגדרת ככשל בחיסון הפסיבי (FPT) שבעטיו עגלים מועדים לפתח מחלות. לא נמצא קשר ישיר בין רמת הנוגדנים של העגלים בגיל 3 ימים לבין תחלואה במחלות נשימה במהלך תקופת הגידול. אנליזה לינארית מבדילה (LDA) שבחנה את התרומה של מספר פרמטרים שנמצאו במתאם מובהק עם תחלואה עתידית ב BRD, גלתה שבזמן שה redox state הוא הגורם המובהק ביותר לחיזוי, רמת הנוגדנים היא במקום האחרון. נמצא שמודל זה מאפשר לחזות 93.1% מהתחלואה בניסוי ברמת מובהקות של $P=0.031$. בשנת המחקר השלישית אנו מדווחים על אנליזות אשר התמקדו במציאת סמנים גנטיים להבחין בין עגלים רגישים ועמידים ל BRD, על בסיס פנוטיפ הכשרות בבית המטבחיים. אנליזות אלה התכנסו לשמונה עשר גנים פוטנציאליים, הקשורים לפעילות של מערכת החיסון וריפוי פצעים, אשר סטטיסטית נבדלו בין עגלים טרפים לחלקים, על פי ההגדרה הפנוטיפית בבית המטבחיים. גנים אלה צריכים להיבחן פרטנית באוכלוסייה נוספת (וגדולה יותר) של פרטים עם פנוטיפ הכשרות הנ"ל.

מבוא

תחלואה ותמותה מקומפלקס מחלות דרכי הנשימה בבקר (Bovine Respiratory Disease; BRD) גורמות לנזק הבריאותי המשמעותי ביותר בעגלי מפתמה בכל העולם (Thompson et al., 2006; Duff and Galyean, 2007). הדבקות של קרומי הריאה מוליכות לסתימה חלקית או מוחלטת של נאדיות הריאה ודרכי האוויר המובילות אליה. התמותה, הוצאות הטיפול במחלה, הפגיעה בתפקוד הריאה והשלכותיה על המטבוליזם, כמו גם הפגיעה בתיאבון של העגלים, גוררות ירידה ניכרת ביצרנות ומסכות למגדלים הפסדים שנתיים כבדים. הפסד משמעותי נוסף נגרם מפגיעה ברמת הכשרות של הבשר (עוד על כך בסוף, ב"הערכה כלכלית"). ההפסדים הכלכליים השנתיים הנגרמים למגדלים מ-BRD נאמדים בישראל בכ-35 מיליון ₪, ובארה"ב בין 700 מיליון למיליארד דולר. התפתחות BRD בעגלים צעירים מואצת על ידי גורמי עקה, שהבולטים שביניהם הם העברה ממקום למקום וגמילה. לא כל הפרטים מגיבים באופן דומה לעקה. התגובה לעקה גורמת לשחרור של מזוון תוצרים ביוכימיים וביניהם הורמונים ונוירופפטידים. הללו מובילים להגברת הפתוגניות ע"י החלשת מערכת החיסון (Blecha et al., 1984; Buckham Sporer et al., 2007; Gupta et al., 2007; Yagi et al., 2004).

בעולם נמצאה תגובה לחשיפה לוירוסים גורמי BRD הנבדלת באופן ניכר בחומרת הסימפטומים הקליניים של פרטים בני אותו גיל ומאותה סביבת גידול (Cobb and Steptoe, 1996; Aich et al., 2007). בעבודה שפרסמנו לאחרונה (Eitam et al., 2010), דווחנו כי העברה מרפת בית דגן ליונקיה בנוה יער גרמה להגברת ריכוז הקורטיזול בפלסמה (איור 1), ולביטוי גבוה יותר של חלבוני עקה בתאי הדם רק בחלק מהעגלים, בזמן שעגלים אחרים מאותם מועדי העברה לא הגיבו כלל. באותה עבודה הראנו עוד כי רמת עקת החמצון ברקמת הדם של העגלים בעקבות ההעברה, הייתה במתאם מובהק עם פנוטיפ

הכשרות בבית המטבחיים כשנה לאחר מכן. ניתן לשער מתוך תוצאות אלה כי קיים בסיס גנטי להבדלים בין העגלים בתגובה/חוסר התגובה לעקה. מתוך האמור לעיל ניתן לשער כי שונות בתגובה לעקה עשויה להיות מרכיב חשוב בשונות הרגישות לתחלואה, וכי הבנת מקור השונות הזאת יכולה לספק מידע לריסון BRD.

מספר מחקרים מצאו תורשתיות משמעותית של עמידות ל BRD (Snowder et al., 2005). למרות שבדרך כלל התורשתיות הייתה נמוכה עד בינונית (0.08-0.26), היא היתה יותר גבוהה משמעותית בעדר ובשנה מסוימים כאשר התחלואה הכללית הייתה גבוהה. יתרה מכך, BRD נמדדת כתכונת סף דיכוטומית, עובדה המורידה באופן ניכר את אומדן התורשתיות. מכאן שהתורשתיות הריאלית של העמידות ל BRD עשויה להיות קרובה ל 0.5 (Snowder et al., 2005). כיום אין כלל אמצעים להערכה מוקדמת של רגישות העגלים לתחלואה. זיהוי המחלה בשלביה המוקדמים סובייקטיבי, ומתבסס על הערכה ויזואלית הנתמכת במדידות קליניות מועטות. זיהוי תת-קליני מוקדם יכול למנוע את הדבקויות קרומי הריאה ולשפר את תוצאות הכשרות וביצועי הגדילה. שימוש בסמנים גנטיים לניבוי הסיכון של עגלים לפתח BRD נראה כאמצעי היעיל ביותר, מאחר והוא מצריך דיגום אחד בלבד, לאו דווקא חודרני. אולם, כדי שסמן גנטי יהיה מהימן ביכולת הניבוי שלו, נדרש שהוא יהיה במתאם עם פנוטיפים פיסיוולוגיים.

מטרות המחקר:

בדיקת הקשר בין השונות בתגובה לעקה לשונות ברגישות ל BRD, על ידי שימוש משולב באנליזות גנטיות ופיסיוולוגיות.

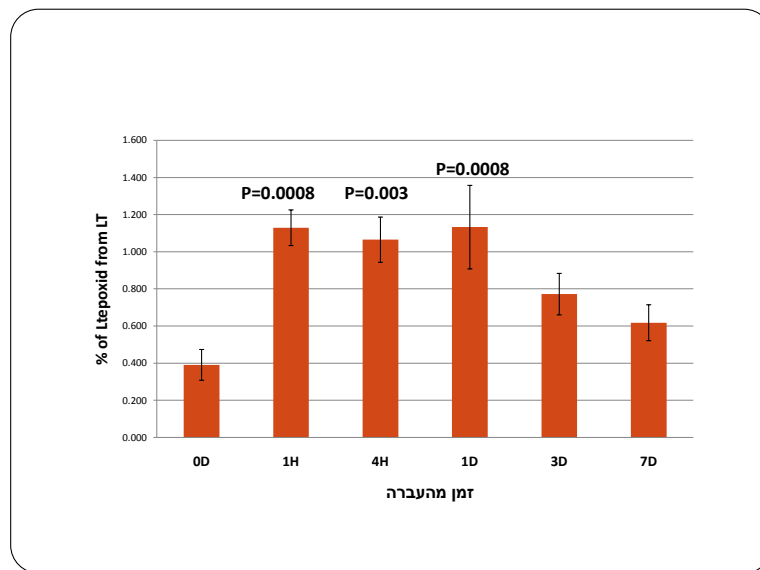
שיטות וחומרים

למערכת הניסויית יש שני מרכיבים: א. מרכיב פיסיוולוגי לבחינה ברמה פנוטיפית של הקשר בין התגובה לעקה, לתגובה החיסונית ולרגישות ל BRD. ב. מרכיב גנטי הכולל מיפוי אתרים המשפיעים על תכונות כמותיות (QTL). זיהוי האתרים והקשרים ביניהם יסייע בסלקציית סמנים (MAS) כנגד הרגישות ל BRD, עשוי לשפר את הבנתנו לגבי מנגנון העמידות ברמה הגנטית-פיסיוולוגית. בהצעת המחקר, אשר הופנתה גם אל ולא אושרה ע"י המדען הראשי, הוצע לכלול כל שנה 60 עגלי הולשטיין זכרים מרפת בית דגן. בפועל בגלל מורכבות הניסוי, עלות ביצועו והעבודה הרבה הכרוכה בו מספר העגלים שנדגם בפועל בשנת 2013 היה 32. בגיל ממוצע של 8 ימים העגלים הועברו ליונקיה בנוה יער בששה אירועי העברה שונים. ההעברה משמשת כאירוע הבוחן לעקה. עם הגיעם ליונקיה הוגמרו העגלים בתחליף חלב (קופולק) שניתן דרך המינקת האוטומטית, ע"פ משטר הזנה אינטראקטיבי ממוחשב. מזון גס ומים היו זמינים באופן חופשי. לאחר גמילתם (גיל 60 יום) הועברו העגלים למפטמה עד לשיווקם לבית המטבחיים בגיל שנה. עד לשווק יבדקו התחלואה וקצב הגדילה. שנת המחקר הראשונה התמקדה במרכיב הפיסיוולוגי, ובמסגרתו, בקביעת רמת העקה החמצונית והקשר המנבא שלה לתחלואה במחלות נשימה. דם נדגם מכל העגלים לפני העברתם וכן שעה, 4 שעות ו-24 שעות לאחר הגעתם לנוה יער. הדם שימש לבדיקת רמת העקה החמצונית

אליה נחשפים העגלים בעקבות העברתם ממקומם. רמת העקה החמצונית נקבעה בדם ע"י שימוש בסמן האקסוגני LT, כמתואר ע"י Eitam וחבריו (2010) ובשיטת FRAP- ferric reducing ability of plasma, הקובעת את הקיבולת נוגדת החמצון של הפלסמה.

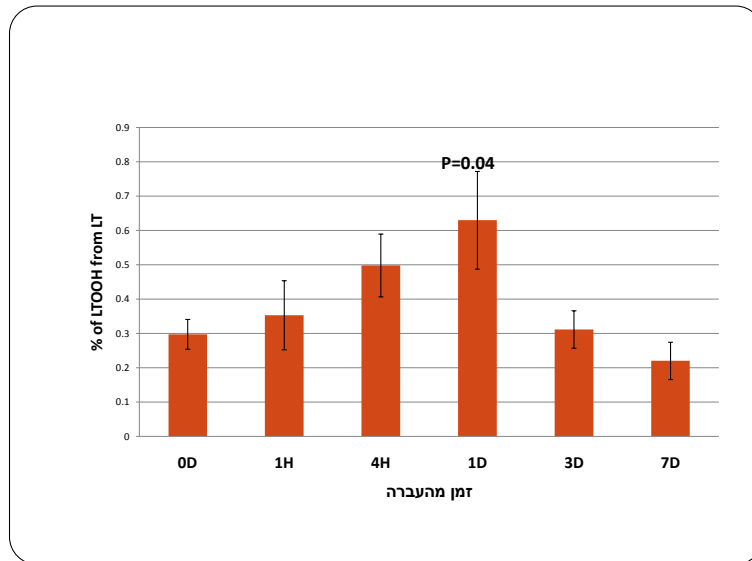
תוצאות ודיון שנה א'

הסמן האקסוגני LT מורכב מחומצה לינולאית הקשורה קוולנטית לחומצה האמינית טירוזין. בעוד המרכיב הליפדי של הסמן אמור לייצג חמצון של חומצות שומן, שייר הטירוזין אמור להעיד על חמצון של חלבונים. הסמן הודגר עם דגימת דם בטמפרטורה פיסיולוגית למשך שעה וחצי, ואז מוצה בעזרת קוקטייל של ממסים ומידת חמצונו נבחנה באנליזת LC/MS/MS. ככלל, שני תוצרי חמצון של הסמן התקבלו ושניהם של שייר החומצה הלינולאית. שני התוצרים היו LT-epoxide ו LT-hydroperoxide. קינטיקת ההיווצרות של כל אחד מהתוצרים שונה. בעוד שה LT-epoxide נוצר ברמה מובהקת ($p=0.0008$) כבר כשעה לאחר העברת היונקים אל היונקיה בנוה יער ונשאר על רמתו זאת גם ארבע שעות ויום לאחר ההעברה (איור 1), ה LT-hydroperoxide רשם שיא היווצרות ($P=0.04$) יום לאחר ההעברה (איור 2).



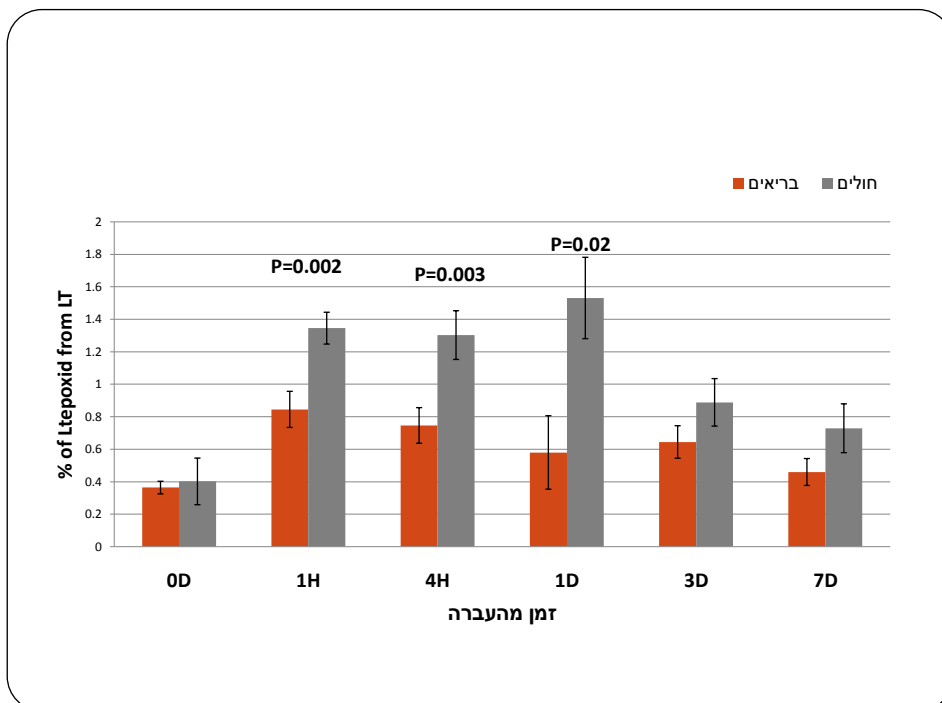
איור 1: ריכוז תוצר החמצון אפוקסיד של הסמן LT בעגלים בעקבות העברתם מרפת יגור ליונקיה בנוה יער.

הבדל נמצא גם באחוז החמצון של הסמן ל epoxide או ל hydroperoxide. במקרה הראשון אחוז החמצון בשיא היה מעל 1% ובמקרה השני הערכים הגיעו ל 0.6% ממולקולות ה LT.



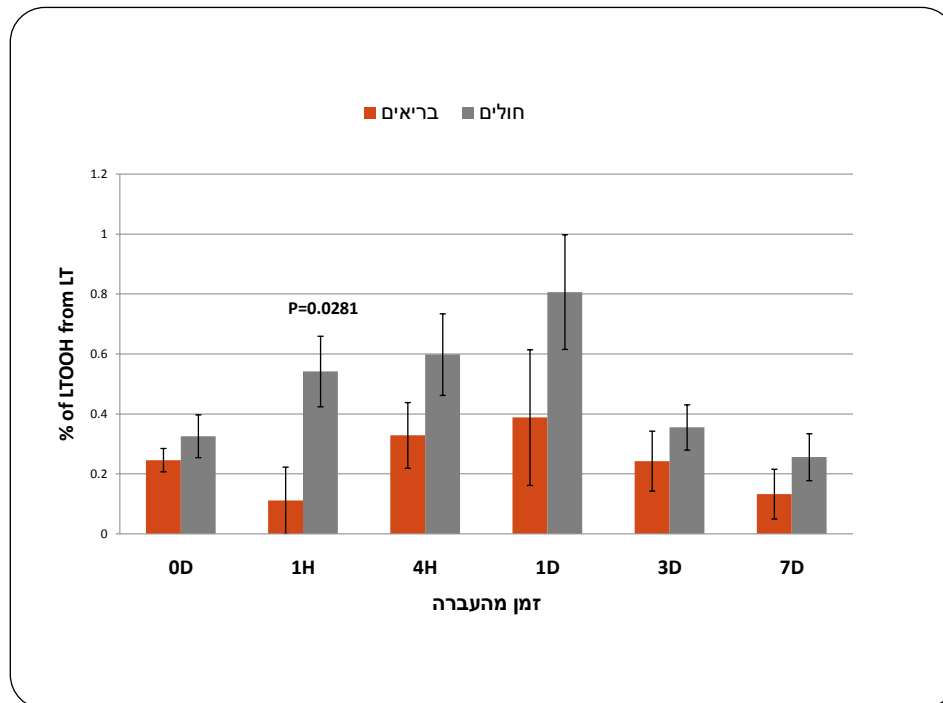
איור 2: ריכוז תוצר החמצון הידרופראוקסיד של הסמן LT בעגלים בעקבות העברתם מרפת יגור ליונקיה בנוה יער.

ערכי החמצון של מרכיב האפוקסיד בעגלים שפיתחו מחלות נשימה לאחר הגמילה (גיל חודשיים ויותר) היו גבוהים יותר משל העגלים הבריאים (1.4% לעומת 0.8% בהתאמה, $P < 0.002$). הבדל בערכי תוצר החמצון אפוקסיד, בין העגלים הריאים ואלה שחלו לאחר הגמילה, נשמר גם בבדיקה לאחר 4 שעות ויום ממועד ההגעה ליונקיה בנוה יער.



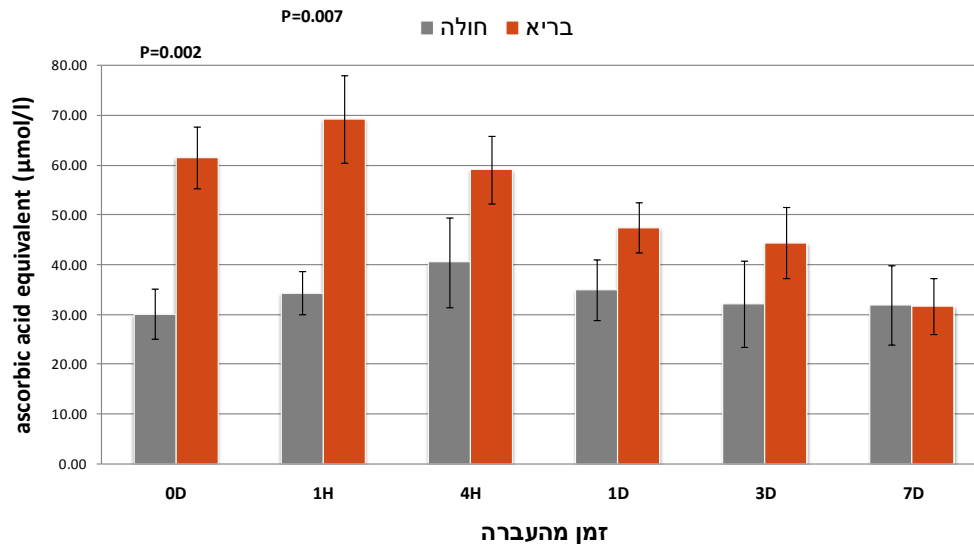
איור 3: השוואה בריכוז תוצר החמצון אפוקסיד של הסמן LT בין עגלים בריאים וכאלה שחלו לאחר הגמילה (כחודשיים ויותר) לאחר לקיחת דגימת הדם לאנליזה.

בדומה, גם במקרה של תוצר החמצון הידרופראוקסיד נמצא הבדל בריכוזו בהשוואה בין עגלים בריאים לכאלה שחלו לאחר הגמילה (כחודשיים ויותר ממועד לקיחת הדם לאנליזה). אולם במקרה זה, ההבדל בין הקבוצות היה מובהק ($p < 0.05$) רק כשעה לאחר ההעברה (איור 4).



איור 4: השוואה בריכוז תוצר החמצון הידרופראוקסיד של הסמן LT בין עגלים בריאים וכאלה שחלו לאחר הגמילה (כחודשיים ויותר לאחר לקיחת דגימת הדם לאנליזה).

בדומה, הקיבולת נוגדת החמצון של הפלסמה לפני ההעברה הייתה גבוהה יותר בעגלים הבריאים בהשוואה לעגלים החולים ($P=0.002$), כאשר עגלים בעלי קיבולת נוגדת חמצון גבוהה מ- $40 \mu\text{mol/l}$ ascorbic acid equivalent לפני ההעברה שמרו על רמת חמצון קבועה של הסמן האקסוגני LT (0.8%) כיום לאחר העברה, ולא פתחו מחלות נשימה.



איור 5: הקשר בין הקיבולת נוגדת החמצון של הפלסמה ותחלואת עגלים לאחר הגמילה.

תוצאות שנה א' מלמדות כי ניתן, באמצעות ביו-מרקרים לעקה חמצונית בדם, לחזות כבר בשלב מוקדם בחיי העגל את הסיכון שלו לפתח מחלות נשימה. צריך להמשיך ולברר אם אכן קיים ערך סף של קיבולת נוגדת חמצון שמעליה משתפרים סיכויי העגל שלא לחלות במחלות נשימה סביב נקודות העקה של העברה וגמילה. אם ההנחה שלנו שערך הסף משפיע על הבריאות העתידית של העגל, ניתן להציע ולבחון "תרפיה אנטיאוקסידנטית" לפני העברה, במסגרתה תוספים של נוגדי חמצון (חשוב לברר אלו) יהוו טיפול יעיל להקטנת תחלואת עגלים ב-BRD. במקביל, יש לנסות ולבחון אם הווריאציה בקיבולת נוגדת החמצון של עגלים נובעת משונות גנטית, אשר מסווגת את העגלים למגיבים/לא מגיבים בדומה לממצאים שלנו מהעבר.

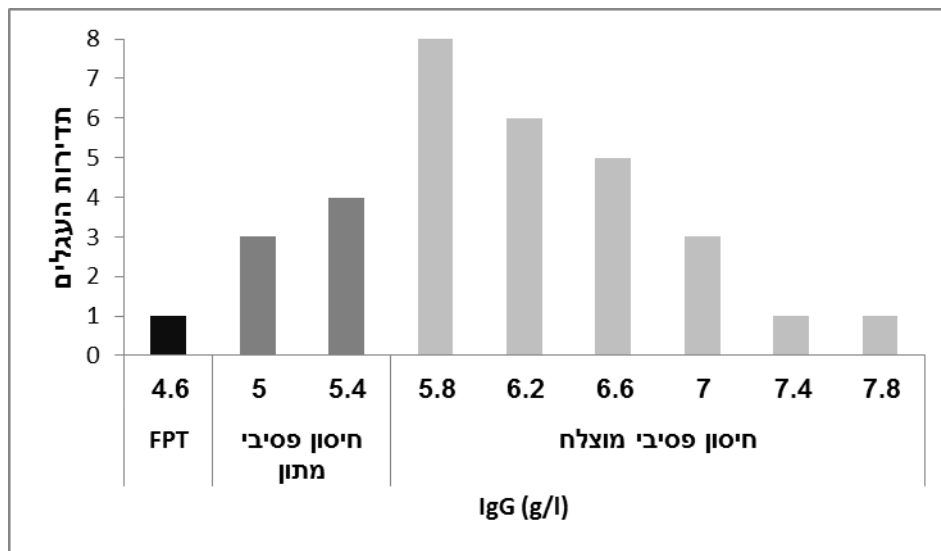
תוצאות ודיון שנה ב'

במעלי גירה, המבנה האנטומי של השליה אינו מאפשר מעבר של נוגדנים מהאם לעובר. לפיכך, ביום היולדו העגל חסר מערכת חיסון אקטיבית והוא חשוף לזיהומים. בתקופה הראשונה של חייו תלוי העגל במערכת החיסון המולדת, ועד שהוא מתחיל לייצר נוגדנים באופן עצמאי, הוא נסמך על נוגדנים שהוא מקבל דרך הקולוסטרום, בתהליך שנקרא חיסון פסיבי. בבקר מוכר סינדרום הנקרא failure of passive transfer (FPT) הנגרם כתוצאה ממשק קולוסטרום לקוי או מבעיות בספיגת הנוגדנים של הולד. למרות ש-FPT אינו מוגדר כמחלה אלא כמצב רקע פיסילוגי, הוא נמצא כמקושר לתחלואה בבני בקר ולכן, הוגדרו ערכי סף ממשקיים לריכוז ה-IgG המעידים על איכות החיסון הפסיבי שקיבל העגל:

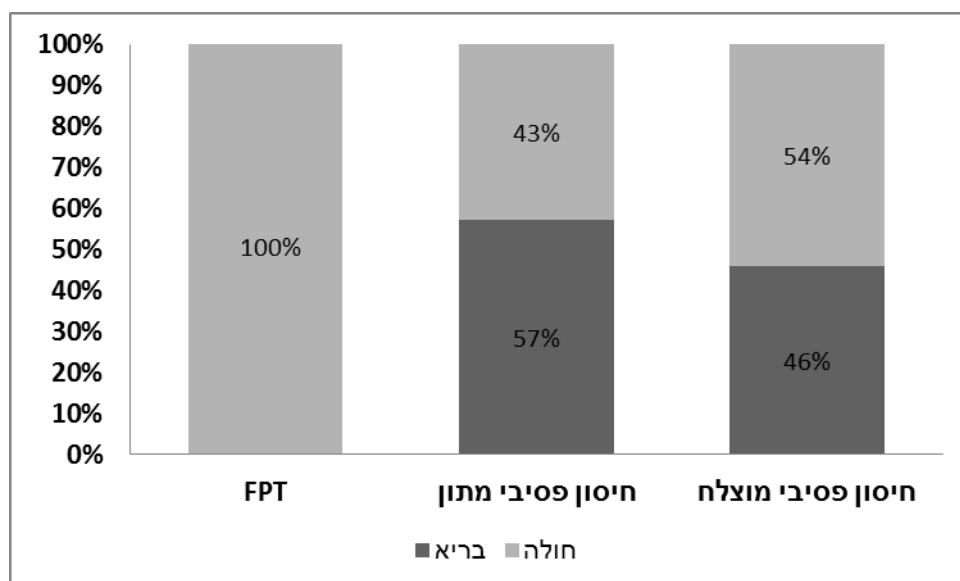
- $\text{IgG} \geq 5.5 \text{ g/dl}$ - חיסון פסיבי מוצלח
- $5 \leq \text{IgG} \leq 5.4 \text{ g/dl}$ - חיסון פסיבי מתון
- $\text{IgG} \leq 5 \text{ g/dl}$ - כשל של החיסון הפסיבי (FPT)

כדי לוודא שכל העגלים שהשתתפו בניסוי הם בעלי חיסון פסיבי מוצלח, ואינם סובלים מסינדרום ה-FPT שעשוי להשפיע על יכולת ההתמודדות שלהם עם אירועי תחלואה, נמדדה רמת ה-IgG של כל עגל בגיל

3 ימים. מתוך 32 העגלים שהשתתפו בניסוי, 24 עגלים היו בעלי חיסון פסיבי מוצלח, 7 עגלים היו בעלי כשל חיסוני פסיבי מתון ועגל אחד נמצא כבעל כשל חיסוני פסיבי ולכן הוצא מהניסוי (איור מס' 6). מתוך 24 העגלים שהיו בעלי חיסון פסיבי מוצלח 11 עגלים (46%) היו בריאים ו-13 עגלים (54%) פיתחו תחלואה במחלות נשימה. מתוך 7 העגלים שהיו בעלי כשל חיסוני מתון, 4 עגלים היו בריאים (57%) ו-3 עגלים (43%) פיתחו תחלואה במחלות נשימה. העגל בעל הכשל החיסוני הפסיבי אכן פיתח תחלואה במחלות נשימה (איור מס' 7). לא נמצא קשר ישיר בין רמת הנוגדנים של העגלים בגיל 3 ימים לבין תחלואה במחלות נשימה לאורך תקופת הגידול ($R^2=0.003$ $P=0.89$) או לסטטוס הכשרות של העגלים בבית המטבחים ($R^2=0.036$, $P=0.37$) (טבלה 1).



איור 6: התפלגות עגלי הניסוי על בסיס ריכוז ה-IgG בפלסמה בגיל 3 ימים לעגלים בעלי חיסון פסיבי מוצלח, חיסון פסיבי מתון וכשל של החיסון הפסיבי (FPT).



איור 7: התפלגות מקרי התחלואה בעגלי הניסוי על בסיס ריכוז ה-IgG בפלסמה בגיל 3 ימים לעגלים בעלי חיסון פסיבי מוצלח, חיסון פסיבי מתון וכשל של החיסון הפסיבי.

טבלה 1. ריכוז ה-IgG בפלסמה של עגלים בני 3 ימים לפי חלוקה לתחלואה ולסטטוס הכשרות

IgG (g/l)	
קבוצת הניסוי	$\pm 0.125.80$
בריא	5.92 ± 0.18
חולה	5.80 ± 0.19
חלק	5.58 ± 0.66
כשר	6.01 ± 0.17
טרף	5.70 ± 0.15

הערכים בטבלה מייצגים ממוצע \pm שגיאת תקן

אחת ממטרות העבודה הייתה פיתוח של כלי אפקטיבי ואובייקטיבי לזיהוי מוקדם של הסיכון של כל עגל לחלות בקומפלקס מחלות דרכי הנשימה. לצורך כך נבחנו, בנוסף לאלה המצוינים בדוחות שנה א' וב', מגוון רחב של סמנים ביולוגיים, במהלך החודשים הראשונים לחייו של העגל- הן סביב אירוע העברה והן סביב אירוע הגמילה, כאינדיקטורים לאירועי עקה. ההשערה הייתה שהמפתח להקטנת התחלואה במחלות נשימה מצוי בהבדלים האינדיבידואליים בין העגלים בהתייחס ליכולת ההתמודדות השונה שלהם עם אירועי עקה. מתוצאות הניסוי עולה שלא כל הסמנים הביולוגיים משתנים סביב אירועי העקה ויתרה מכך, גם סמנים ביולוגיים שמשתנים סביב אירועי העקה לא בהכרח מקושרים לתחלואה ולא נמצאו כנבדלים בין עגלים בריאים לחולים. לאחר ניתוח התוצאות נעשה ניסיון לבחון האם הסמנים הביולוגיים שנמצאו כנבדלים בין עגלים בריאים לחולים מאפשרים לנו לחזות בצורה יעילה את התפתחות מחלות דרכי הנשימה בעגלים. לצורך כך נערך ניתוח סטטיסטי לינארי מבחין (LDA) לעגלים שהשתתפו בניסוי, שכלל את הפרמטרים הבאים: גיל בדיגום לפני העברה, גיל בשיווק, תמ"י, ערכי הנוגדנים, ערכי FRAP לפני העברה, ערכי FRAP כשעה לאחר העברה, ריכוז הקורטיזול לפני הגמילה, ערכי גלוקוז וקראטנין כשבוע לאחר הגמילה וריכוז החומצה הלקטית כ-3 ימים לאחר הגמילה. נמצא שמודל זה מאפשר לחזות 93.1% ממקרי התחלואה ברמת מובהקות של $P=0.031$. המדד היעיל ביותר לניבוי של תחלואה לפי המודל הוא ערכי ה-FRAP לפני העברה והמדד הכי פחות יעיל בניבוי של תחלואה לפי המודל הוא ערכי הנוגדנים. תוצאות אלה ממחישות שוב כי יש בידנו כלי לחיזוי יעיל של מחלות דרכי הנשימה בעגלים צעירים, ובנוסף, כי הנוגדנים, שטרם ההתפתחות המלאה של מערכת החיסון הנרכשת, מקובל להניח

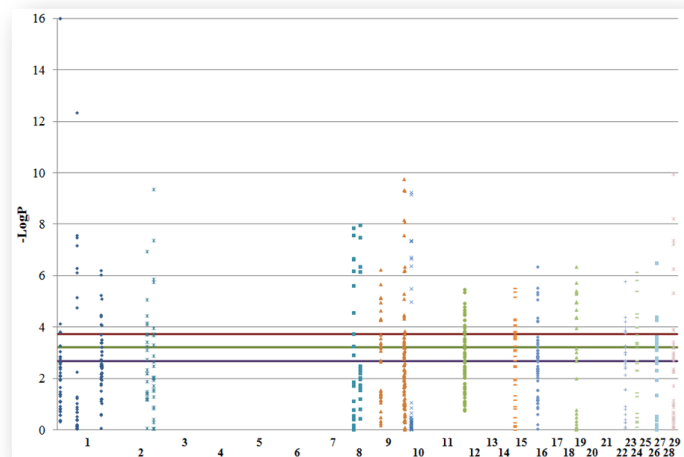
שהם המדד בעל ההשפעה הגדולה ביותר על החיסוניות של עגלים צעירים וכתוצאה מכך במניעת תחלואה, לא די בו כדי להעריך את יכולת ההתמודדות של העגלים עם אירועי תחלואה עתידיים. שנות המחקר הראשונה והשנייה התמקדו במרכיב הפיסיולוגי, ובמסגרתו, בקביעת רמת העקה החמצונית והקשר המנבא שלה לתחלואה במחלות נשימה. בנוסף, נבחן הקשר בין רמת הנוגדנים בדם בגיל שלושה ימים ויכולתה לנבא תחלואה עתידית. דם נדגם מכל העגלים לפני העברתם וכן שעה, 4 שעות ו-24 שעות לאחר הגעתם לנוה יער. הדם שימש לבדיקת רמת העקה החמצונית אליה נחשפים העגלים בעקבות העברתם ממקומם, כמו גם לבדיקה ישירה של total IgG. רמת העקה החמצונית נקבעה בדם ע"י שימוש בסמן האקסוגני LT, כמתואר ע"י Eitam וחבריו (2010) ובשיטת FRAP- ferric reducing ability of plasma, הקובעת את הקיבולת נוגדת החמצון של הפלסמה.

תוצאות ודיון שנה ג'

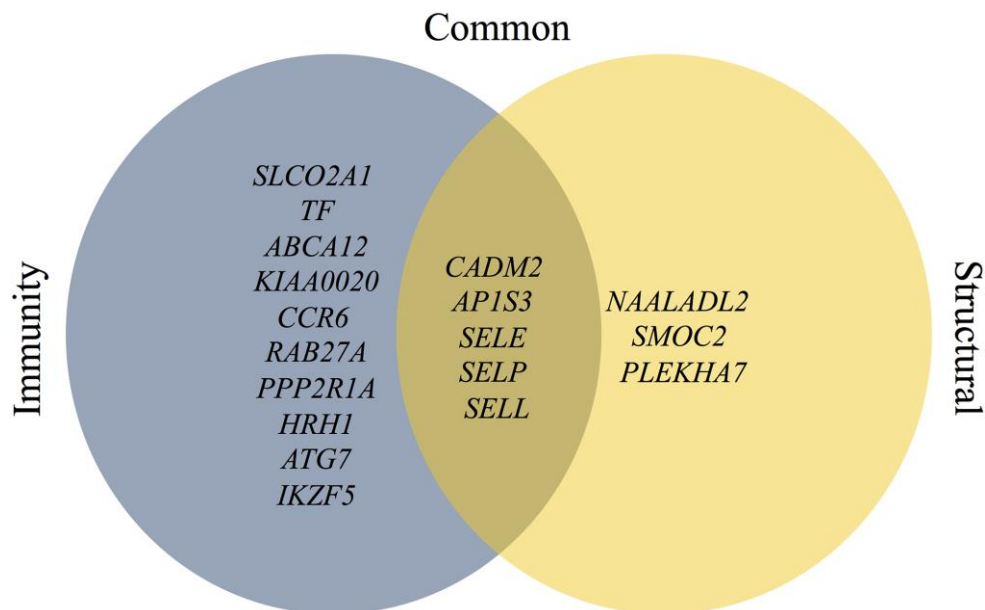
במסגרת חיפוש אחר סמנים גנטיים שינבאו את הסיכון של עגלים צעירים לחלות במחלות נשימה, השתמשנו בפנוטיפ הכשרות בבית המטבחים, המתקבל מיד לאחר השחיטה. הפנוטיפים בהם השתמשנו היו חלק (Glatt, n=120), המאופיין בריאות נקיות מהדבקויות (סירכות) וטרף (n=60), המעיד על אפיוזות של BRD בשלבים מוקדמים בחיי העגל. דוגמאות דם נדגמו מכל אחד מהעגלים לצורך מיפוי גנוטיפי. לצורך כך, דוגמאות דנ"א גנומי הוטענו במקבצים על 777K SNP CHIP. תחילה הוגדרו 23 אזורי QTL ב 13 כרומוזומים אוטוזומליים (טבלה 2). בתוכם נמצאו 1358 סמנים שנבדלו סטטיסטית בין העגלים הטרפים והחלקים. סמנים אלה הופיעו בתוך ובין גנים, ובמרחק של 0.5 Mb מאזורי ה QTL.

טבלה 2. אזורי QTL המציגים הבדלים סטטיסטיים בעגלים עם פנוטיפ חלק וטרף.

Chr	QTLR Nr	Top P
1	3	2.7E-15
2	3	1.4E-07
8	2	1.6E-06
9	3	7.2E-08
10	2	1.6E-07
12	2	8.9E-05
15	2	8.1E-05
16	1	2.0E-05
18	1	2.1E-05
22	1	5.2E-05
24	1	2.8E-05
26	1	1.6E-05
29	1	5.0E-08



מבין 98 הגנים שנמצאו בתוך אזורי ה QTL, בחרנו, מתוך שיקולים ביולוגיים וסטטיסטיים, להתמקד ב 18 גנים (איור 8). על בסיס פעילותם הביולוגית, גנים אלה חולקו לבעלי פעילות חיסונית (10), פעילות ריפוי פצעים (3) ופעילות משותפת (5). בימים אלה התחלנו לאפיין באופן פרטני את הגנים השונים באוכלוסייה נוספת וגדולה יותר של עגלי הולשטיין, כדי להבין האם מוטציות במי מהם יכולה להסביר את השונות ברגישות לתחלואה ב BRD.



איור 8. גנים ממערכת החיסון וריפוי פצעים, המועמדים לתרום להבנת מנגנון הרגישות ל BRD בעגלי הולשטיין.

ביבליוגרפיה

Aich P, Jalal S, Czuba C, Schatte G, Herzog K, Olson DJH, Ross ARS, Potter AA, Babiuk LA, Griebel P (2007). Comparative approaches to the investigation of responses to stress and viral infection in cattle. *OMICS* 11(4): 413-434.

Blecha F, Boyles SL, Riley JG (1984) Shipping suppresses lymphocyte blastogenic responses in Angus and Brahman Angus feeder calves. *J Anim Sci* 59(3): 576-583

Buckham Sporer K.R., Burton J.L., Earley B., Crowe M.A. (2007). Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. *Vet. Immunol. Immunopath.* 118: 19-29.

Cobb JM and Steptoe A (1996). Psychosocial stress and susceptibility to upper respiratory tract illness in an adult population sample. *Psychosom Med* 58: 404-412.

Duff GC and Galyean ML (2007). Board-invited review: Recent advances in

management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 823-840.

Eitam H, Vaya J, Brosh A, Orlov A, Khatib S, Izhaki I and Shabtay A (2010). Differential stress responses among newly received calves: Variations in reductant capacity and Hsp gene expression. *Cell Stress & Chaperones.* 15: 865-876.

Gupta S, Earley B, Crowe MA (2007). Effect of 12-h road transportation on physiological, immunological, and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. *Vet J* 173: 605-616.

Reiche, E.M. et al. (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 5, 617–625.

Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL, Koohmaraie M, Dikeman ME (2007). Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus palatability traits. *J Anim Sci* 85: 1885-1892.

Thompson PN, Stone A, Schultheiss WA (2006). Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. *J Anim Sci* 84: 488-498.

Yagi Y, Shiono H, Chikayama Y, Ohnuma A, Nakamura I, Yagou K.-I (2004). Transportation stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. *Clin Pathol* 66(4): 381–387.