

אפיון מטגנומי של אוכלוסיות החיידקים ברחם של פרות חלב הסובלות ממחלות רחם דלקתיות

רון סיקסיק, שקד דרוקר, תמיר גושן, מאור קדמי, אלון קפלן, טל רז

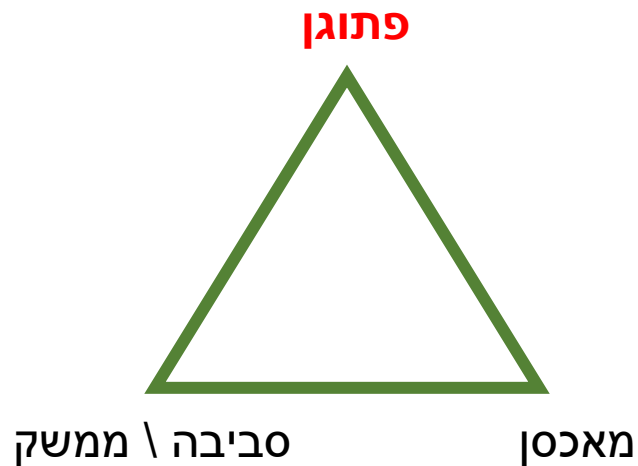


Koret School of Veterinary Medicine
Hebrew University of Jerusalem

The Robert H. Smith Faculty
of Agriculture, Food and Environment



מחלות רחם דלקתיות



- מופיעות בדרך כלל לאחר ההמלטה
- מטריטיס - דלקת רחם קלינית
- מאובחנת ב 5-12 ימים מהמלטה
- רחם גדול, הפרשות מוגלתיות מסריחות
- אנדומטריטיס – Cytological Endometritis (CEM)
- לא מאובחנת שגרתית בישראל
- בד"כ מחלה תת קלינית
- החל מ 21 ימים לאחר ההמלטה
- אבחון בעזרת ציטולוגיה (מטוש \ מברשת)
- ספירת אחוז תאי PMN
- מחלות רב גורמיות
- משפיעות על פוריות עתידית
- זיהום פולימיקרוביאלי?

מטרת המחקר

תאור והשוואה של אוכלוסיות החיידקים ברחם של
פרות חלב בריאות וחולות במחלות רחם דלקתיות
בחודשיים הראשונים לאחר ההמלטה

מבנה המחקר

מטריטיס – בדיקה קלינית
 • 5-12 ימים בתחלובה (DIM)

אנדומטריטיס - ציטולוגיה
 • 30-40 DIM: $\geq 5\%$ PMN
 • 60-70 DIM: $\geq 3\%$ PMN



70-300 DIM
 איסוף נתוני פוריות
 זיהוי ייחומים
 הזרעות
 בדיקות הריון



↑
60-70 DIM

↑
30-40 DIM

↑
5-12 DIM

בדיקה וגינלית וטרנסרקטלית
 מטוש \ מברשת (ציטולוגיה + DNA)
 דם

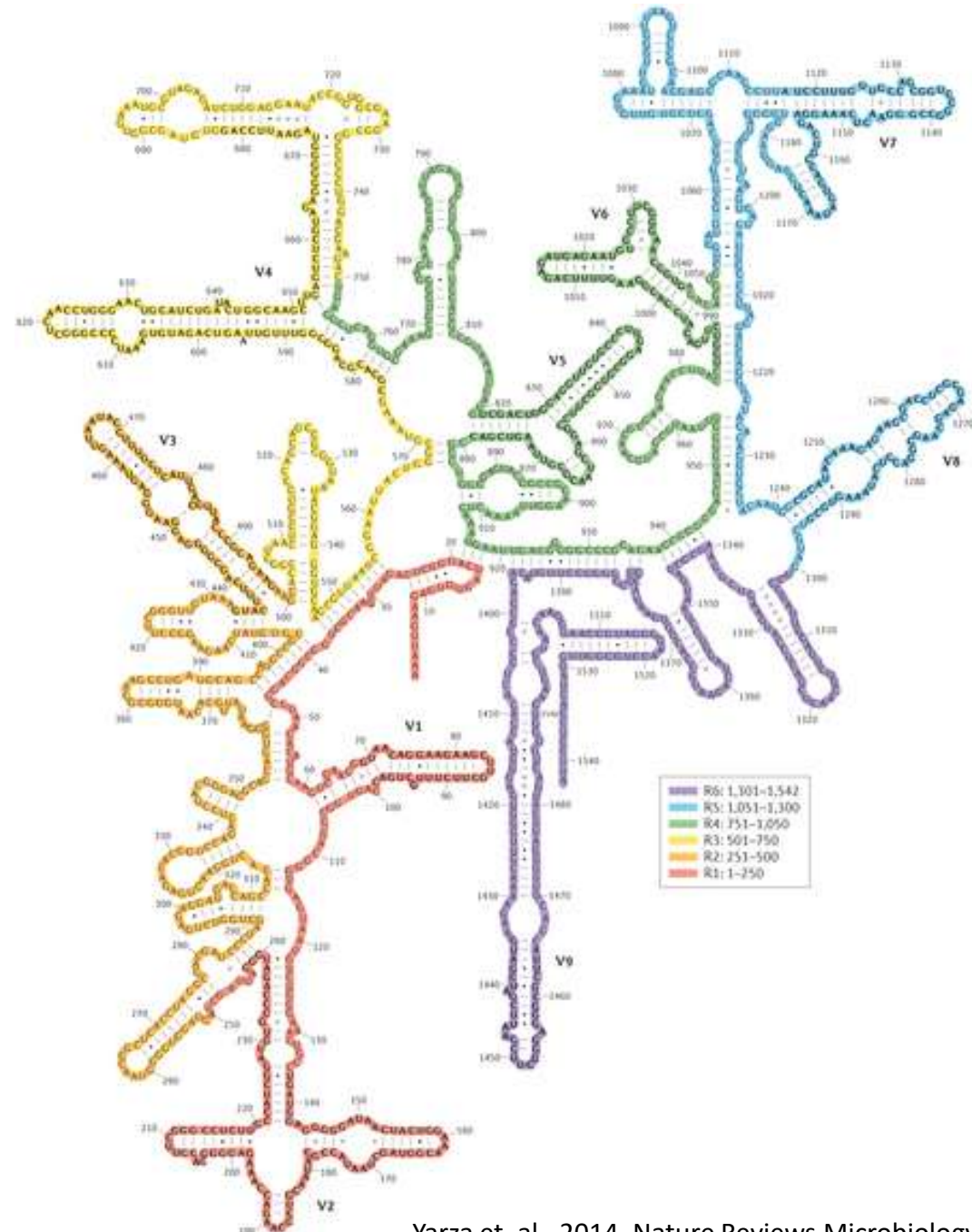
גן 16s rRNA

- משמש למיפוי אוכלוסיות חיידקים

- שמור, משותף לכל החיידקים

- שונה בין סוגים \ מינים שונים

- "טביעת אצבע"



שימוש בגן 16s

הפקת DNA ממטוש \ מברשת

ניתוח עומס חיידקי

הגברה בעזרת qPCR

עקומת כיוול עם פלסמיד

כימות עומס חיידקי

ניתוח אוכלוסיות חיידקים

הגברת מקטעי 16s

ריצוף, ביואינפורמטיקה

זיהוי חיידקים בדגימה

סטטיסטיקה

- ניתוח נפרד לכל נקודת זמן

- חלוקת פרות לקבוצות – בריאות ומטריטיס \ אנדומטריטיס

- **עומס חיידקי**

- Wilcoxon Rank Sum test

- Repeated measures ANOVA

- **מטאגנטיקה – ניתוח אוכלוסיות חיידקים**

- מערכה (phylum)

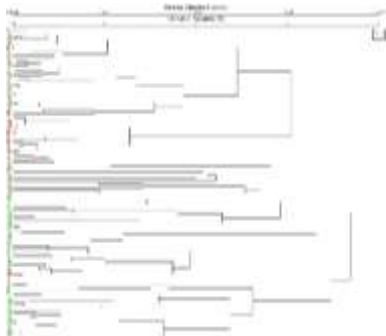
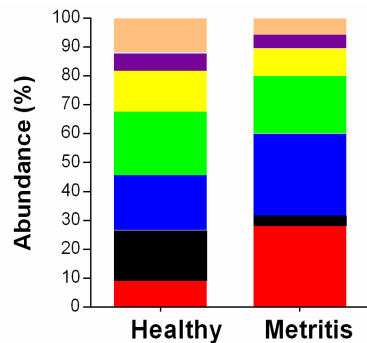
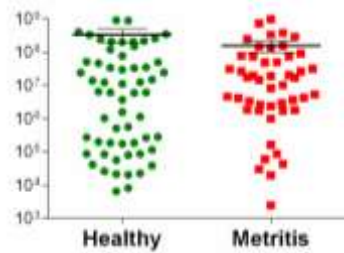
- אחוזי מערכה באוכלוסיה - Wilcoxon Rank Sum test

- סוג (genus) – ניתוח רב משתנים, מרחקי Sorensen

- Non metric multidimensional scaling (NMDS)

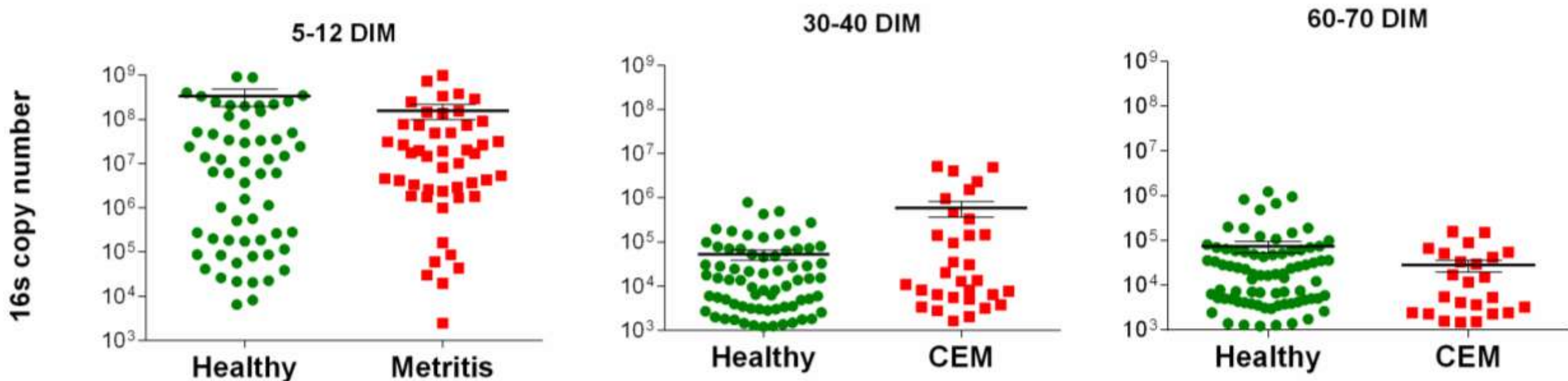
- Hierarchical cluster analysis

- Indicator species analysis



עומס חיידקי

- עומס חיידקי יורד לאורך התחלובה (repeated measures ANOVA, $p < 0.05$)
- אין הבדל בעומס חיידקי בין פרות בריאות לחולות



מטריטיס – ניתוח לפי מערכה

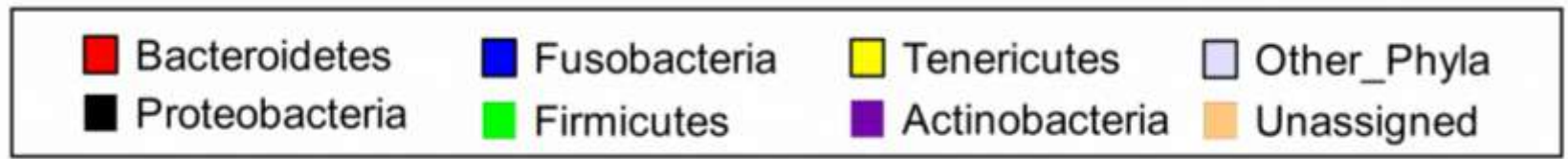
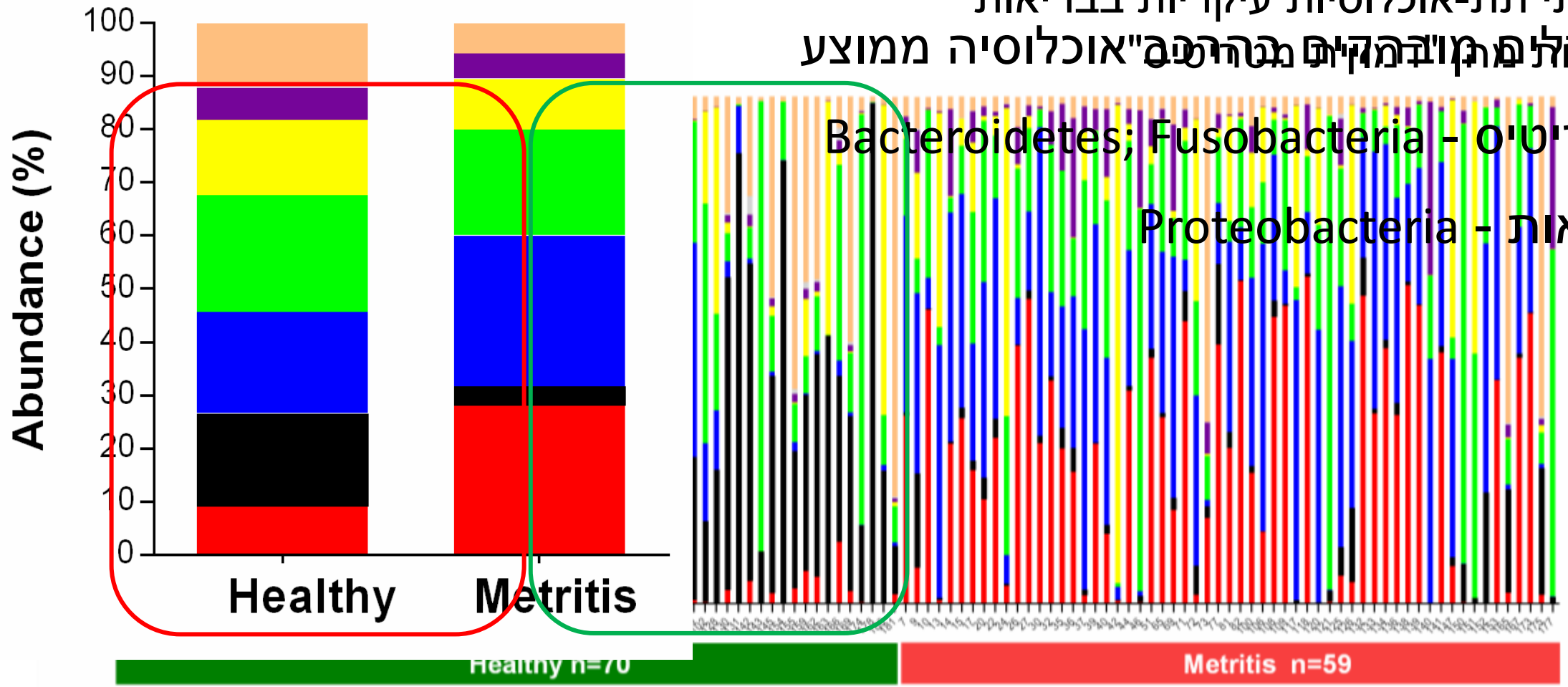
• גרפים פרטניים – הרכב אופייני במטריטיס ומגוון בבריאות

• שתי תת-אוכלוסיות עיקריות בבריאות

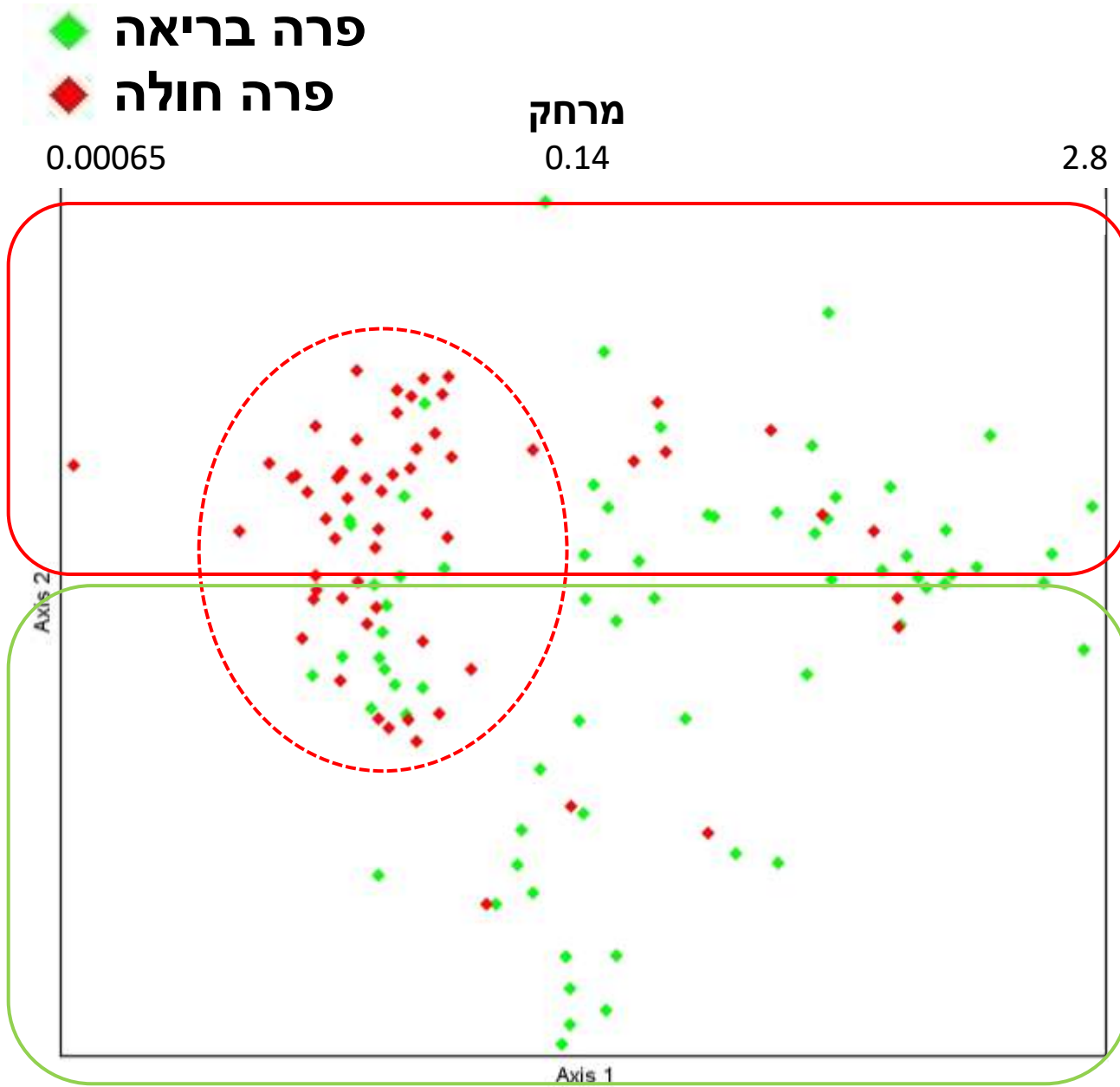
• הגדלה מרובות המינים במטריטיס "אוכלוסיה ממוצע"

• מטריטיס - Bacteroidetes; Fusobacteria

• בריאות - Proteobacteria



מטריטיס – ניתוח לפי סוג



NMDS •

- השוואת מרחקים בין דגימות
- מרחק = שוני בהרכב אוכלוסייה חידקית
- דגימות דומות מתקבצות ביחד

• פרות מטריטיס מתקבצות

- Cluster analysis
- השוואת מרחקים

- פרות מטריטיס יוצרות קבוצה
- מרחקים קטנים בין הפרות

מטריטיס – ניתוח לפי סוג

Genus	Phylum	Clinical Status	Indicator value	P value
Sporanaerobacter	Firmicutes	Metritis	96.5	0.0002
Bacteroides	Bacteroidetes	Metritis	94.2	0.0002
Porphyromonas	Bacteroidetes	Metritis	80.1	0.0008
Tissierella_Soehngenia	Firmicutes	Metritis	79.1	0.0002
Peptostreptococcus	Firmicutes	Metritis	77	0.0004
Peptococcus	Firmicutes	Metritis	76.7	0.0002
Fusobacterium	Fusobacteria	Metritis	75.2	0.0002
Parvimonas	Firmicutes	Metritis	71.8	0.002
Arcanobacterium	Actinobacteria	Metritis	69.8	0.0002
Campylobacter	Proteobacteria	Metritis	67.9	0.0006
Veillonella	Firmicutes	Metritis	67.3	0.004
ph2	Firmicutes	Metritis	62.1	0.0004
Parabacteroides	Bacteroidetes	Metritis	61.9	0.039

- Indicator species •
- שיוך סוג חיידק למחלה \ בריאות •
- מתבססת על שילוב של כמות והימצאות •
- סוגי חיידקים במטריטיס •

- Bacteroides*** •
- Porphyromonas*** •
- Fusobacterium*** •
- Tissierellaceae spp.*** •

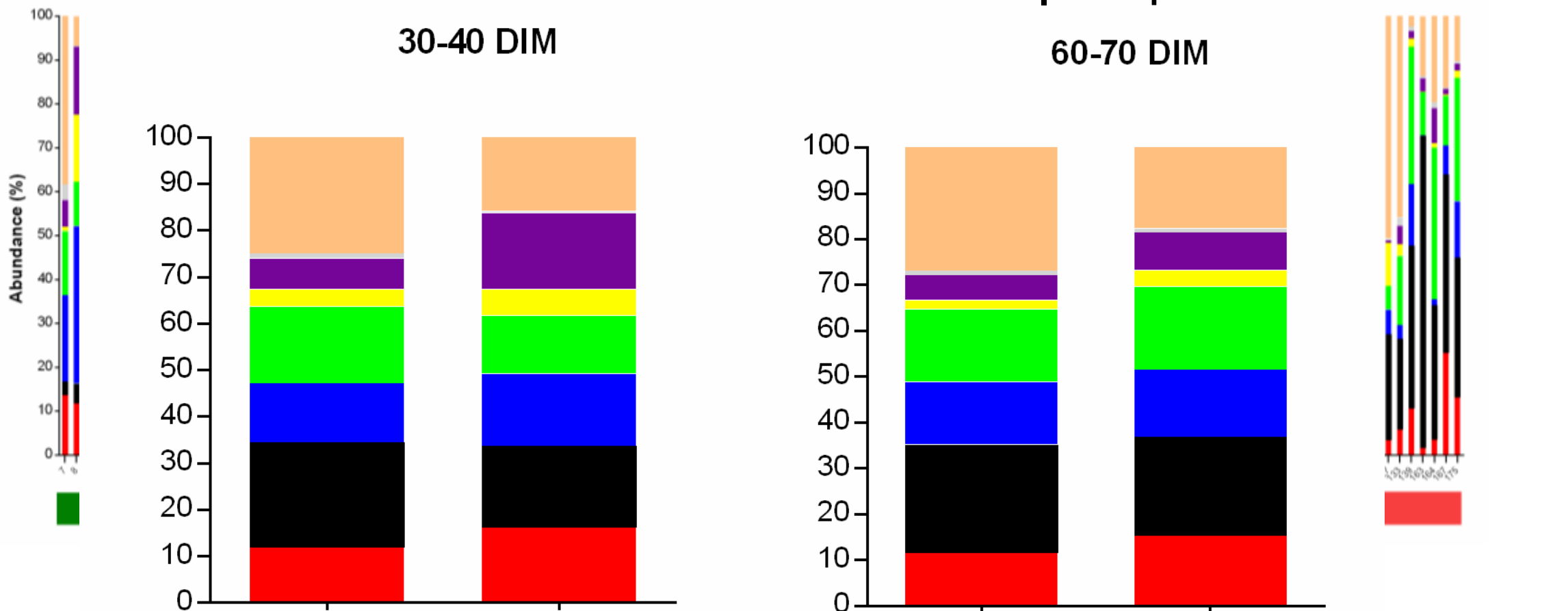
מטריטיס – סיכום ביניים

- לפרות עם מטריטיס יש אוכלוסיית חיידקי רחם אופיינית
- הרכב האוכלוסיה נשלט ע"י הסוגים
 - *Bacteroides* (Bacteroidetes)
 - *Fusobacterium* (Fusobacteria)
 - *Porphyromonas* (Bacteroidetes)
 - *Tissierellaceae* spp.
- בפרות בריאות יש הרכבי אוכלוסייה מגוונים
- לחלק מהפרות הבריאות יש הרכב אוכלוסייה "דמוי מטריטיס"

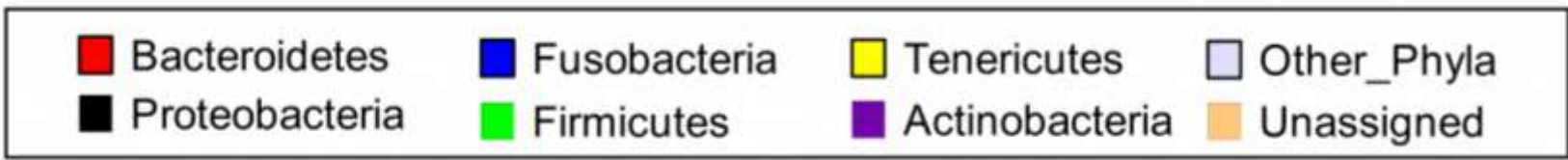
30-40 DIM
60-70 DIM

אנדומטריטיס – ניתוח לפי מערכה

• ללא הבדלים מובהקים בין פרות בריאות וחולות



• שתי תת אוכלוסיות עיקריות בריאות וחולות



30-40 DIM
60-70 DIM

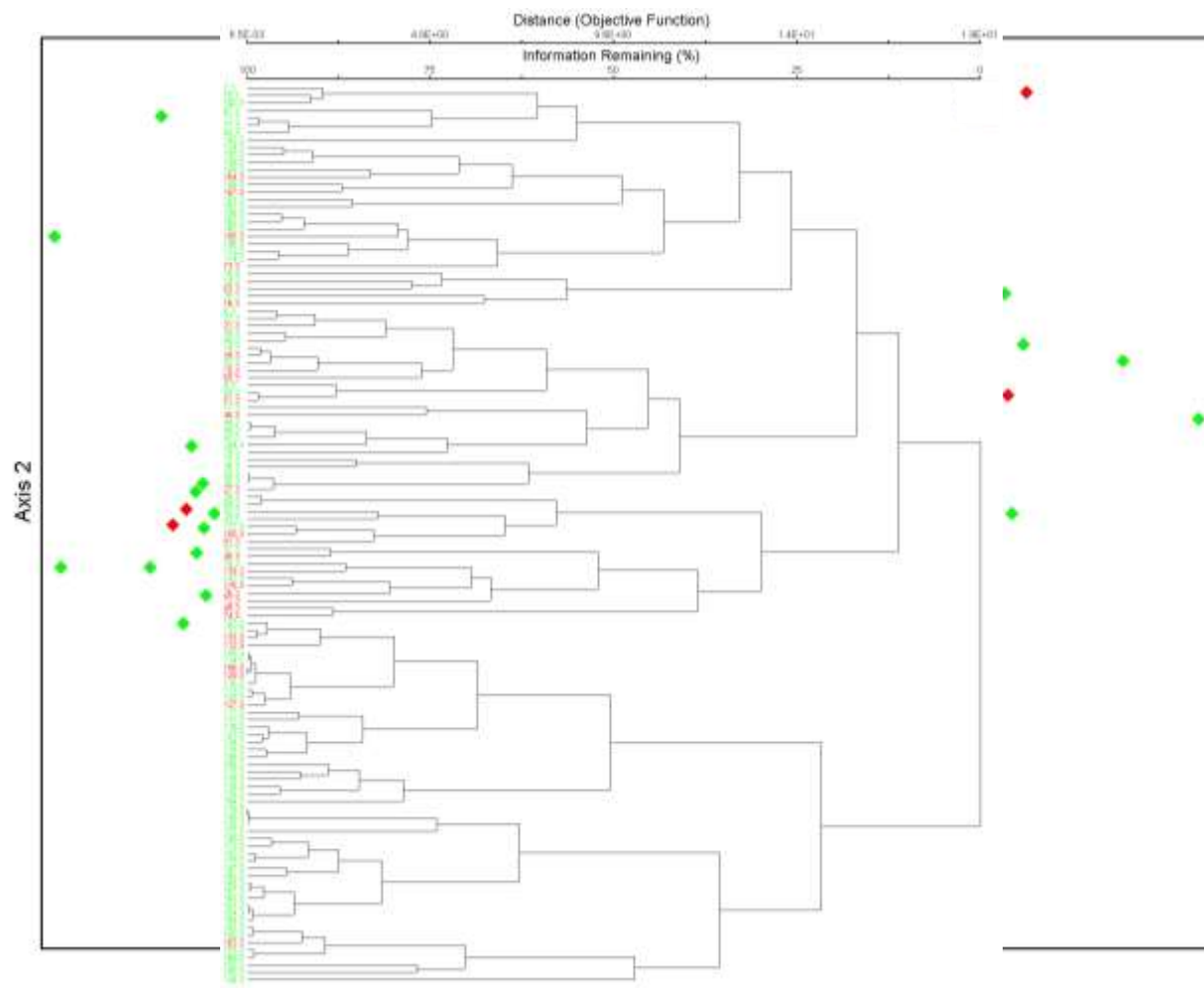
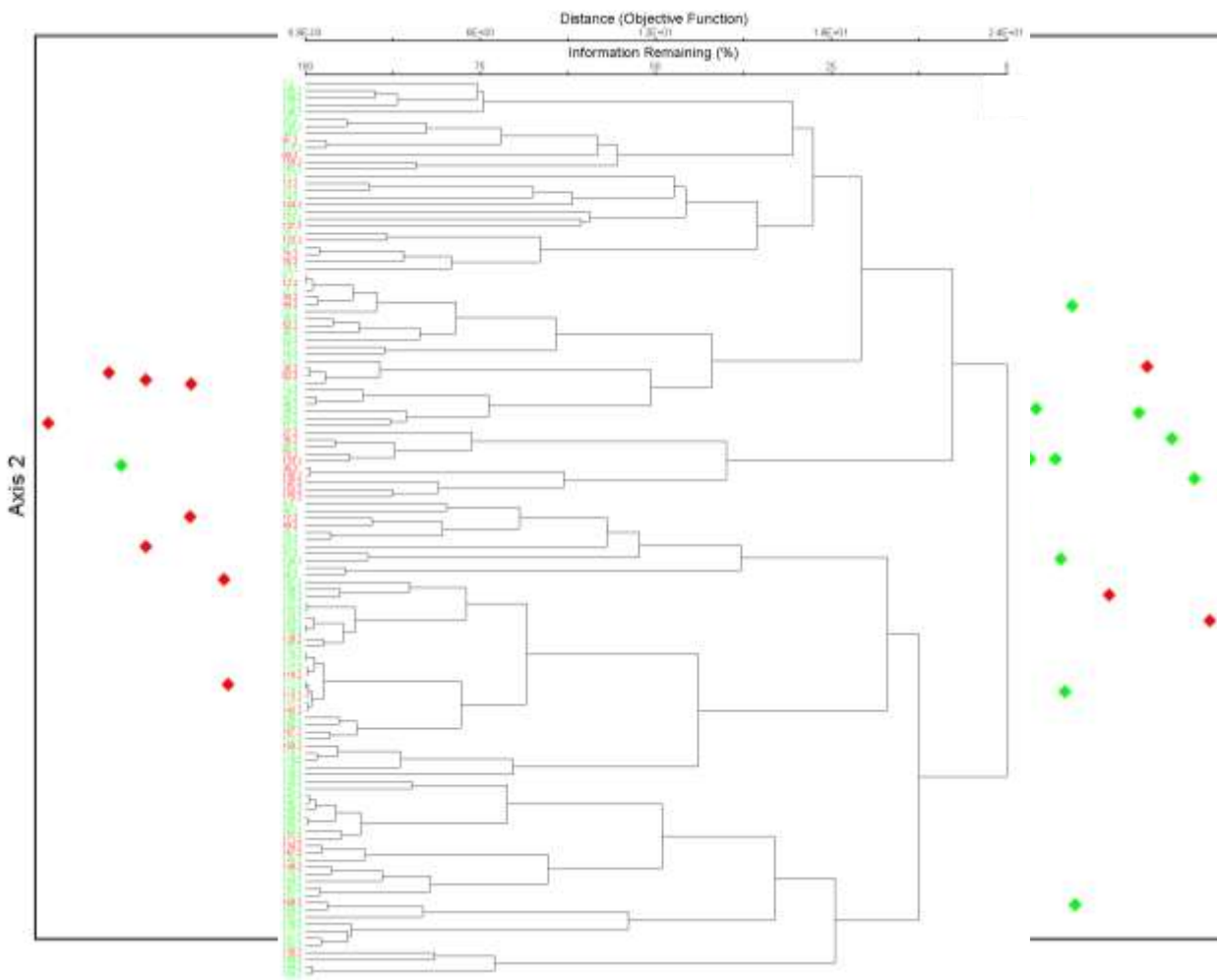
אנדומטריטיס – ניתוח לפי סוג

- פרה בריאה
- פרה אנדומטריטיס

• NMF – ללא התקנת מילפיון

30-40 DIM

60-70 DIM



אנדומטריטיס – ניתוח לפי סוג

Genus	Phylum	DIM	Clinical Status	Indicator value	P value
Alkalibacter	Firmicutes	60-70	CEM	61.2	0.004
Cellvibrio	Proteobacteria	60-70	CEM	69	0.001
Garciella	Firmicutes	60-70	CEM	56.6	0.022
Lutispora	Firmicutes	60-70	CEM	86.7	0.003
Marinobacter	Proteobacteria	60-70	CEM	59.2	0.007
Peptostreptococcus	Firmicutes	60-70	CEM	53.3	0.048
Prevotella	Bacteroidetes	60-70	CEM	65.1	0.005
02d06	Firmicutes	60-70	CEM	61.2	0.026

סיכום

- **עומס חיידקי יורד עם התקדמות בתחלובה, אך לא קשור לתחלואה במטריטיס ובאנדומטריטיס**

- **מטריטיס**

- הרכב קהילת חיידקי רחם אופייני

- *Bacteroides, Fusobacterium, Porphyromonas, Tissierellaceae spp.*

- פרות בריאות עם אוכלוסייה "דמויית מטריטיס"

- **CEM**

- לא נמצא קשר בין אוכלוסיה חיידקית ספציפית לבין אנדומטריטיס

- לא ניתן לשלול פתוגנים אפשריים – *Peptostreptococcus, Prevotella, Lutispora*

תודות

- רפתות:
- בארות יצחק
- גברעם
- אבולש – גינתון
- ויינרב - נחלים

- ד"ר תמיר גושן
- ד"ר מאור קדמי
- ד"ר אלון קפלן
- ד"ר סטפן גרין



- ד"ר טל רז
- ד"ר שקד דרוקר
- חברי מעבדת רז



Koret School of Veterinary Medicine
Hebrew University of Jerusalem

The Robert H. Smith Faculty
of Agriculture, Food and Environment



שאלות???

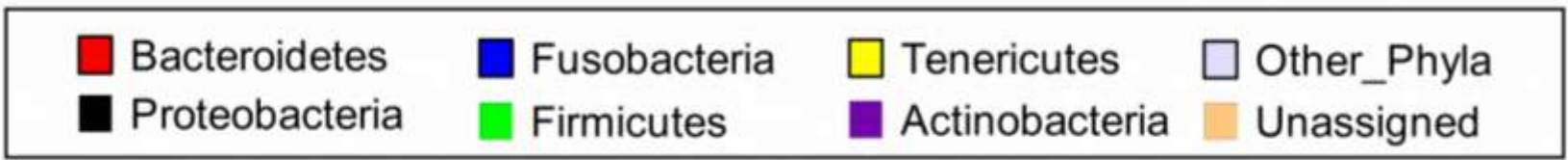
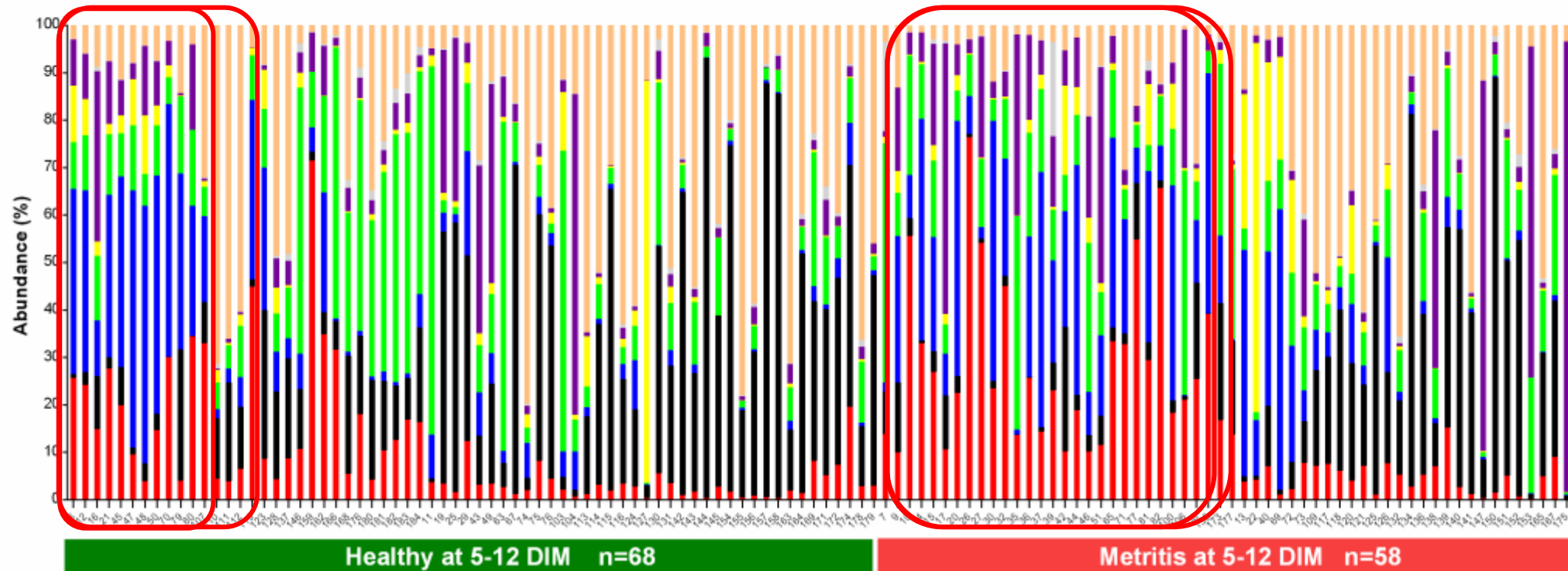


30-40 DIM
60-70 DIM

Bacterial communities over time

- דינמיקה של קהילות חיידקיות ב 30-40 ו 60-70 DIM
- חלוקה לפי בריאות \ מטריטיס ב 5-12 DIM
- אפקט שאריתי של מטריטיס על אוכלוסיית החיידקים?

30-40 DIM



Future directions

- **Metritis**
 - Host–pathogen interactions
 - Compare healthy cows with “Metritis-like” bacterial community to metritis cows
 - Isolate and study metritis associated bacterial species
- **CEM**
 - Cow uterine gene expression
 - Study specific possible pathogens, e.g *Peptostreptococcus*