

**מחלות רחם דלקתיות והשפעתן על הפוריות במשקי הבקר לחלב בישראל –  
אבחון הקשר הפתופיזיולוגי שבין דלקת רחם קלינית לדלקת רחם תת-קלינית**

**Unveiling the links between clinical metritis and subclinical endometritis;  
pathophysiology and effects on fertility in the dairy cow herd**

מוגש להנהלת ענף הבקר לחלב

הדוח מוגש ע"י:

**ד"ר טל רז**, ביה"ס לרפואה וטרינרית, האוניברסיטה העברית, החוקר הראשי, בשם צוות המחקר.  
פרופ' נחום שפיגל, ביה"ס לרפואה וטרינרית, האוניברסיטה העברית.

**תקציר**

מחלות רחם דלקתיות בימים ובשבועות שלאחר ההמלטה מהוות גורם מרכזי בארץ ובעולם המשפיע על הפוריות העתידית של הפרה וייצור החלב, ומעלות את הסיכון להוצאת פרות מהעדר. המטרה הראשית של המחקר הייתה לאפיין את התחלואה בדלקות רחם קליניות מוקדמות (מטריטיס) ודלקות רחם תת-קליניות בהמשך התחלובה (אנדומטריטיס תת-קליני), ואת הקשר הפתופיזיולוגי ביניהן, בפרות חלב הולשטיין פריזי ישראל. במהלך המחקר, פרות ממשקי חלב מסחריים בישראל נבדקו ונדגמו בשלושה מועדים לאחר ההמלטה (5-12DIM, 30-40DIM, 60-70DIM). בהתאם לבדיקה קלינית וציטולוגיה מהאנדומטריום בוצע אבחון של מטריטיס (5-12DIM) או אנדומטריטיס תת-קליני (30-40DIM, 60-70DIM). שיעור הפרות שאובחנו עם מטריטיס ב- 5-12DIM עמד על 45.2%. נקבעו ערכי סף של 6% ו- 2% תאי-דלקת (PMN) במשטח ציטולוגי מהאנדומטריום לאבחון אנדומטריטיס תת קליני ב- 30-40DIM וב- 60-70DIM, בהתאמה, עפ"י מכלול ביצועי הפוריות של הפרות. בהתאם לערכי סף אלו, אנדומטריטיס תת-קליני אובחן ב- 31.1% מהפרות ב- 30-40DIM וב- 60-70DIM. ב- 51.5% מהפרות אובחן אנדומטריטיס תת-קליני לפחות פעם אחת בתקופה של 30-70DIM. נמצא כי פרות שהיו חולות במטריטיס קליני בתחילת התחלובה (5-12DIM) היו בסיכון מוגבר לפתח אנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה (OR=2.32-3.34; P<0.004). ביצועי הפוריות של הפרות הושפעו לרעה הן ממטריטיס והן מאנדומטריטיס תת-קליני. אנליזה מטגנטית של הגן החיידקי 16S rRNA הראתה כי במקרים של מטריטיס קליני בתחילת התחלובה ישנה אוכלוסייה חיידקית האופיינית לתחלואה זו, בעוד שבפרות שהוגדרו כנורמליות (ללא סימנים קליניים) במועד זה אוכלוסיית החיידקים הייתה הטרוגנית. לעומת זאת, לא נמצאה אוכלוסייה חיידקית מאפיינת לאנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה (30-40DIM, 60-70DIM). עם זאת, יודגש כי האנליזות כן הראו הבדלים קטנים אך משמעותיים סטטיסטית בין חולות לבריאות בכל מועדי הדיגום וכי נמצא הבדל מובהק סטטיסטית במערכות *Tenericutes* ו *Fusobacterium*, *Proteobacteria* בדיגום שבוצע ב- 60-70DIM. מחקרים בעתיד יתמקדו באפיון תגובת הפרה (host immunity) במטריטיס ובאנדומטריטיס תת-קליני, לצורך הבנה טובה יותר של הפתופיזיולוגיה של מחלות אלו.

## 1] מבוא

תחום הפוריות בענף הבקר לחלב מהווה חלק מרכזי הן מבחינה ממשקית והן מבחינה כלכלית [1, 2]. על אף השיפור בתחומים רבים בענף זה (כגון: הזנה, תנובת חלב, רפואה מונעת ועוד) בעיות הפוריות בעדר הפרות לחלב בישראל ובעולם חמורות וגורמות לנזק כלכלי וממשקי. אומנם חל שיפור משמעותי בזיהוי הייחומים, בטיפולים ההורמונליים הזמינים לרופא הווטרינר, ובאמצעים להקטין את השפעת עקת החום בחודשי הקיץ, אך עדיין, מדדי הפוריות (כגון: ימי ריק, אחוז התעברות מהזרעה ראשונה ושניה וכו') מראים בבירור על בעיות פוריות בענף הבקר לחלב [3-5].

מחלות רחם דלקתיות בימים ובשבועות שלאחר ההמלטה מהוות גורם מרכזי בארץ ובעולם המשפיע על הפוריות העתידית של הפרה וייצור החלב, ומעלות את הסיכון להוצאת פרות מהעדר [1, 2, 6-9]. על פי נתוני רפואת העדר בחקלאית ומחקר שערך צוות המחקר בשנים האחרונות, כ-40% מהפרות בישראל סובלות מדלקת רחם קלינית מוקדמת (להלן 'יקרא 'מטריטיס'), וברפתות רבות מגיעים שעורי התחלואה עד לכדי 50% מהפרות הממליטות. כתוצאה מכך נגרמים נזקים כבדים מירידה בתנובת החלב ופגיעה בפוריות [8, 10, 11]. מטריטיס מופיעה בפרות בימים שלאחר ההמלטה, ומאופיינת ברחם מוגדל, הפרשות מוגלתיות מסריחות מהנרתיק, עם או בלי סימנים סיסטמיים.

מחקרים ממקומות שונים בעולם מראים שכ- 10-30% מהפרות במשקי החלב סובלות מדלקת רחם תת-קלינית (להלן 'יקרא 'אנדומטריטיס תת-קלינית') בשלבים מאוחרים יותר בתחלואה [6, 12-15]. עם זאת, בישראל, שיטת העבודה הנהוגה מתעלמת ממצב זה הן מבחינת אבחון והן מבחינת הטיפול האפשרי בפרות. אנדומטריטיס תת-קלינית מאובחנת עפ"י בפרה בתקופה של מעל 30 ימים מההמלטה (DIM) עם ציטולוגית רחם (endometrial cytobrush) המעידה על דלקת, ללא סימנים סיסטמיים [12, 18]. עד לביצוע מחקר זה לא נעשה כל ניסיון לאבחון דלקות רחם תת-קליניות בישראל או כל ניסיון מחקרי להבנת התחלואה התת-קלינית והשפעתה על מדדי הפוריות ויעילות הרפת הישראלית. מעבר לכך, עד לביצוע מחקר זה לא נחקר הקשר האפשרי שבין דלקת רחם קלינית מוקדמת, דהינו מטריטיס, לבין התפתחות אנדומטריטיס תת-קלינית בשלבים מאוחרים יותר, לא נחקרה מעורבותם של חיידקים בדלקת רחם תת-קלינית (במחקרים הקיימים בוצעה רק ציטולוגיה), ולא היה ברור האם ישנן פרות שמפתחות דלקת רחם תת-קלינית ללא קשר לתחלואה בדלקת רחם קלינית מוקדמת בימים שלאחר ההמלטה [15-17].

המחקר הנוכחי עוצב במטרה לחקור ולאפיין את התחלואה בדלקות רחם קליניות מוקדמת ודלקות רחם תת-קליניות, ואת הקשר ביניהן, בעדר פרות החלב בישראל, מתוך רצון להבין בצורה טובה יותר את הפתופיזיולוגיה שבין דלקת רחם קלינית מוקדמת, דהינו מטריטיס, (פרה בימים שלאחר ההמלטה, עם רחם מוגדל, הפרשות מוגלתיות מסריחות מהנרתיק) לבין התפתחות אנדומטריטיס תת-קלינית (פרה מעל 30 ימים מההמלטה, עם ציטולוגית רחם שנלקחת בעזרת endometrial cytobrush ומעידה על דלקת, ללא סימנים סיסטמיים) בשלבים מאוחרים יותר [12, 18]. בהתאם לזאת, השערות המחקר הראשוניות

היו: 1) קיים קשר פתופיזיולוגי בין דלקת רחם קלינית מוקדמת לבין התפתחות דלקת תת-קלינית בשלב מאוחר יותר, 2) מצב דלקתי תת-קליני ממושך ברחם מהווה גורם מרכזי שמביא לירידה בשיעורי ההתעברות ובהתארכות ימי הריק של הפרה בישראל, 3) חיידקים מעורבים בהתפתחות התהליך הדלקתי ברחם.

## **[2 מטרת המחקר:**

**המטרה הראשית** של המחקר הייתה לאפיין את התחלואה בדלקות רחם קליניות מוקדמות ודלקות רחם תת קליניות, ואת הקשר הפתופיזיולוגי ביניהן, בעדר פרות החלב בישראל.

**המטרות הספציפיות** של המחקר:

- א. אבחון נוכחות דלקות רחם תת קלינית בעזרת endometrial cytobrush cytology בישראל.
- ב. הערכת ההיארעות של דלקות רחם קליניות ודלקות רחם תת-קליניות.
- ג. הבנת השפעת דלקת קלינית ותת-קלינית על ביצועי הפרה ( כגון: תנובת חלב, ימי ריק, התעברות מהזרעה ראשונה ושניה).
- ד. זיהוי ואפיון האוכלוסייה המיקרוביאלית המעורבת בדלקות רחם קליניות (מטריטיס) ודלקות רחם תת-קליניות (אנדומטריטיס תת-קליני).
- ה. הבנת הפתופיזיולוגיה שבין דלקת רחם קלינית (מטריטיס) ודלקת רחם תת-קלינית (אנדומטריטיס תת-קליני).

## **[3 אופן ביצוע המחקר**

**איסוף הדגימות בשדה**

במהלך המחקר, פרות הולשטיין ישראלי (n=259) מארבעה משקי חלב מסחריים בישראל נבדקו בשלושה מועדים לאחר ההמלטה. הבדיקה הראשונה בוצעה 5-10 ימים מההמלטה (DIM) ובה נבקשה נוכחות של דלקת רחם קלינית ע"ס סימנים קליניים, בדיקה וגינאלית, ובדיקת מערכת הרבייה בבדיקה טרנס-רקטלית. פרה אובחנה כסובלת מדלקת רחם קלינית כאשר זוהו הפרשות פורולנטיות מסריחות מהנרתיק עם רחם מוגדל, עם או בלי סימנים סיסטמיים אחרים. פרה נחשבה כלא סובלת מדלקת רחם קלינית כשלא נמצאו הסימנים הנ"ל. בבדיקה זו נילקח דגימה טרנס-צרביקלית סטרילית מהאנדומטריום בעזרת מטוש-double guarded endometrial cotton swab, ששימש הן להכנת משטחי ציטולוגיה על משטחי זכוכית סטריליים והן לשמירת חומר ביולוגי לבדיקת הימצאות וסוג אוכלוסיית החיידקים (נשמר ב PBS ב-80°C עד לאנליזה מעבדתית). הבדיקה השנייה והבדיקה השלישית של כל פרה בוצעו ב DIM-30-40 ימים וב-60-70DIM, בהתאמה. במועדים אלו הפרה נבדקה באותו האופן, ונלקחה דגימה טרנס-צרביקלית סטרילית

מהאנדומטריום בעזרת מטוש double-guarded endometrial brush, ששימש הן להכנת משטחי ציטולוגיה והן לשמירת חומר ביולוגי לבדיקת הימצאות וסוג אוכלוסיית החיידקים (מיצוי DNA לצורך אנליזה מטאגנטית, כמתואר לעיל).

כל המידע הרלבנטי לגבי פרות המחקר, כגון נתונים סביבתיים, תנובת חלב, תחלואה במחלות אחרות, ביצועי פוריות ועוד, נאסף מתוכנות ניהול העדר במשקים המשתתפים במחקר, ונתח לצורך זיהוי גורמי סיכון לתחלואה והבנה של ביצועי הפרות.

### ציטולוגיה

לאחר לקיחת דגימה מהרחם, המטוש \ מברשת גולגלו על גבי שתי זכוכיות נושא סטריליות. לאחר מכן, קצה המברשת נקטם בעזרת קאטר סטרילי, והדגימות נשמרו בחנקן נוזלי עד להעברתם להקפאה בפריזר בטמפ' של  $-80^{\circ}\text{C}$  עד להפקת חומצות גרעין, כפי שמפורט בהמשך. משטח אחד נצבע בצביעת Modified Wright's, והשני קובע במתנול לצביעה עתידית. במשטחים הצבועים נספר מספר קבוע של 300 תאים למשטח בהגדלה של X40 וממנו חושבו אחוזי תאי אפיתל, תאים פולימורפונוקלארים (PMN) ולימפוציטים (ספירה מבדלת, התבצעה ללא ידיעת זהות הפרה; blinding, ע"י בודק יחיד). נתוני הציטולוגיה שימשו לצורך הגדרת ערך סף של אחוז תאי ה-PMN במשטח המעידים על אנדומטריטיס תת-קליני ב 30-40DIM, וב- 60-70DIM, בהתאם למדדי הפוריות של הפרה.

### הפקת DNA

חומצות גרעין הופקו מהמטושים \ מברשות בפרוטוקול המבוסס על מודיפיקציה של השיטה שתוארה ע"י Chomczynski et al [19] ע"י תמיסה שיוצרה in-house, ובהתאם להוראות העבודה של ריאגנט TRIzol מסחרי. חומצות הגרעין התקבלו בניצולת גבוהה יותר וברמת ניקיון טובה יותר לפי מדדי 260/230 260/280 שנמדדו בעזרת מכשיר NanoDrop2000, יחסית להפקה עם הריאגנט המסחרי.

### אנליזה מטאגנטית

ה-DNA שהופק מהמטושים עבר ריאקציית PCR להגברת מקטע (515f-806r) של הגן החיידקי המקודד ל-16S rRNA שכלל את האיזור ההיפר-ואריאבילי V4. תוצרי ה-PCR נשלחו למעבדתו של ד"ר סטפן גרין ב- University of Illinois in Chicago ארה"ב, לצורך ריצוף ואנליזה מטאגנומית ראשונית (ניקוי וסינון רצפים, שיוך רצפים ליחידות טקסונומיות) בעזרת תכנת QIIME [20]. לאחר קבלת תוצאות האנליזה הראשונית, נבדקו תוצאות הדגימות לפי ימים בתחלובה וסטטוס קליני (מטריטיס- נקייה \ חולה, למועד הדיגום ראשון), או בהתאם לתוצאות הציטולוגיה (אנדומטריטיס תת-קליני: נקייה /חולה, לכל אחד ממועדי הבדיקה השנייה והשלישית).

ניתוח רב משתני של הנתונים (לפי מיון של החיידקים ברמת הסוג (genus)) בעזרת מרחקי Sorensen נעשה בתוכנת PC-Ord 6 (MjM Software, Glenden Beach, OR). נבדקו מדדי אוכלוסיה כגון אינדקס גיוון של Shannon, אחידות (Evenness) ועושר מינים. הבדלים בין הקבוצות חושבו לפי שיטת MRPP [21]. גודל ההבדל בין הקבוצות מיוצג ע"י ערך A, ומובהקות ההבדל ע"י ערך P. בוצעה אנליזה של Indicator Values (IV) המשייכת סוגי חיידקים למצב קליני מסוים בהסתמך על שפיעה והימצאות בקבוצות השונות [22]. בנוסף הופקו גרפים בדו- ותלת- מימד של Non-metric Multi- (N-MDS) Dimensional Scaling) עם 500 איטרציות וגרפים של cluster analysis לפרות בכדי לבדוק חלוקה לקבוצות, עפ"י סטטוס הפרה במועדי הדיגום שונים [23].

### אנליזה סטטיסטית

ניתוח הנתונים נעשה ע"י תוכנת Statistix 8 (Statistix 8 Student Edition; Analytical Software). סטטיסטיקה תיאורית בוצעה לחישוב נתוני המדדים, כגון ממוצע, חציון, סטיית תקן, טעות תקן של הממוצע, רווח בר סמך של 95% וכן בדיקה של צורת התפלגות התוצאות. בכדי להשוות האם ההבדלים במדדים אלו שונים משמעותית בין הקבוצות שונות (כגון פרות שאובחנו בבדיקה כחולות מול בריאות) נעשה שימוש ב- Wilcoxon Rank Sum Test, Repeated Measure ANOVA, Pearson  $\chi^2$  test, analysis או באנליזת הישרדות עם LogRank. אם לא צוין אחרת, התוצאות מוצגות כ- Mean $\pm$ SEM. ערך סטטיסטי מובהק נחשב כש-  $P \leq 0.05$ .

## 4 [תוצאות ודיון

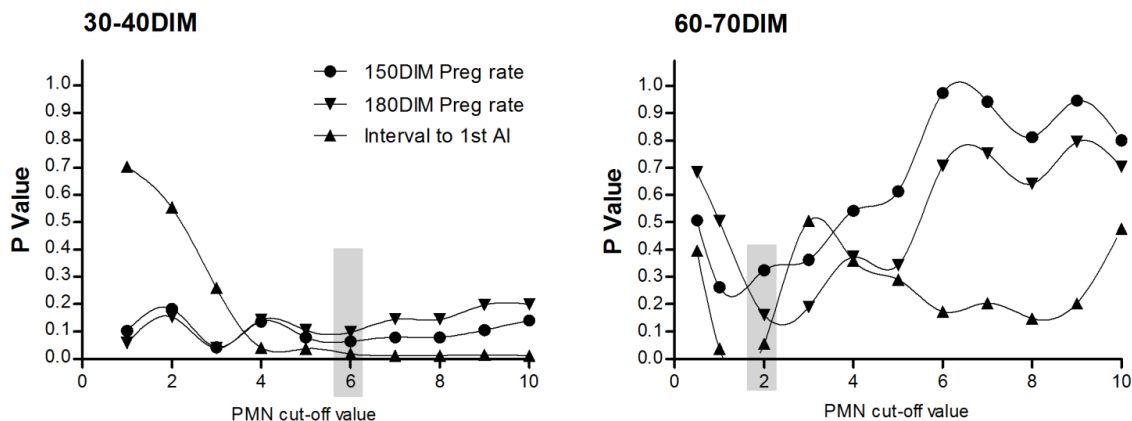
### מדדים כלליים

רוב הפרות (64.5%) שנדגמו היו מתחלובה ראשונה ושניה. טווח התחלובות נע בין 9-1. 35.5% מהפרות שנדגמו היו מבכירות, 28.9% בתחלובה שנייה, 16.2% בתחלובה שלישית, ו 19.3% בתחלובה רביעית ומעלה. ציון המצב הגופני של הפרות תאם את הציפיות מבחינת הזמן שעבר מההמלטה, עם ירידה ממוצעת של 0.35 נקודות בציון המצב הגופני לאורך תקופת הדיגום. רוב הירידה נצפתה בין ההמלטה לדיגום השני ב 30-40DIM. בתקופה זו איבדו הפרות בממוצע 0.28 נקודות בציון במצב הגופני בממוצע. מתוך 259 הפרות שנדגמו, הושלמו שלושה דיגומים ב 197 פרות. כיוון שמדובר במחקר עוקבה, עבור רוב הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו עבור פרות אלו בלבד. שיעור התחלואה במטריטיס, כפי שאובחן בבדיקה הראשונה (5-12DIM) היה 45.2%, כפי שמצוין בטבלה 1.

### קביעת ערכי סף של % PMN להגדרת אנדומטריטיס תת-קליני

בכדי לחשב את ערך הסף של אחוז תאים פולימורפונוקלארים (PMN) המגדיר אנדומטריטיס תת-קליני ב 30-40DIM וב 60-70DIM, ביצענו אנליזת הישרדות לקבוצות של פרות נקיות וחולות שחולקו לפי תוצאות הציטולוגיה של כל פרה, בערכי סף עולים, באופן מדורג מ 0.5% עד 10% PMN, למדדי הפוריות הבאים: התעברות עד 150DIM, התעברות עד 180DIM, וימים עד להזרעה ראשונה. ערכי ה- P value של מבחן Log Rank לכל המדדים בכל אחד מהספים הושו, כפי שניתן לראות בתרשים 1. כפי שניתן לראות, הערכים הנמוכים ביותר, במשותף, התקבלו בערכי סף של 6% PMN ב 30-40DIM, ו- 2% PMN ב 60-70DIM. אי לכך, נבחרו ערכים אלו כערכי סף לאבחון ציטולוגי של אנדומטריטיס תת-קליני במועדים הרלוונטיים. בהתאם לזאת, אנדומטריטיס תת קליני אובחן ב 31.1% מהפרות בבדיקה שבוצעה ב-30-40DIM, וב- 31.1% מהפרות בבדיקה שבוצעה ב-60-70DIM. אבחון תחלואה במטריטיס, אנדומטריטיס תת-קליני ב- 30-40DIM, וב- 60-70DIM היתה בפרות שונות, דהיינו, היו פרות שפיתחו אנדומטריטיס תת-קליני בשלבים מתקדמים בתחלובה גם ללא תחלואה במטריטיס, ולהפך, כפי שניתן לראות בנתונים המוצגים בהמשך. סה"כ, ב- 51.5% מהפרות אובחן אנדומטריטיס תת-קליני בתקופה של 30-70DIM.

**תרשים 1: גרף של ערכי P values למבחן הישרדות Log Rank, לערכי % PMN שונים (0.5%-10%), לשלושה מדדים: התעברות עד 150DIM, 180DIM, וזמן להזרעה ראשונה. ניתן לראות כי ב 30-40DIM (שמאל) הערכים הנמוכים מתכנסים במשותף בסף של 6%, ובבדיקה של 60-70DIM (ימין) בסף של 2%.**



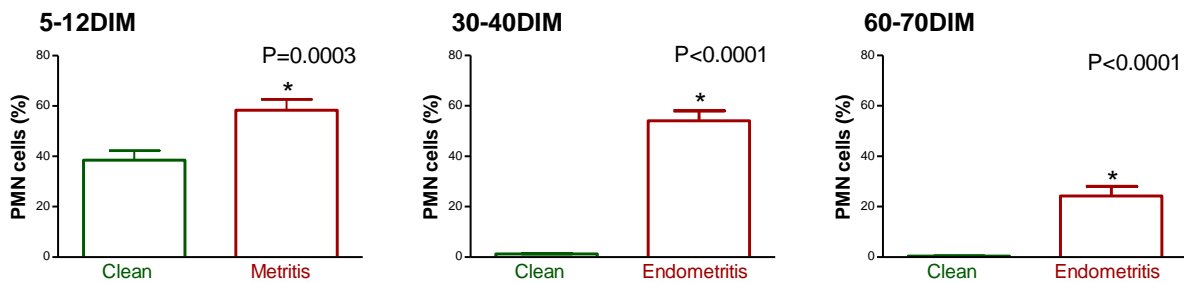
**טבלה 1: שיעור התחלואה במטריטיס (5-12DIM) ואנדומטריטיס תת-קליני במועדי הדיגום השונים (30-40DIM, 60-70DIM, או ב 30-70DIM) בפרות חלב הולשטיין פריזי ישראלי**

אבחון	מועד הבדיקה	אופי האבחון	שיעור תחלואה
מטריטיס קליני בבדיקה ראשונה	5-12DIM	בדיקה קלינית	45.2% (89/197)
אנדומטריטיס תת קליני בבדיקה השנייה	30-40DIM	אבחון ציטולוגי PMN≥6%	31.1% (62/196)
אנדומטריטיס תת קליני בבדיקה השלישית	60-70DIM	אבחון ציטולוגי PMN≥2%	31.1% (62/196)
אנדומטריטיס תת קליני כולל* (בבדיקה שנייה או שלישית)	30-70DIM	אבחון ציטולוגי, כמצוין לעיל	51.5% (101/196)

\* בחישוב אנדומטריטיס תת קליני כולל כל פרה נספרה פעם אחת בלבד. לדוגמא, אם פרה אובחנה עם אנדומטריטיס תת-קליני גם בבדיקה השנייה וגם בשלישית, הדבר נחשב למקרה אחד.

כפי שניתך לראות בתרשים 2, תוצאות הציטולוגיה הראו כי אחוז תאי ה- PMN היה גבוה באופן מובהק בפרות שאובחנו עם מטריטיס קליני, או אנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה, יחסית לפרות שאובחנו כנקיות.

**תרשים 2: תוצאות ציטולוגיה (%PMN) בפרות שאובחנו עם מטריטיס (5-12DIM), או אנדומטריטיס בהמשך התחלובה (30-40DIM או 60-70DIM):**



\*Wilcoxon Rank Sum Test

**הקשר בין תחלואה במטריטיס מוקדם לתחלואה באנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה**  
 לאחר קביעת ערכי סף, חישבנו את שיעור הפרות הנקיות והחולות בכל מועד דיגום, ואת הסיכון, לפי יחס צולב (Odds Ratio, OR), של פרות שהיו חולות במטריטיס קליני בתחילת התחלובה לפתח אנדומטריטיס תת-קליני בהמשכה (בכל מועד דיגום בנפרד, ובאופן כללי במשך תקופת המחקר). התוצאות מוצגות בטבלה 2.

**טבלה 2: שיעורי תחלואה וקשר בין מטריטיס קליני מוקדם לאנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה**

P value	OR	מטריטיס קליני מוקדם		
		כן 45.2% (89/197)	לא 54.8% (108/197)	
<b>0.1826</b>	<b>1.51</b>	<b>36% (32/89)</b>	<b>27.1% (29/107)</b>	<b>אנדומטריטיס תת קליני (30-40DIM)</b>
<b>0.0001</b>	<b>3.34</b>	<b>44.9% (40/89)</b>	<b>19.6% (21/107)</b>	<b>אנדומטריטיס תת קליני (60-70DIM)</b>
<b>0.0037</b>	<b>2.32</b>	<b>62.9% (56/89)</b>	<b>42.1% (45/107)</b>	<b>אנדומטריטיס תת קליני (30-70DIM)</b>

מטבלה 2 ניתן ללמוד כי לפרות שחלו במטריטיס קליני בתחילת התחלובה ישנו סיכון מוגבר באופן מובהק לפתח אנדומטריטיס תת קליני ב 60-70DIM (OR=3.34), או בכל התקופה של 30-70DIM באופן כללי (OR=0.0037). ממצאים אלו יכולים להיות מוסברים ע"כ שאולי אנדומטריטיס תת-קליני הוא המשך התחלואה של מטריטיס מתחילת התחלובה, אבל בצורה תת-קלינית, או לחילופין, שמטריטיס קליני בתחילת התחלובה גורם לנזקים באנדומטריום הגורמים לרחם הפרה להיות מועד לפתח אנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה.

לא נמצא סיכון מוגבר של פרה עם אנדומטריטיס תת-קליני ב 30-40DIM להיות חולה באנדומטריטיס תת-קליני ב- 60-70DIM.

### מדדי פוריות

אנליזה של ביצועי הפוריות בוצעה בנפרד לכל אחד ממועדי הדיגום במחקר. בכל פעם הושאו ביצועי הפוריות של פרות נקיות לעומת פרות חולות. התוצאות מוצגות בטבלאות 3, 4 ו- 5 עבור פרות עם מטריטיס, אנדומטריטיס תת קליני ב 30-40DIM, ואנדומטריטיס תת-קליני ב 60-70DIM, בהתאמה.



**טבלה 3: ביצועי פוריות של פרות 'נקיות' מול פרות שאובחנו עם מטריטיס קליני בבדיקה שבוצעה ב- 5-12DIM**

פרמטר	נקיות	מטריטיס	P value	מבחן סטטיסטי
שיעור תחלואה	54.8% (108/197)	45.2% (89/197)	---	
זמן הזרעה ראשונה (DIM)	94.5±2.2d	101.2±3.1d	0.0774 0.0013	T-test Kaplan-Meir(LogRank)
סה"כ הזרעות	2.8±0.2	2.8±0.2	0.9173	T-test
מס' הזרעות להתעברות	2.6±0.2	3±0.2	0.2192	T-test
שיעור התעברות מהזרעה I	26.4% (28/106)	26.3% (21/80)		Pearson's Chi-Square
ימי ריק	160±7 (141; 102, 203)	180±9 (171; 115, 235)	0.0529 0.1135	Wilcoxon Rank Sum Test Kaplan-Meir(LogRank)
ימי סרק	52±7 (38; 0, 97)	58±7 (42; 0, 92)	0.5742	T-test
שיעור התעברות 150DIM	48.1% (52/108)	41.6% (37/89)	0.3899	Pearson's Chi-Square
שיעור התעברות 180DIM	56.5% (61/108)	53.9% (48/89)	0.7202	Pearson's Chi-Square

\*תוצאות מוצגות כ Mean±SEM, (Median; 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> quartiles), או כאחוזים (%).

**טבלה 4: ביצועי פוריות של פרות 'נקיות' מול פרות שאובחנו עם אנדומטריטיס תת-קליני בבדיקה שבוצעה ב- 30-40DIM**

פרמטר	נקיות	אנדומטריטיס 30-40DIM	P value	מבחן סטטיסטי
שיעור תחלואה	68.9% (135/196)	31.1% (61/196)	---	
זמן הזרעה ראשונה (DIM)	94.6±2.1d	103.8±3.6d	0.0164 0.0334	Wilcoxon Rank Sum Test Kaplan-Meir(LogRank)
סה"כ הזרעות	2.7±0.2	3±0.3	0.2267	Wilcoxon Rank Sum Test
מס' הזרעות להתעברות	2.7±0.2	2.9±0.3	0.4617	Wilcoxon Rank Sum Test
שיעור התעברות מהזרעה I	28.3%(36/127)	22.4%(13/58)		Pearson's Chi-Square
ימי ריק	161.8±7 (143; 102, 203)	183.6±10 (181; 120, 233)	0.0376 0.1652 0.0976	Wilcoxon Rank Sum Test Kaplan-Meir(LogRank) Gehan-Breslow-Wilcoxon Test
ימי סרק	52.5±0.1 (37.5; 0, 95)	57.6±8.2 (43; 0, 105)	0.3885	Wilcoxon Rank Sum Test
שיעור התעברות 150DIM	49.6% (67/135)	36.1% (22/61)	0.0774 0.0583 0.0649	Pearson's Chi-Square Survival analysis: Cox's F Test Logrank Test
שיעור התעברות 180DIM	58.5% (79/135)	49.2% (30/61)	0.2231 0.0950 0.0981	Pearson's Chi-Square Survival analysis: Cox's F Test Logrank Test

\*תוצאות מוצגות כ Mean±SEM, (Median; 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> quartiles), או כאחוזים (%).

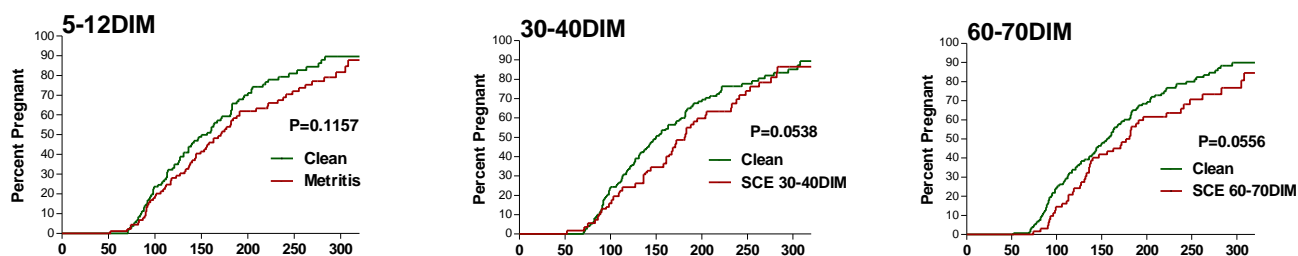
**טבלה 5: ביצועי פוריות של פרות 'נקיות' מול פרות שאובחנו עם אנדומטריטיס תת-קליני בבדיקה שבוצעה ב- 60-70DIM**

פרמטר	נקיות	אנדומטריטיס 60-70DIM	P value	מבחן סטטיסטי
שיעור תחלואה	68.9% (135/196)	31.1% (61/196)	---	
זמן הזרעה ראשונה (DIM)	94.9±2.1d	103.1±3.8d	0.0856 0.0243	Wilcoxon Rank Sum Test Kaplan-Meir(LogRank)
סה"כ הזרעות	2.7±0.2	2.9±0.3	0.7310	Wilcoxon Rank Sum Test
מס' הזרעות להתעברות	2.7±0.2	2.9±0.3	0.5538	Wilcoxon Rank Sum Test
שיעור התעברות מהזרעה I	27.1% (35/129)	25% (14/56)	0.7627	Pearson's Chi-Square
ימי ריק	161±6.4 (146; 100, 204)	185.8±10.5 (177;123,239)	0.0318 0.0556	Wilcoxon Rank Sum Test Kaplan-Meir(LogRank)
ימי סרק	52.8±5.9 (26.5; 0, 96.3)	60.1±9.2 (45.5; 0, 95.75)	0.5366	Wilcoxon Rank Sum Test
שיעור התעברות 150DIM	46.7% (63/135)	42.6% (26/61)	0.5986	Pearson's Chi-Square
			0.2275	Survival analysis: Logrank Test
			0.1225	Gehan-Breslow
שיעור התעברות 180DIM	57.8% (78/135)	50.8% (31/61)	0.3640	Pearson's Chi-Square
			0.1074	Survival analysis: Logrank Test
			0.0664	Gehan-Breslow

\*תוצאות מוצגות כ Mean±SEM, (Median; 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> quartiles) או כאחוזים (%).

כפי שניתן לראות בטבלאות, המדדים שהושפעו באופן מובהק בכל מועדי הדיגום היו ימי ריק ומועד הגשה להזרעה ראשונה, שהיו קצרים יותר בפרות הנקיות מאשר בפרות החולות. ניתן לראות גם מגמה של שיעור התעברות גבוה יותר בפרות נקיות לעומת פרות חולות באנדומטריטיס תת קליני. עקומות הישרדות של שיעורי התעברות כלליים בכל אחד מזמני הדיגום מוצגות בתרשים 3.

**תרשים 3: גרפים של אנליזת הישרדות Kaplan-Meyer, לשיעור התעברות הכללי, בפרות חולות (אדום) מול נקיות (ירוק).**



ערכי P-value בתרשים 3 הם של מבחן הישרדות Log-Rank. נראית נטייה של פרות נקיות להתעבר מוקדם יותר.

**אנליזה מטאגנטית של אוכלוסיית החיידקים ברחם של פרות נקיות לעומת פרות שאובחנו עם מטריטיס או אנדומטריטיס תת-קליני**

נתונים מ-130 פרות בשלוש מועדי הדיגום הושוו לפי הסטטוסים הקליניים הבאים: פרה עם וללא מטריטיס (5-12 DIM); עם וללא אנדומטריטיס תת-קליני (ב- 30-40; וב- 60-70DIM). לאחר בקרת איכות, סינון רצפים בעייתיים והשוואה למסד נתונים של מקטעי 16S rDNA של חיידקים שונים, נראים הבדלים באוכלוסיות החיידקים בין סטטוסים קליניים שונים בעיקר בדיגום הראשון. מדדי קהילה כמו אינדקס גיוון של Shannon, אחידות ועושר מינים (S ו H, E בהתאמה) מסוכמים בטבלה 6. בנוסף מפורטים בטבלה ערכי A ו- P values של מבחן MRPP.

**טבלה 6: מדדי קהילה והבדל בין הקבוצות באנליזה מטאגנטית**

MRPP P Value	MRPP A Statistic	Richness (S)	Evenness (E)	Shannon Diversity Index (H)	מספר פרות (n)	סטטוס	מועד דיגום
$P << 0.0001$	0.034	71.3	0.373	1.584	59	נקיות	5-12DIM
$P << 0.0001$	0.034	73.6	0.365	1.564	70	מטריטיס	
0.0018	0.019	74.0	0.468	1.981	92	נקיות	30-40DIM
0.0018	0.019	77.6	0.410	1.744	35	אנדומטריטיס	
0.0212	0.012	83.3	0.550	2.384	95	נקיות	60-70DIM
0.0212	0.012	100.1	0.540	2.438	34	אנדומטריטיס	

בניגוד להשערתנו בדו"ח הקודם, הגדלת המדגם לא הביאה לעלייה בהבדלים הנצפים במדדי קהילה H, E ו S בין פרות נקיות לחולות בכל מועדי הדיגום. המגמה היא הפוכה, והגדלת המדגם הביאה לטשטוש ההבדלים במדדים אלו בין נקיות לחולות. לעומת זאת, מבחן MRPP מראה הבדלים קטנים אך משמעותיים סטטיסטית בין חולות לבריאות בכל מועדי הדיגום. מגמה מעניינת היא ירידה בעוצמת ההבדל בין הקבוצות (ירידה בערך A statistic) ככל שמתקדמים בתחלובה, בד בבד עם ירידת עוצמת המובהקות הסטטיסטית של הבדלים אלו (עליית ערך P Value).

הרכב האוכלוסייה החיידקית הממוצעת לפי מערכה (Phylum) בפרות נקיות מול חולות מוצגת בשלושת הגרפים בתרשים 4, ובטבלה 7. ניתן לראות כי במטריטיס קליני נשלטת אוכלוסיית החיידקים ע"י שתי המערכות הדומיננטיות *Bacteroidetes* ו- *Fusobacteria*, שמשגשות על חשבון המערכות *Proteobacteria* ו- *Tenericutes*. בפרות ללא מטריטיס, אוכלוסיית החיידקים הממוצעת מתחלקת באופן שווה יותר בין המערכות השונות. המערכות הדומיננטיות בפרות עם מטריטיס, *Fusobacteria* ו-

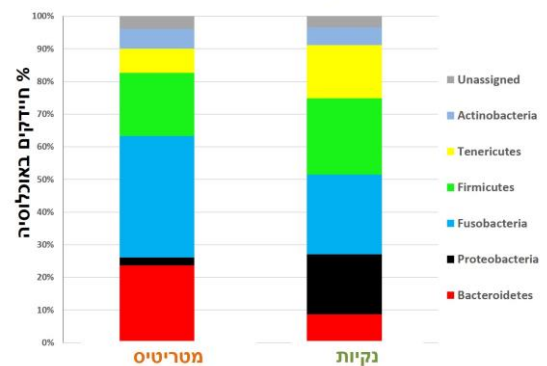
*Bacteroidetes* מכילות בתוכן סוגים המקושרים למטריטיס קליני כמו *Fusobacterium* המופיע במחקרים מבוססי תרבית, ו- *Porphyromonas* (בהתאמה) המופיע במחקרי מטאגנטיקה של דלקות רחם ברחבי העולם [24, 25]. חיידקים המקושרים במחקרים מבוססי תרבית לדלקת קלינית, כמו *Escherichia* ו- *Trueperella* שייכים (בהתאמה) למערכה *Proteobacteria*, הדומיננטית בפרות הבריאות, או ל- *Actinobacteria* שלא נמצא בה הבדל מובהק בין פרות חולות לבריאות. הסוג *Escherichia*, המקושר במחקרים רבים מבוססי תרבית למטריטיס קליני [9] לא נמצא קשור למטריטיס במחקר זה, עם שפיעה נמוכה והימצאות בנקיות ובחולות, ללא הבדלים מובהקים בין הקבוצות. נתוני הסוגים המצוינים (%) מהאוכלוסיה, היארעות, מובהקות בין חולות לבריאות לפי מבחן Kruskal-Wallis) מוצגים בטבלה 7. בגרפים של האוכלוסיה הממוצעת בהמשך התחלובה (60-70 DIM, 30-40) לא נראים הבדלים בולטים לעין בהרכב האוכלוסיה הממוצע בין פרות נקיות לפרות חולות באנדומטריטיס תת-קליני, אך נמצא הבדל מובהק סטטיסטית במערכות *Tenericutes* ו- *Fusobacterium*, *Proteobacteria* ב- 60-70DIM.

#### תרשים 4: הרכב אוכלוסייה חיידקית ממוצע, לפי מערכה (Phylum), בזמני הדיגום השונים.

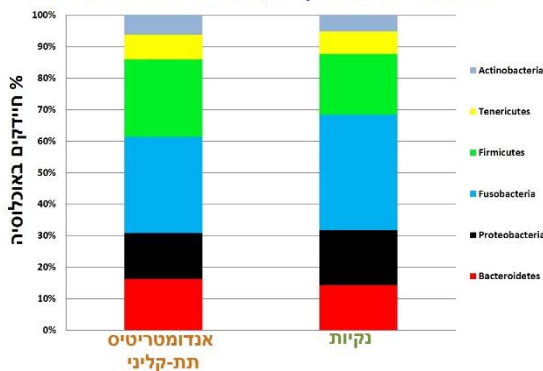
העמודה הימנית בכל גרף מייצגת את הפרות הנקיות, והעמודה השמאלית את הפרות החולות. העמודות מחולקות לחלקים בצבעים שונים, וכל צבע מייצג מערכה שונה. גובה הצבע על פני ציר Y מציג את האחוז מהחיידקים באוכלוסייה המשתייך לאותה מערכה.

ניתן לראות כי במטריטיס מוקדם העמודות שונות מאד, ובהמשך התחלובה נראים הבדלים קלים בלבד בין פרות שהוגדרו לנקיות לבין פרות שהוגדרו עם אנדומטריטיס תת-קליני.

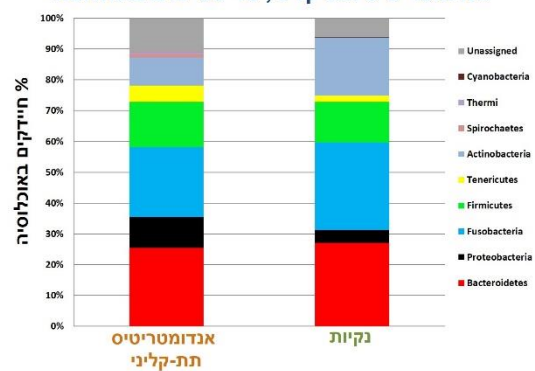
אוכלוסיה ממוצעת לפי מערכה (Phylum) מטריטיס, 5-12 ימים בתחלובה



אוכלוסיה ממוצעת לפי מערכה (Phylum) אנדומטריטיס תת-קליני, 60-70 ימים בתחלובה



אוכלוסיה ממוצעת לפי מערכה (Phylum) אנדומטריטיס תת-קליני, 30-40 ימים בתחלובה



טבלה 7: אחוז המערכות הדומיננטיות מכלל האוכלוסייה החיידקית בפרות עם וללא מטריטיס (5-12DIM) או פרות עם וללא אנדומטריטיס תת-קליני (30-40DIM, 60-70DIM)

60-70DIM			30-40DIM			5-12 DIM			מערכה
P value	אנדומטריטיס	נקיות	P value	אנדומטריטיס	נקיות	P value	מטריטיס	נקיות	
0.8608	5.50±1.11	5.48±0.65	0.1081	16.43±4.32	7.52±1.14	0.0162	5.54±1.07	4.39±1.54	<i>Actinobacteria</i>
0.0657	13.33±1.65	10.47±0.95	0.9615	17.06±3.57	14.93±1.64	0.0003	17.91±2.38	7.58±1.34	<i>Bacteroidetes</i>
0.7297	21.39±2.40	21.33±1.74	0.4082	10.42±1.95	12.03±1.35	0.4516	20.24±2.61	21.78±3.09	<i>Firmicutes</i>
0.0333	27.12±3.78	19.82±2.1	0.9658	18.65±3.84	14.02±1.64	0.0001	37.11±2.85	22.18±3.02	<i>Fusobacteria</i>
0.0488	26.37±3.91	37.94±2.99	0.0178	10.28±2.56	13.66±1.81	0.0043	3.49±0.78	13.8±2.81	<i>Proteobacteria</i>
0.0286	5.81±0.98	4.17±0.64	0.9530	4.69±2.46	3.35±0.95	0.0426	7.4±2.34	13.36±2.89	<i>Tenericutes</i>

נתונים בטבלה 7 מוצגים כ- Mean±SEM. ההבדלים בין האוכלוסייה החיידקית הממוצעת בפרות חולות ונקיות בוצעו ב Wilcoxon Rank Sum Test

טבלה 8: סוגי חיידקים המקושרים למטריטיס קליני לפי הספרות, והופעתם במחקר

P Value	% הימצאות		% חיידק מהאוכלוסייה		מערכה	סוג
	מטריטיס	נקיות	מטריטיס	נקיות		
0.2738	22	14.3	0.004±0.002	0.01±6.9E <sup>-4</sup>	Proteobacteria	<i>Escherichia</i>
< 0.0001	100	100	34.11±2.71	16.12±2.45	Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>
0.0001	100	100	16.33±2.31	5.88±1.28	Fusobacteria	<i>Porphyromonas</i>
0.0002	100	97.1	5.14±1.05	3.52±1.54	Actinobacteria	<i>Trueperella</i>

נתונים בטבלה 8 מוצגים כ- Mean±SEM. ההבדלים בין האוכלוסייה החיידקית הממוצעת בפרות חולות ונקיות בוצעו ב Wilcoxon Rank Sum Test

אנליזת Indicator Values (IV) בוצעה לניתוח אוכלוסיית החיידקים בכל שלושת מועדי הדיגום. ככל שה-IV של סוג מסוים גבוה יותר (נע בין 0 ל 100), עולה הסבירות כי הוא קשור למצב קליני מסוים. התמקדנו בסוגים שהראו מובהקות סטטיסטית ו-IV של 50 ומעלה. בדיגום שהתבצע ב- 5-12DIM זהו 20 סוגי חיידקים, המפורטים בטבלה 9, הכוללים בתוכם גם את הסוגים *Fusobacterium* ו- *Porphyromonas* בתור סוגים מקושרים לדלקת רחם קלינית.

ב- 30-40DIM זהו חמישה סוגים בלבד (ייתכן שארבעה סוגים כיוון שיש כאלו המסווגים את *Trueperella* ו- *Arcanobacterium* כאותו סוג) המפורטים בטבלה 10. בעוד הסוגים המקושרים לפרות נקיות מזוהים רק עד רמת המשפחה, הסוגים המקושרים לדלקת רחם תת-קלינית (*Trueperella*, *Fusobacterium*) מקושרים גם לדלקת רחם קלינית בפרסומים רבים בספרות המקצועית.

אנליזת IV ב- 60-70DIM, המפורטת בטבלה 11, העלתה 13 סוגים, כולם מקושרים לדלקת רחם תת-קלינית. בולטים בחזרתם הסוגים *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* וסוג לא ממוין ממשפחת *Mogibacteriaceae*, שהופיעו ב- 5-12DIM כמקושרים לדלקת רחם קלינית.

החזרה של סוגים מסוימים המקושרים למטריטיס קליני בתחילת התחלובה כמקושרים לאנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה, יחד עם הסיכון המוגבר של פרוט שחלו במטריטיס קליני לחלות באנדומטריטיס תת-קליני, יכול לתמוך בהשערה כי חלק ממקרי האנדומטריטיס התת-קליני הם המשך של המחלה הקלינית בתחילת התחלובה. עם זאת, חוסר היכולת למצוא אוכלוסיה חיידיקית מאפיינת לאנדומטריטיס תת-קלינית (מדדי קהילה, התפלגות קהילה לפי מערכה שנראו למעלה, ונתוני NMDS ו- Cluster analysis המוצגים למטה) מצביעה יותר לכיוון המאכסן (הפרה) בתור הכוח המניע מאחורי התפתחות אנדומטריטיס תת-קליני, כאשר החיידקים המקושרים מתפקדים כאופורטוניסטים. זאת, בניגוד לתמונה המצטיירת לגבי מטריטיס קלינית, שהנתונים ממחקר זה תומכים בהיותה מחלה עם אטיולוגיה חיידיקית.

**טבלה 9: Indicator Values של סוגי חיידקים שונים ב- 5-12DIM, וקישור למצב קליני**

P value	IV	מצב קליני	מערכה	סוג
0.0002	88.2	מטריטיס	Firmicutes	<i>Unclassified Mogibacteriaceae</i>
0.0586	80.2	נקיה	Proteobacteria	<i>Unclassified Pasteurellaceae</i>
0.0006	80.1	מטריטיס	Bacteroidetes	<i>Porphyromonas</i>
0.0002	79.1	מטריטיס	Firmicutes	<i>Tissierella_Soehngenia</i>
0.0004	77	מטריטיס	Firmicutes	<i>Peptostreptococcus</i>
0.0002	76.7	נקיה	Firmicutes	<i>Peptococcus</i>
0.0002	75.2	מטריטיס	Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>
0.0014	71.8	מטריטיס	Firmicutes	<i>Parvimonas</i>
0.0020	70.4	מטריטיס	Firmicutes	<i>Unclassified Tissierellaceae</i>
0.0004	69.8	מטריטיס	Actinobacteria	<i>Arcanobacterium</i>
0.0036	67.3	נקיה	Firmicutes	<i>Veillonella</i>
0.0004	66.9	נקיה	Firmicutes	<i>Butyrivibrio</i>
0.0056	65.6	מטריטיס	Firmicutes	<i>Oscillospira</i>
0.0404	61.9	מטריטיס	Bacteroidetes	<i>Parabacteroides</i>
0.0198	59.5	נקיה	Firmicutes	<i>Ruminococcus</i>
0.0040	57.8	נקיה	Proteobacteria	<i>Unclassified Bradyrhizobiaceae</i>
0.0448	57.3	נקיה	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>
0.0028	54.8	נקיה	Firmicutes	<i>Staphylococcus</i>
0.0024	49.9	נקיה	Bacteroidetes	<i>Unclassified S24.7</i>

טבלה 10: Indicator Values של סוגי חיידקים שונים ב 30-40DIM, וקישור למצב של אנדומטריטיס תת-קליני

P Value	IV	מצב קליני	מערכה	סוג
0.0160	83.8	אנדומטריטיס תת-קליני	Actinobacteria	<i>Trueperella</i>
0.0786	72.5	אנדומטריטיס תת-קליני	Fusobacteria	<i>Fusobacterium</i>
0.0320	65.9	נקיה	Proteobacteria	<i>unclassified Caulobacteraceae</i>
0.0014	55.4	אנדומטריטיס תת-קליני	Actinobacteria	<i>Arcanobacterium</i>
0.0464	50.5	נקיה	Proteobacteria	<i>unclassified Alcaligenaceae</i>

טבלה 11: Indicator Values של סוגי חיידקים שונים ב 60-70 DIM, וקישור למצב של אנדומטריטיס תת-קליני

P Value	IV	מצב קליני	מערכה	סוג
0.0424	88.4	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>Streptococcus</i>
0.0004	75.7	אנדומטריטיס תת-קליני	Tenericutes	<i>Ureaplasma</i>
0.0550	70.6	אנדומטריטיס תת-קליני	Fusobacteria	<i>unclassified Leptotrichiaceae</i>
0.0272	69.8	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>Parvimonas</i>
0.0004	67.7	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>Peptostreptococcus</i>
0.0142	67.1	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>unclassified Mogibacteriaceae</i>
0.0432	65.5	אנדומטריטיס תת-קליני	Actinobacteria	<i>Corynebacterium</i>
0.0466	64.7	אנדומטריטיס תת-קליני	Proteobacteria	<i>Aggregatibacter</i>
0.0094	60.2	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>p.75.a5</i>
0.0110	60	אנדומטריטיס תת-קליני	Actinobacteria	<i>unclassified Actinomycetaceae</i>
0.0130	56.3	אנדומטריטיס תת-קליני	Fusobacteria	<i>Leptotrichia</i>
0.0688	53.3	אנדומטריטיס תת-קליני	Firmicutes	<i>Sporanaerobacter</i>
0.0300	52	אנדומטריטיס תת-קליני	Proteobacteria	<i>Campylobacter</i>

שלושת הגרפים בתרשים 5 מייצגים אנליזות של NMDS מנתונים של 130 פרות בשלושה מועדים. ניתן לראות כי קבוצת הפרות החולות בדיגום 5-12DIM נפרדת מקבוצת הבריאות. אוכלוסיית הבריאות מפוזרת הרבה יותר על גבי הצירים, דבר המצביע על אוכלוסיית חיידקים הטרוגנית בפרות בריאות והומוגנית בפרות חולות. בהמשך התחלובה (60-70 DIM, 30-40), לא נראית הפרדה ברורה בין הקבוצות.

תרשים 5: גרפי NMDS של האוכלוסיות החיידקיות של כל פרה ב 5-12DIM (עליון), 30-40DIM (אמצע) ו- 60-70DIM (תחתון).

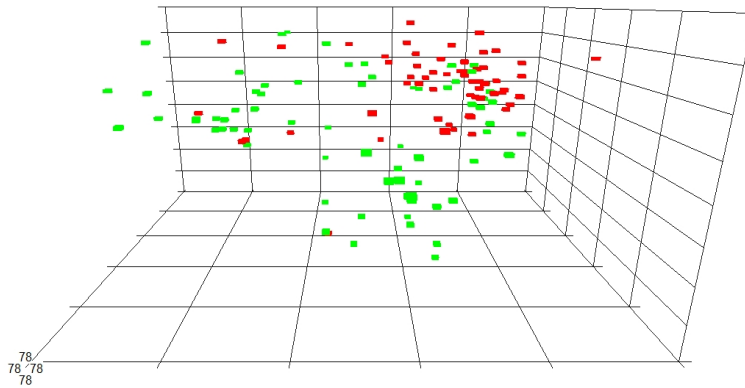
גרף NMDS הוא היטל דו- או תלת- מימדי, המייצג את המרחק של אוכלוסייה חיידקית (בפרה בודדת) מכל שאר האוכלוסיות (פרות). ערך ה- Stress מייצג את מידת הדימיון של ההיטל הדו- או תלת- מימדי לענף הרב מימדי של חישוב מרחקי האוכלוסיות. ככל שערכו נמוך יותר, כך הדיוק גדול יותר. מומלץ

להשתמש בערכים קטנים מ 0.2, כאשר ערך קטן מ 0.1 נחשב כרמת דיוק גבוהה. ההיטל הנסחר להצגה הוא בעל מספר המימדים הנמוך ביותר המקיים ערך Stress מתחת ל 0.2.

### NMDS 5-12DIM

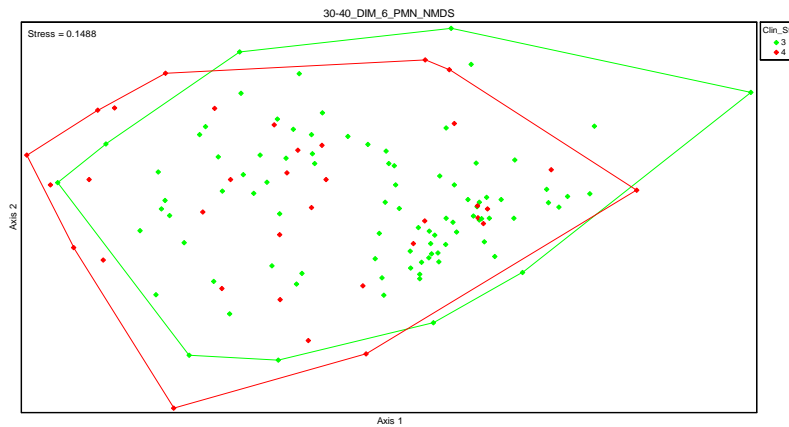
Stress=0.1395

Clin\_Sta  
■ 1  
■ 2



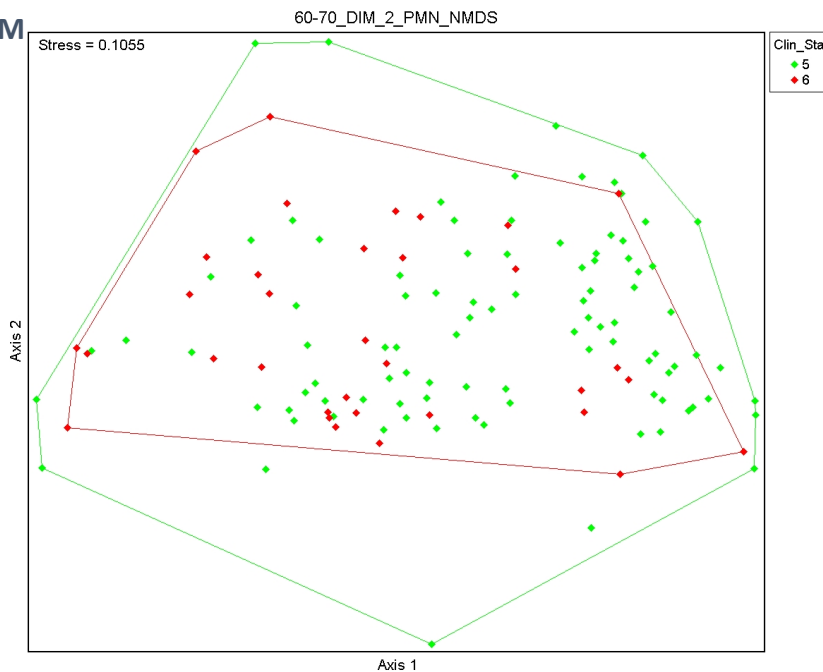
### NMDS 30-40DIM

Stress=0.1488



### NMDS 60-70DIM

Stress=0.1055





כפי שניתן לראות בתרשים 5, ב- 5-12DIM, אוכלוסיות הפרות החולות במטריטיס (אדום) מתקבצות יחד לקבוצה הומוגנית יחסית, ודומות יותר אחת לשנייה מאשר לאוכלוסיית הנקיות. קבוצת הנקיות (ירוק) מתפרשת יותר על גבי הצירים מה שמעיד על היותה יותר הטרוגנית מבחינת הרכבי האוכלוסייה. בשני מועדי הדיגום האחרים, לא נראה הבדל בין פיזור ומיקום אוכלוסיות הפרות הנקיות (ירוק) ואוכלוסיות הפרות החולות באנדומטריטיס תת-קליני (אדום).

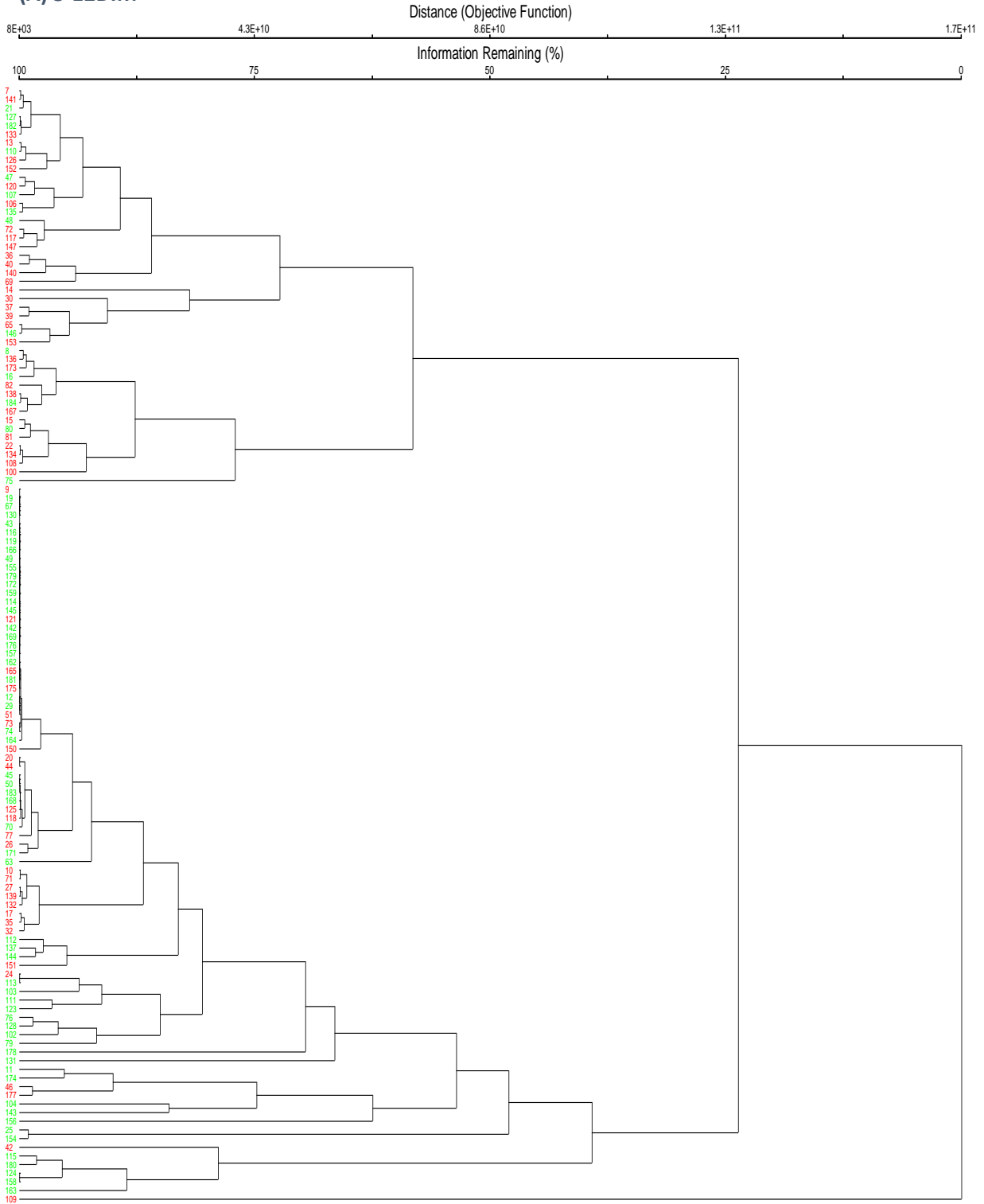
אזכור מגמה של התחלקות לשתי קבוצות נבדלות מבחינת אוכלוסיה חיידקית עלפי סטטוס קליני בתחילת התחלובה בלבד ניתן לראות גם ב cluster analysis, כפי שמודגם בתרשים 6. גם כאן, פרות נקיות מסומנות בירוק, וחולות באדום. ככל שה"מרחק" (מבחינת דמיון אוכלוסייה) גדול יותר בין הפרטים \ קבוצות, כך הקו המקשר ביניהם נמצא ימינה יותר על ציר X.

**תרשים 6: גרפי Cluster Analysis של האוכלוסיות החיידקיות של כל פרה ב 5-12DIM (A), 30-40DIM (B) ו- 60-70DIM (C).** פרות נקיות מסומנות בירוק, וחולות באדום. ככל שהמרחק בין אוכלוסייה אחת לאחרת גדל, כך הקו המקשר ביניהן (הפיצול ב"עץ") יימצא ימינה יותר על ציר ה X.

ניתן לראות כי ב- 5-12DIM, הדגימות (הפיצול השני ב"עץ" – הראשון הוא כנראה פרה חריגה) מתחלקות באופן גס לשתי קבוצות – אחת הנשלטת בעיקר ע"י דגימות אדומות (חולות במטריטיס), והשנייה נשלטת ע"י דגימות ירוקות (פרות נקיות). חלוקה כזו לא ניתן לראות במועדי הדיגום בהמשך התחלובה.

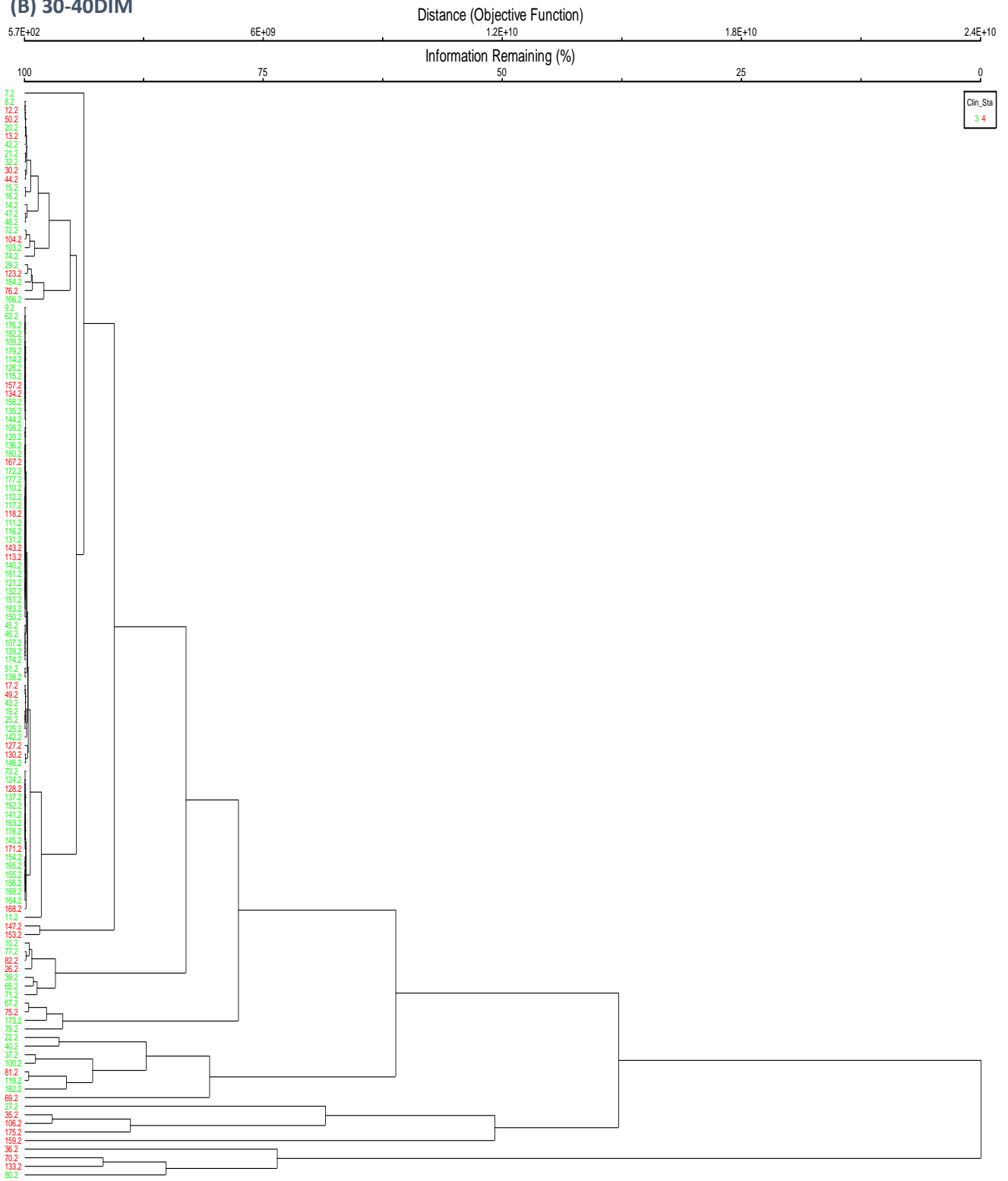
(A) 5-12DIM

Cluster 5-12 DIM



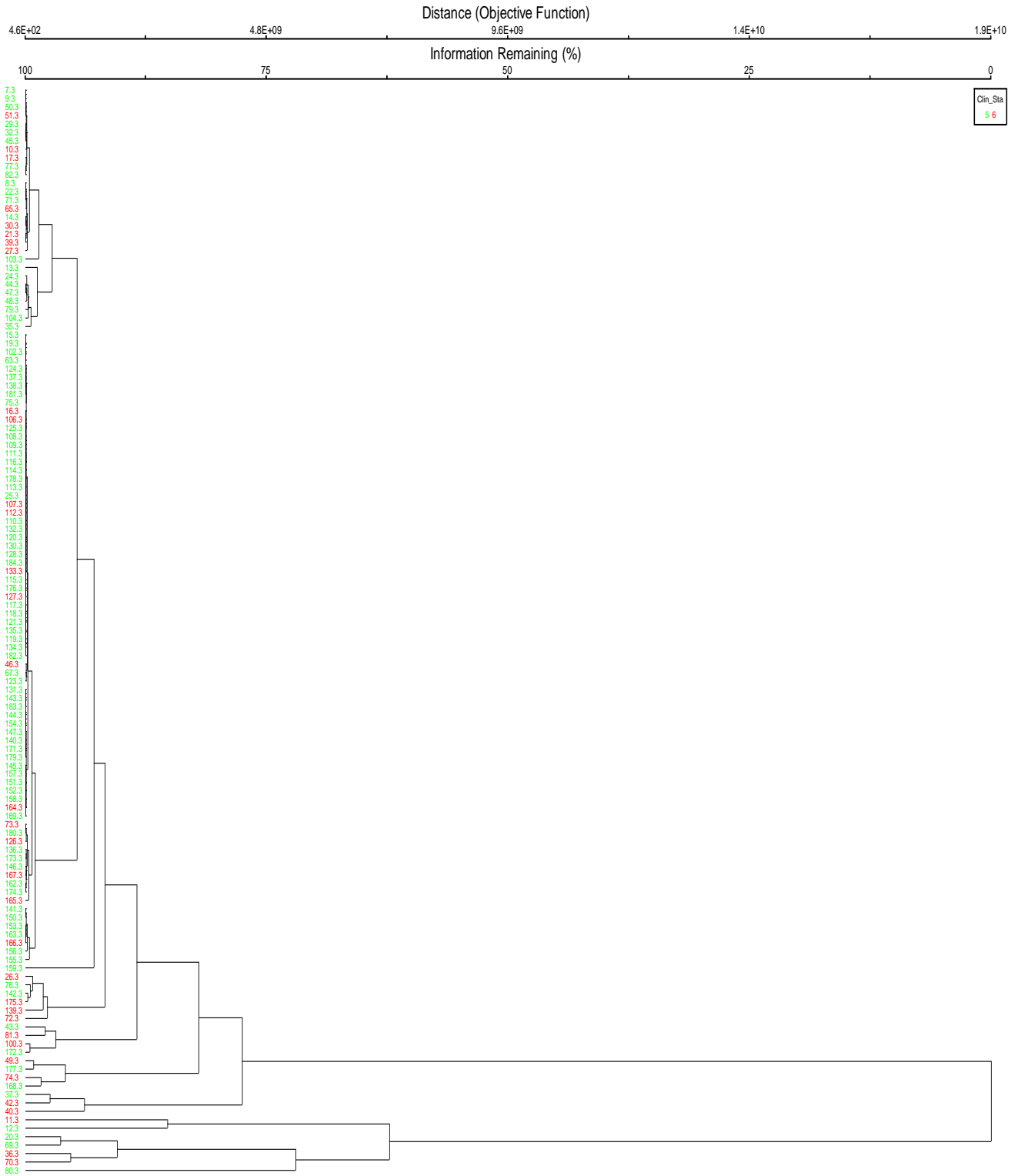
30-40\_DIM\_6\_PMN\_Cluster\_Analysis

(B) 30-40DIM



(C) 60-70DIM

60-70\_DIM\_2\_PMN\_Cluster\_Analysis



## 5] סיכום

המחקר שבוצע הינו מחקר מקיף, שכלל מעקב אורכי אחר מס' גדול של פרות הולשטיין פריזי-ישראלית בתקופה שלאחר ההמלטה. המחקר הראה מספר נקודות חשובות, ואלו עיקרן:

- 1) שיעור הפרות החולות במטריטיס עמד במחקר על 45.2% מהפרות.
- 2) נקבע ערך סף של אחוז PMN במשטח ציטולוגי לאבחון אנדומטריטיס תת-קליני ב- 30-40DIM וב- 60-70DIM, עפ"י מכלול של ביצועי פוריות של הפרות. הערכים שנקבעו הם 6% ו-2%, בהתאמה.
- 3) שיעור הפרות שאובחנו עם אנדומטריטיס תת-קליני ב- 30-40DIM עמד במחקר על 31.1%.
- 4) שיעור הפרות שאובחנו עם אנדומטריטיס תת-קליני ב- 60-70DIM עמד במחקר על 31.1%.
- 5) תוצאות המחקר הראו כי 51.5% מהפרות סבלו מאנדומטריטיס תת-קליני לפחות באחת מהבדיקות שבוצעו בתקופה של 30-70DIM.
- 6) למטריטיס ולאנדומטריטיס תת-קליני בפרות חלב בישראל השפעה לרעה על ביצועי הפוריות של הפרות, בעיקר על התארכות ימי הריק ודחייה של מועד ההגשה להזרעה ראשונה.
- 7) פרות החולות במטריטיס קליני בתחילת התחלובה נמצאות בסיכון מוגבר לפתח אנדומטריטיס תת-קליני בהמשך התחלובה ( $OR=2.32-3.34; P<0.004$ ).
- 8) תוצאות האנליזה המטגנומית שופכות אור נוסף על אוכלוסיית החיידקים ברחם של פרות חלב, הרבה מעבר ובאופן משלים לתוצאות מחקרים שהשתמשו בשיטת בקטריולוגיה קלאסית.
- 9) ישנה אוכלוסייה חיידקית אופיינית למטריטיס קליני בתחילת התחלובה, בעוד בפרות שהוגדרו כנורמליות (ללא סימנים קליניים) במועד זה אוכלוסיית החיידקים הייתה הטרוגנית.
- 10) לא נמצאה אוכלוסייה חיידקית מאפיינת לאנדומטריטיס תת-קליני, כפי שנמצא עבור מטריטיס קליני. הסברים אפשריים הם כי אנדומטריטיס תת-קליני תלוי בעיקר בתהליכים הקשורים בפרה (host immunity), או שזוהי מחלה שנגרמת ע"י חיידקים אופורטוניסטים ולא ע"י אוכלוסייה חיידקית אופיינית. כמו כן, יתכן שאנליזה המטגנטית של 16S rRNA איננה רגישה דיו ויש צורך בריצוף מלא של גנום החיידקים. עם זאת, יודגש כי האנליזות כן הראו הבדלים קטנים אך משמעותיים סטטיסטית בין חולות לבריאות בכל מועדי הדיגום וכי נמצא הבדל מובהק סטטיסטית במערכות *Tenericutes* ו *Fusobacterium, Proteobacteria* בדיגום שבוצע ב- 60-70DIM.
- 11) מחקר נוסף המתבצע במעבדתנו יתמקד בתגובת הפרה במטריטיס ובאנדומטריטיס תת-קליני לצורך הבנה טובה יותר של פתולוגיות אלו, במקביל לאנליזת אוכלוסיות החיידקים שבוצעה במחקר הנוכחי עבור אותן הפרות.

## [6 רשימת ספרות

- .1 Bello, N.M., J.S. Stevenson, and R.J. Tempelman, *Invited review: milk production and reproductive performance: modern interdisciplinary insights into an enduring axiom*. J Dairy Sci, 2012. **95**(10): p. 5461-75.
- .2 Dochi, O., S. Kabeya, and H. Koyama, *Factors affecting reproductive performance in high milk-producing Holstein cows*. J Reprod Dev, 2010. **56 Suppl**: p. S61-5.
- .3 Flamenbaum, I. and N. Galon, *Management of heat stress to improve fertility in dairy cows in Israel*. J Reprod Dev, 2010. **56 Suppl**: p. S.36-41
- .4 Macmillan, K.L., *Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows*. J Reprod Dev, 2010. **56 Suppl**: p. S42-7.
- .5 Galon, N., Y. Zeron, and E. Ezra, *Factors affecting fertility of dairy cows in Israel*. J Reprod Dev, 2010 **56** .**Suppl**: p. S8-14.
- .6 Sheldon, I.M. and H. Dobson, *Postpartum uterine health in cattle*. Anim Reprod Sci, 2004. **82-83**: p. 295-306.
- .7 Azawi, O.I., *Postpartum uterine infection in cattle*. Anim Reprod Sci, 2008. **105**(3-4): p. 187-208.
- .8 Goshen, T. and N.Y .Shpigel, *Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows*. Theriogenology, 2006. **66**(9): p. 2210-2218.
- .9 Sheldon, I.M., et al., *Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle*. Biol Reprod, 2009. **81**(6): p. 1025-32.
- .10 Nir, O., *Herd Health Reports - Comparison Among Years*. Hachaklait, 1999.
- .11 Nir, O., *Herd Health Reports - Comparison Among Years*, in *Hachaklait*. 1999.
- .12 Baranski, W., et al., *The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds*. Theriogenology, 2012. **78**(9): p. 1939-47.
- .13 Ghasemi, F., et al., *Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis*. Theriogenology, 2012. **78**(7): p. 1538-47.

- .14 Senosy, W.S., Y. Izaike, and T. Osawa, *Influences of metabolic traits on subclinical endometritis at different intervals postpartum in high milking cows*. *Reprod Domest Anim*, 2012. **47**(4): p. 666-74.
- .15 LeBlanc, S.J., T. Osawa, and J. Dubuc, *Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows*. *Theriogenology*, 2011. **76**(9): p. 1610-8.
- .16 Sheldon, I.M., et al., *Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle*. *Reprod Domest Anim*, 2009. **44 Suppl 3**: p. 1-9.
- .17 Barlund, C.S., et al., *A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle*. *Theriogenology*, 2008. **69**(6): p. 714-23.
- .18 Sheldon, I.M., et al., *Defining postpartum uterine disease in cattle*. *Theriogenology*, 2006. **65**(8): p. 1516-30.
- .19 Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction*. *Analytical Biochemistry*, 1987. **162**(1): p. 156-159.
- .20 Caporaso, J.G., et al., *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*. *Nat Methods*, 2010. **7**(5): p. 335-6.
- .21 Mielke, P.W.J., *Handbook of Statistics*. Vol. 4. 1984, Amsterdam: Elsevier.
- .22 Dufrene, M. and P. Legendre, *Species assemblages and indicator species: The need for a flexible asymmetrical approach*. *Ecological Monographs*, 1997. **67**(3): p. 345-366.
- .23 Mather, P.M., *Computational methods of multivariate analysis in physical geography*. 1976, London: John Wiley and Sons. 532.
- .24 Santos, T.M., R.O. Gilbert, and R.C. Bicalho, *Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows*. *J Dairy Sci* , **94**:(1) .2011p. 291-302.
- .25 Peng, Y., et al., *Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows*. *Folia Microbiol (Praha)*, 2013. **58**(6): p. 593-600.