



אבחון גנוטיפ עמידות לסקרייפי לצורך מינוף הטיפוח הלאומי ומיגור המחלה בישראל

כנס הבקר והצאן 2024

חי דביר

חוקר נוספים: איל סרוסי, אנדריי שיראק, אלכס רוזוב, מירב כוהן

המחלקה לחקר בקר וצאן
מכון וולקני

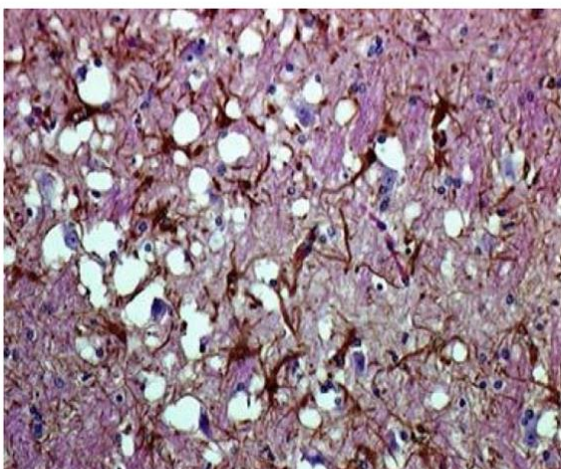


סקרייפי - מחלה נוירולוגית ניוונית ומדבקת בכבשים

- מקור השם בסימפטום הבולט לגירוד טורדני



- שינויי התנהגות: התבודדות, דיסאוריינטציה, אגרסיביות, חריקת שיניים



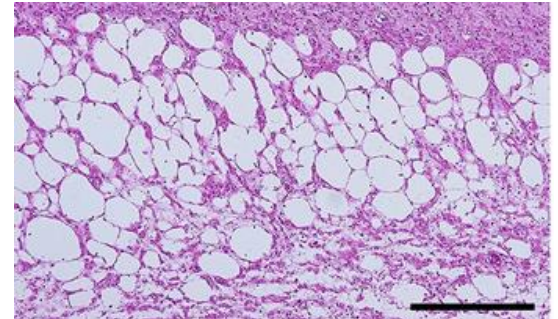
- סימנים עצביים: תגובות יתר לגירויים, גירוד עז, קואורדינציה ירודה, הליכה פגומה קופצנית

- רזון, חוסר תיאבון, ירידה בתפוקת חלב

- קריסה, עילפון ומוות

וקואולות = בועיות המאפיינות את השינוי המורפולוגי ברקמת המוח

Scrapie: Transmissible spongiform
Encephalopathy (ספגת המוח)
leading to fatal neurodegeneration

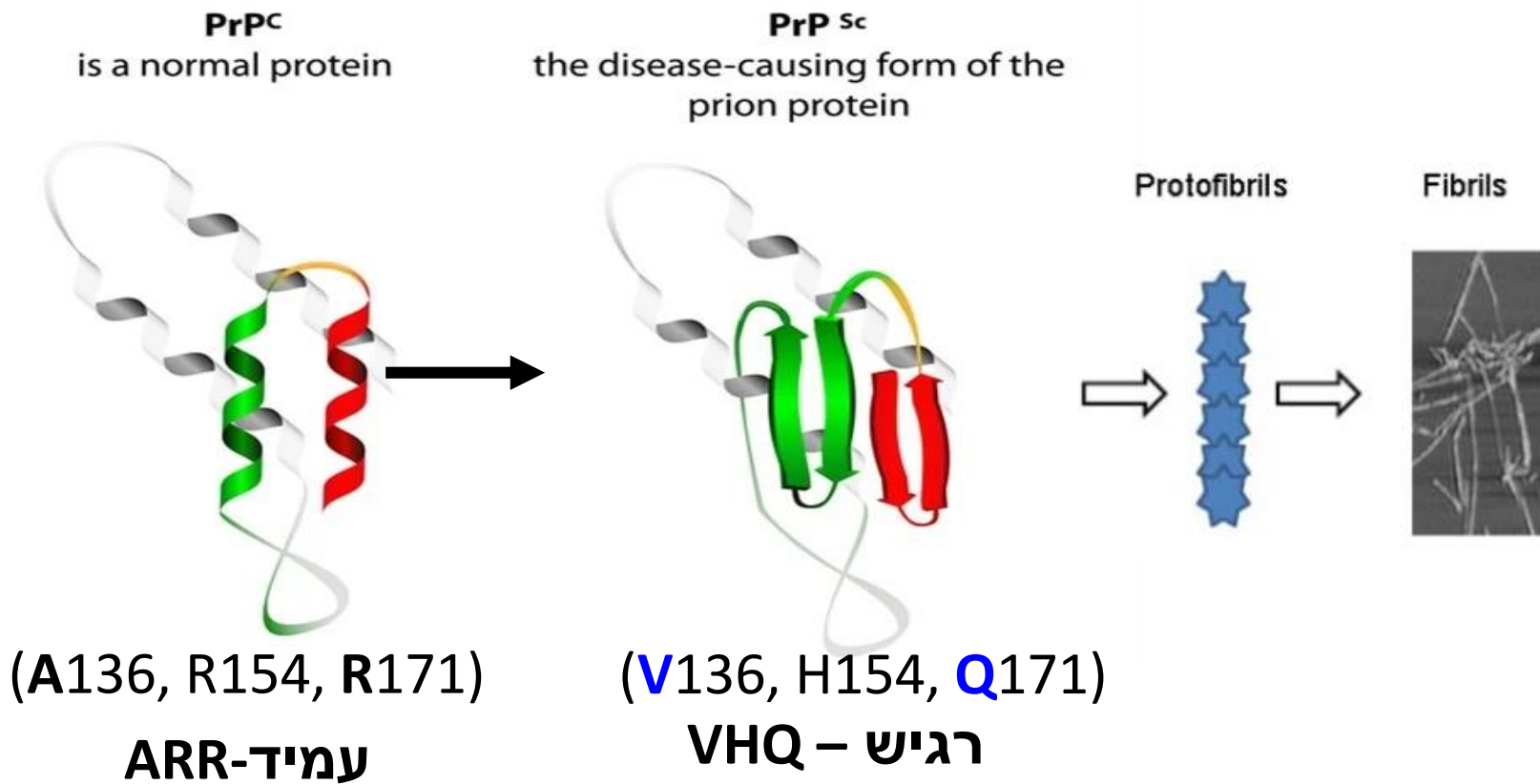


0.5 mm

סקרייפי - מחלת הפריונים עם התיעוד העתיק ביותר

- 1755 – התפרצות ראשונה באירופה
- 1967 – חלבונים מכילים נוקלאוטידים מעבירי המחלה
- 1982 – תיאוריית "The Protein Only" ע"י Prusiner SB שהגה את המונח "Prion (Protein Infection)" לגורם הפתוגני בסקרייפי.
- 1997 – פרס נובל בפיזיולוגיה ורפואה על תגלית הפריונים
- 1985 – זיהוי הגן המקודד (PRNP) Scrapie Prion Protein gene
- 1993 – זיהוי פולימורפיזם בגן PRNP הקשור ברגישות לסקרייפי
- אין טיפול ואין חיסון

הרגישות לסקריופי (קלאסי) נמצאת באסוציאציה עם שינויים טבעיים ברצף חומצות האמינו של חלבון הפריון



- עמדות 136 ו-171 בעלות ההשפעה הגדולה ביותר
- הרגישות רצסיבית

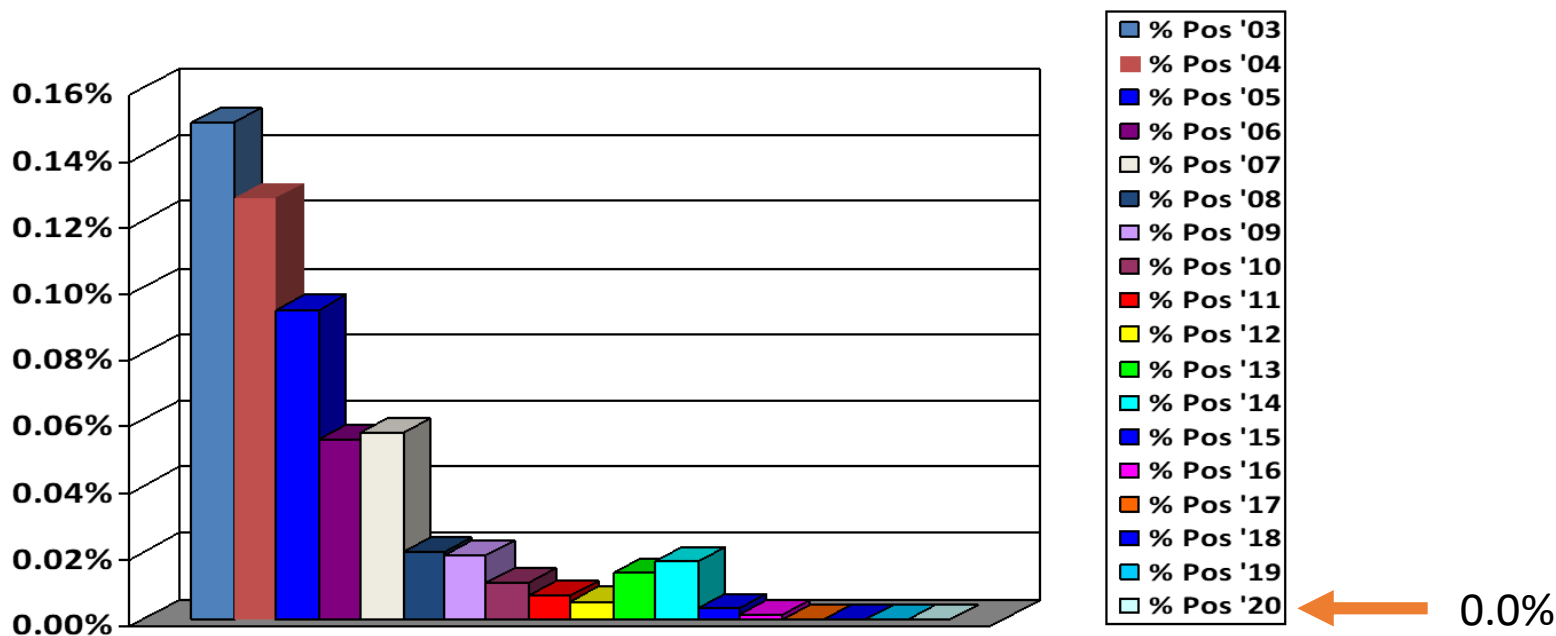
תכנית להעשרת האללים העמידים הובילה למיגור המחלה בארה"ב



United States Department of Agriculture



Percent of RSSS Sheep Samples that Tested Positive for Classical Scrapie - Weighted by Face Color FY 2003 – FY 2020



RSSS - Regulatory Scrapie Slaughter Surveillance (USDA 2020 report)

תפוצת האללים השונים באוכלוסיית הכבשים בארץ

82

E. Gootwine et al. / Small Ruminant Research 77 (2008) 80–83

Table 1

Genotype frequencies at the *PRNP* locus in the “Regional trial” by breed and country

Breed	Country	Number of		Genotype							
		Flocks	Animals	ARR/ARR	ARR/ARQ	ARR/ARH	ARR/AHQ	ARQ/ARQ	ARQ/AHQ	ARQ/ARH	
(A136, R154, R171) עמיד-ARR	LA	Israel	18	197	0.020	0.071	0.015	0.005	0.594	0.218	0.046
	LA	Jordan	8	62	0.043	0.217	0.029	0.014	0.464	0.159	0.043
	LA	PA	7	69	0.000	0.177	0.097	0.000	0.613	0.081	0.000
	LA	All	33	328	0.021	0.122	0.034	0.006	0.570	0.057	0.180
	IA	Israel	1	15	0.000	0.133	0.000	0.000	0.867	0.000	0.000
(V136, H154, Q171) רגיש-VHQ	IA	PA	1	29	0.000	0.034	0.034	0.000	0.517	0.345	0.000
	IA	All	2	44	0.000	0.068	0.023	0.000	0.636	0.000	0.227
	As	Israel	5	110	0.009	0.082	0.000	0.018	0.755	0.000	0.136

LA, Local Awassi; IA, Improved Awassi; As, Assaf.

1. חדשות טובות: האלל המקודד ל V136 נדיר בישראל

2. חדשות רעות: גם האלל המקודד ל R171 נדיר

מסקנה: העשרה של האללים ARR, או בקיצור R נהוג, תהה אפקטיבית לטיפול העמידות בישראל

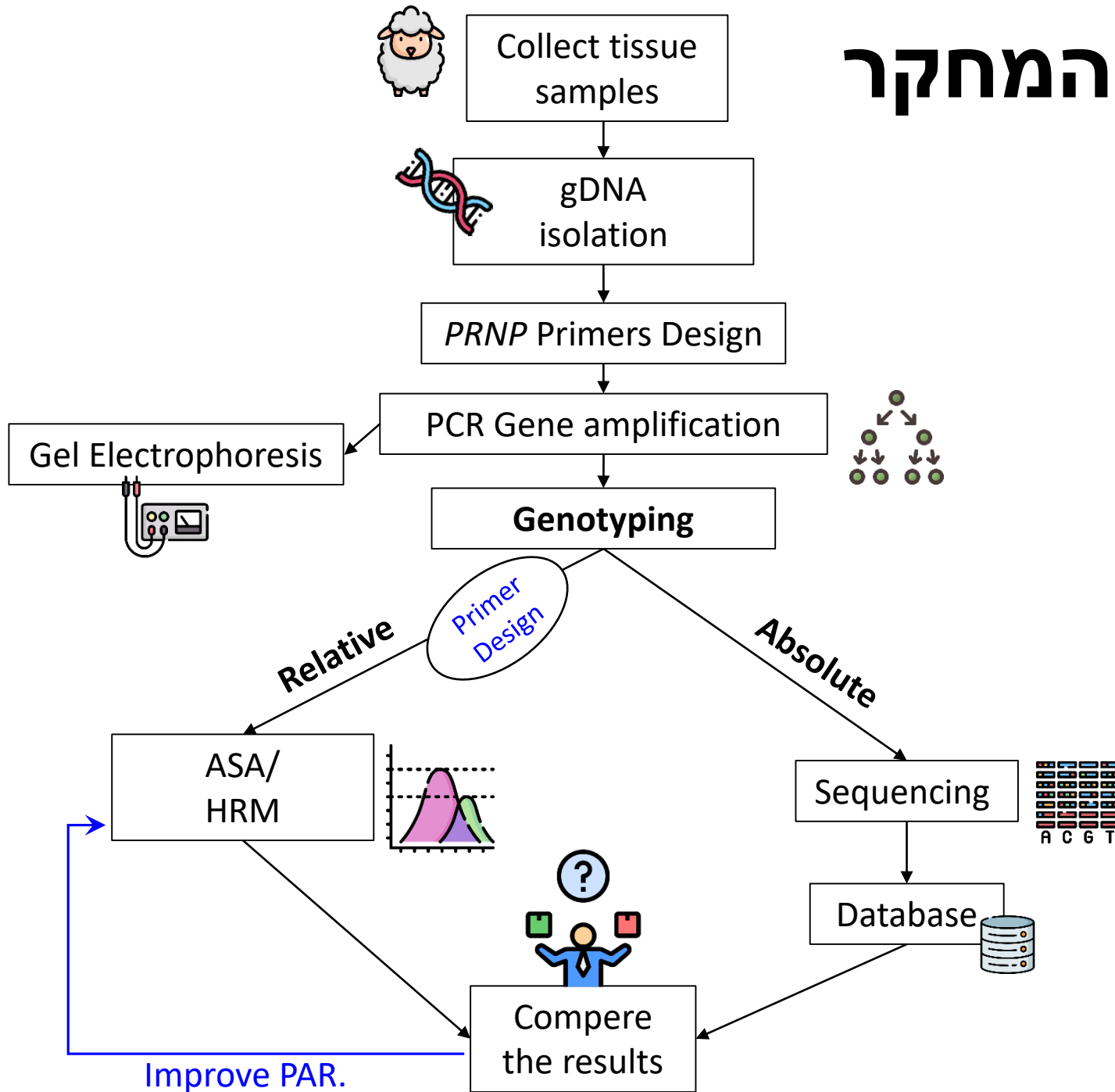


מטרות המחקר

1. ביסוס שיטה אפקטיבית וכלכלית לקביעת גנוטיפ העמידות לסקרייפי בגן *PRNP* בכבשים, במיקוד על קודון 171.

2. טיפוח העמידות לסקרייפי בעדר וולקני ע"י השבחת האילים לעמידות הומוזיגוטית (R/R), לצורך העשרת האלל בעדר, והפצתו בישראל.

מהלך המחקר

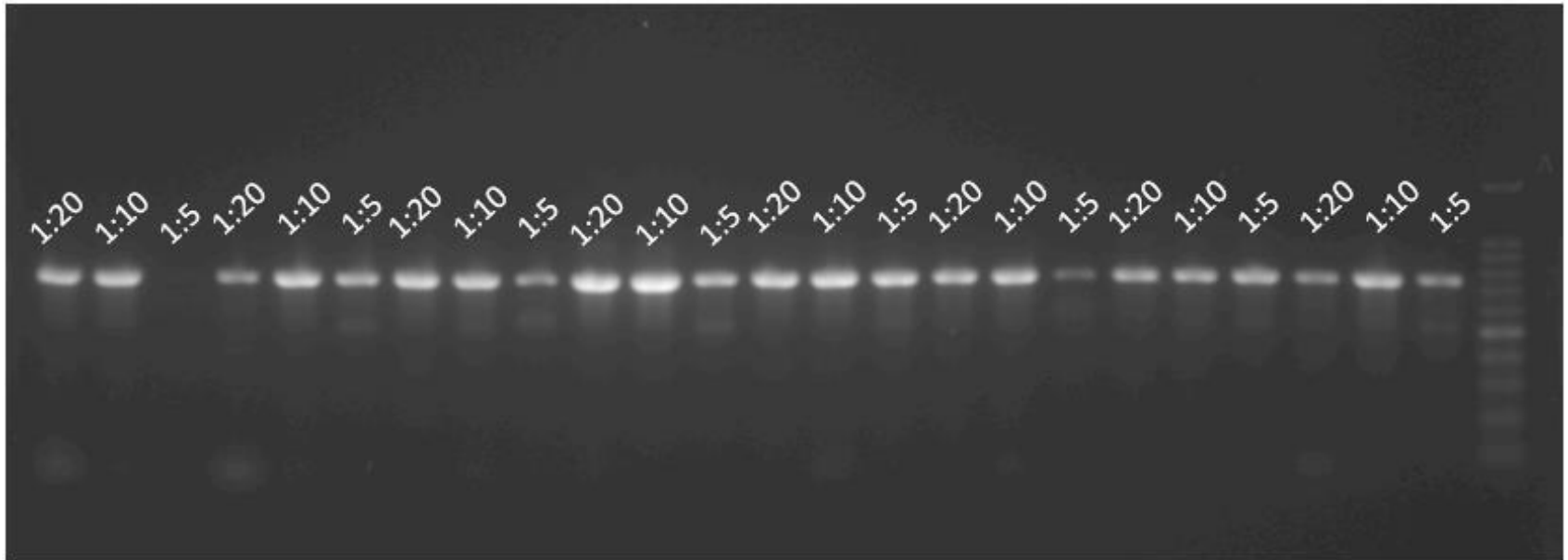


השוואת כמות ואיכות דנ"א המופק מרקמות שונות

Tissue	Average (n=6) DNA concentration (ng/ μ l)	\pm SD	Average of 230/260 absorbance ratio	\pm SD
Blood	130	105	1.48	0.44
Swab	120	39	1.74	0.18
Hair	44	24	2.27	0.25

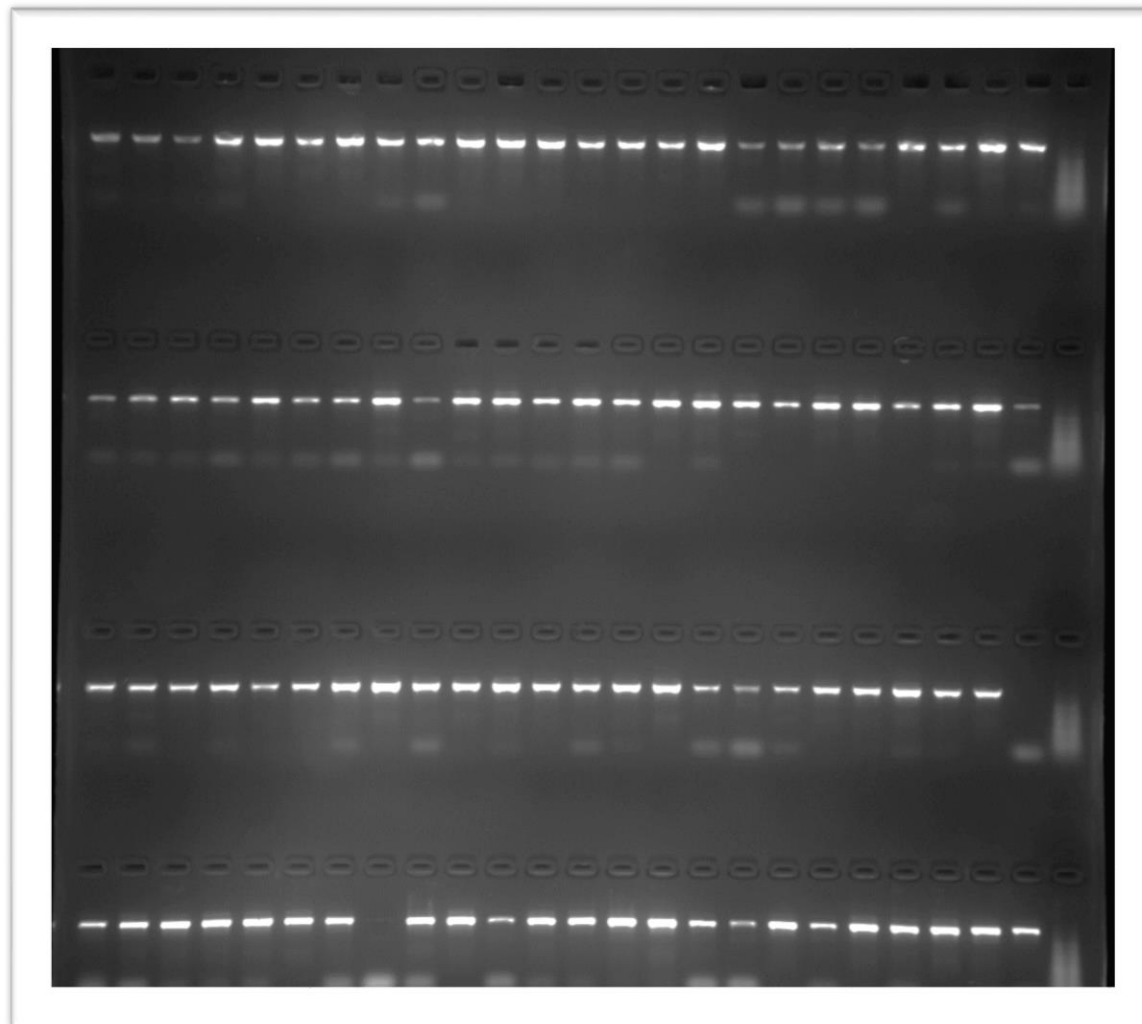
כמות ממוצעת גדולה ביותר של דנ"א התקבלה בהפקות מהדם (טבלה 1), אבל ערך SD גבוה מראה על שונות גבוהה בכמויות הדנ"א המופק. יחס ערכי בליעה של דנ"א (230) לעומת חלבון (260) מראה שאיכות הדנ"א שהתקבלה משיער הינה הגבוהה ביותר.

התייעלות בהפקת דנ"א מדם באמצעות קיט ייעודי לרקמת דם (GeneAll-GeneEx Tissue)



דם נדגם מ – 8 פרטים, מצאנו שהדילול המוצלח יותר לאמפליפיקציה הוא 1:10, שכן זה מניב תוצר לכל הריאקציות

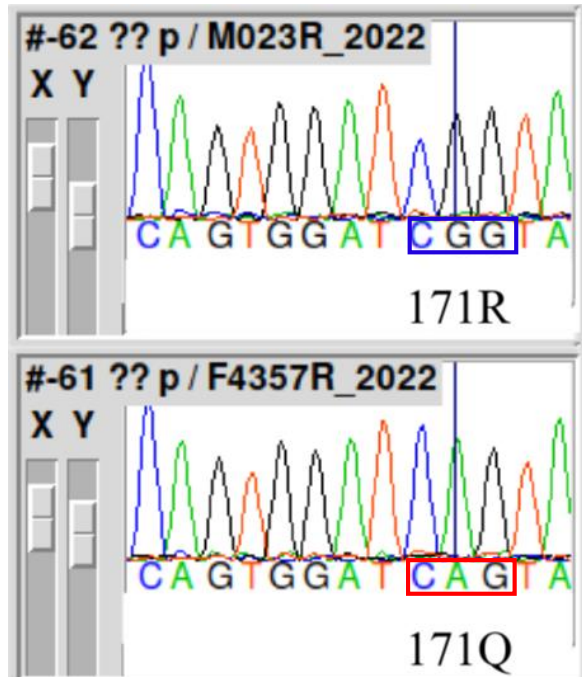
הפקת HT של דנ"א מדם של 96 פרטים בעדר



94 מתוך 96 דוגמאות דם מפרטים שונים עברו אמפליפיקציה מוצלחת ב PCR

ריצוף סנגר של מקטע הדנ"א סביב קודון 171

הומוזיגוט עמיד



הומוזיגוט רגיש

הטרוזיגוט



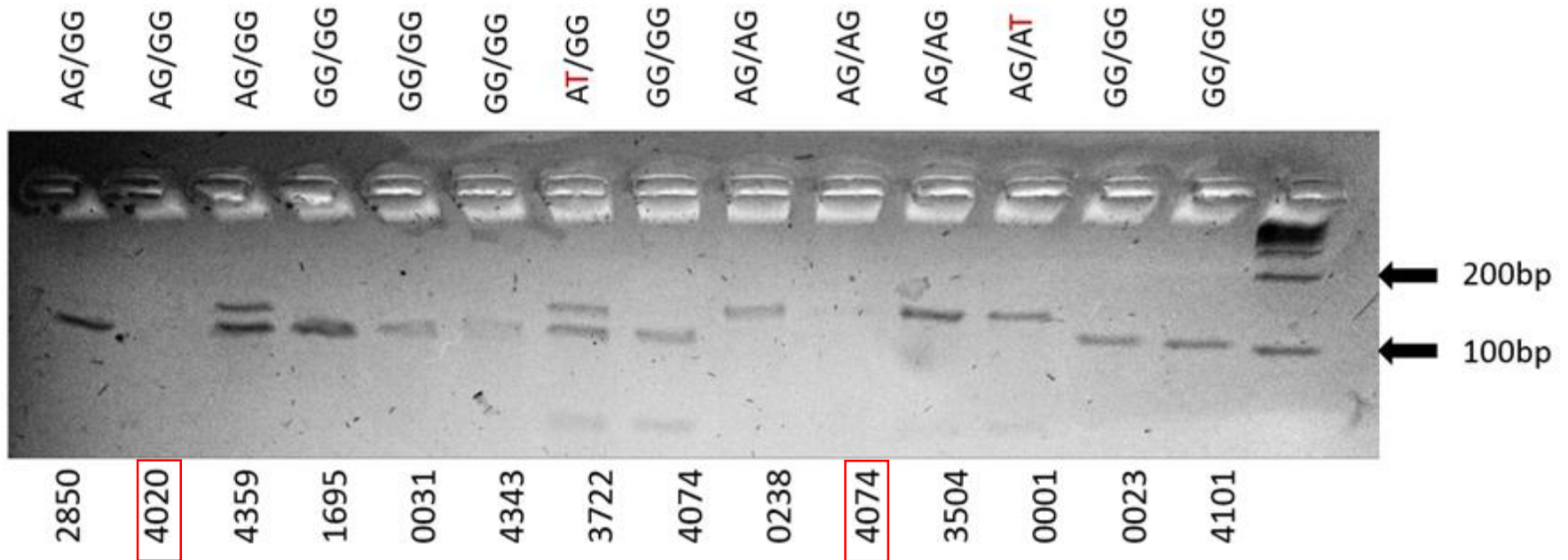
הטרוזיגוט

פולימורפיזם נמצא גם בעמדה שלישית ב 10% מהפרטים (בעיקר אווסי)
למרות חוסר הקשר בעמדה שלישית למחלה, המידע על שונות בבסיס זה חשוב
מבחינה טכנית לפיתוח מבחן מולקולרי שיתאים לשלל גזעי הכבשים בארץ

פריימרים לריאקציות PCR ומטרתם במחקר

Name	Sequence	Purpose
oaScF & oaScR	AAAGCCACATAGGCAGTTG AATGAGGAAAGAGATGAGGAG	Amplification of <i>PRNP</i> first exon (780bp)
ScrF1	CAATGACTATGAGGACCGTTACTA	Non-polymorphic Forward
ScrRres	CACAAAGTTGTTCTGGTTACAATA CC	Polymorphic resistant Reverse for ASA (110bp)
ScrRsens1	TTTGTTTTGTTTTGTTTTG CACAAAGTTGTTCTGGTTACAATA CT	Polymorphic sensitive Reverse for ASA (130bp)
ScrRsens2	TTTGTTTTGTTTTGTTTTG CACAAAGTTGTTCTGGTTACAATA AT	Polymorphic sensitive Awassi for ASA (130bp)

קביעה גנוטיפית ע"י הגברה של אלל ספציפי (ASA)

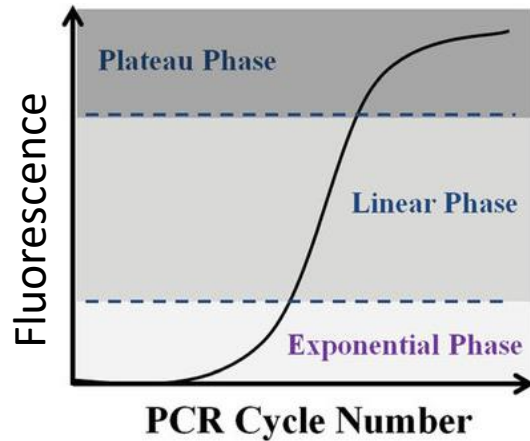


הומוזיגוט נותן תוצר בודד, קצר עמיד, ארוך רגיש. הטרוזיגוט מתקבלים שני תוצרים.

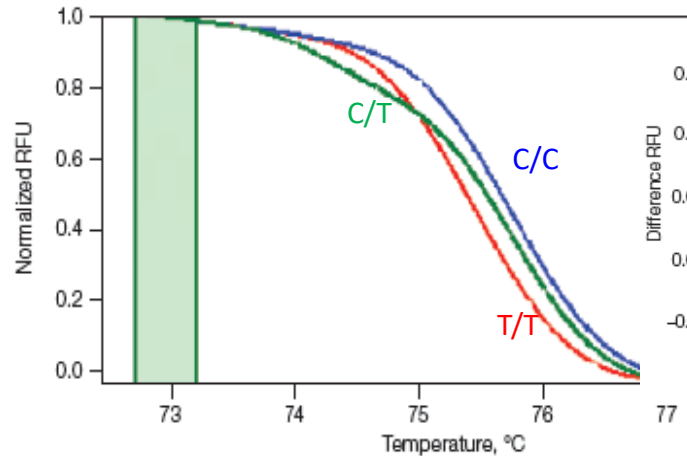
בעיות: תוצרים שניצפו בתחילת ההרצה נחלשו (4074, 4020)

אבחון ע"י התכת דנ"א ברזולוציה גבוהה HRM

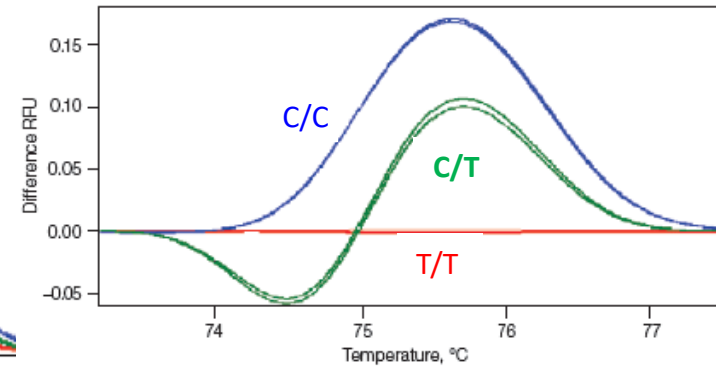
qPCR



התכת גדילי דנ"א תלויה ברצף



פרופילים של עקומות הפרש



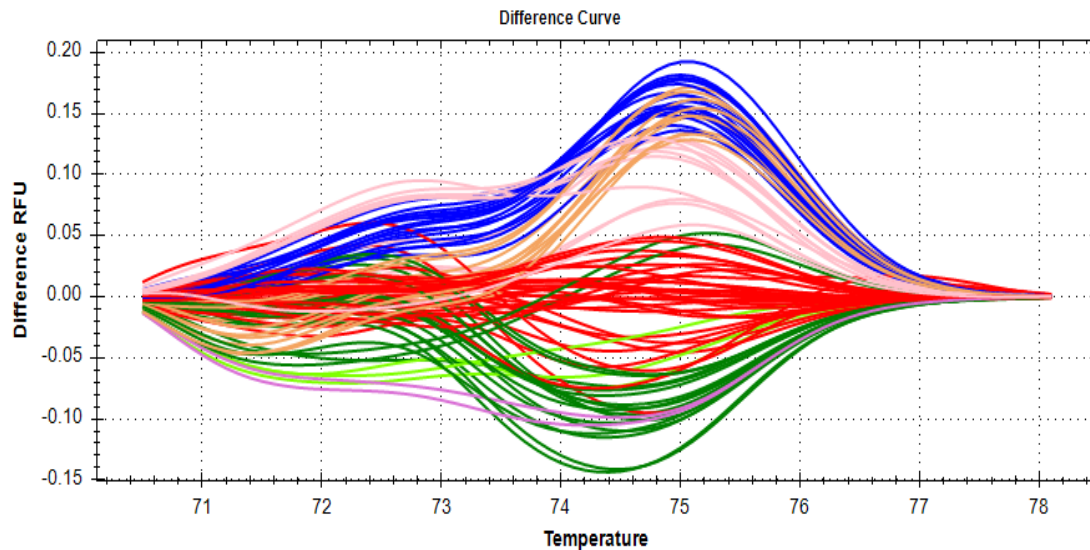
חסרונות:

- שיטה יחסית – דורש סטנדרט
- עלות מכשיר
- מוגבלת לרמת פולימורפיזם נמוכה.

יתרונות:

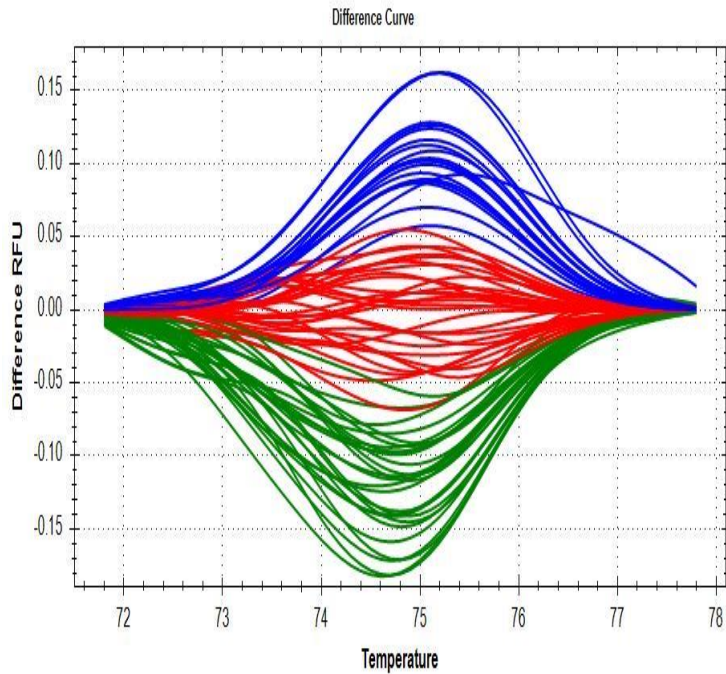
- מספר שלבים קטן - מהיר
- פשוט
- עלות תועלת נמוכה לעומת ריצוף

אופטימיזציה של ריאקציות HRM



- טמפרטורות אנילינג
- מחזורי אמפליפיקציה
- פריימרים שונים
- גודל אמפליקון
- מכשירים שונים
- לבסוף פרמטרים לקלסטריזציה

ביצועי HRM



Sequencing					
		AA	AG	GG	NTC
H	AA	17	3	0	0
R	AG	1	32	1	0
M	GG	0	3	33	0
	Not detected	0	1	2	3

אנליזה אוטומטית דייקה ב 85 מתוך 96 תוצאות (89%), חלק מהטעויות ניתן להסביר בשינוי בבסיס סמוך המופיע בגזע האוּוּסִי, בשאר המקרים ניתן להתגבר על הטעויות ע"י בחינת דופליקטים או טריפליקטים

עדר וולקני הושבה באופן משמעותי לעמידות לסקרייפי

Codon (amino acid)	136 (A or V)		154(R or H)		171 (R, Q or H)					Frequency in 171			Total	
	Zygoty	A/A	A/V	R/R	R/H	Q/Q	R/Q	R/R	Q/H	R/H	R171	Q171		H171
Alon Ha Galil - Merino	48	0	41	4	21	21	3	3	0		0.28	0.69	0.03	48
Ein Hatzevah - Romanov	17	0	17	0	5	9	3	0	0		0.44	0.56	0.00	17
Volcani - Assaf	300	5	254	27	54	116	111	14	10		0.57	0.39	0.04	305
Total:	365	5	312	31	80	146	117	17	10					370

Table 1
Genotype frequencies at the *PRNP* locus in t

Breed	Country	Number of		Genotype
		Flocks	Animals	
				ARR/ARI
LA	Israel	18	197	0.020
LA	Jordan	8	62	0.043
LA	PA	7	69	0.000
LA	All	33	328	0.021
IA	Israel	1	15	0.000
IA	PA	1	29	0.000
IA	All	2	44	0.000
As	Israel	5	110	0.009

LA, Local Awassi; IA, Improved Awassi; As

	R171	RR171
Alon Ha Galil - Merino	28%	6%
Ein Hatzevah - Romanov	44%	18%
Volcani -Assaf	57%	36%

סיכום

- דנ"א הופק ממספר רקמות, איסוף מספר טיפות דם על הנייר נמצא כמוצלח ביותר.
- פרוטוקול המבוסס על שיטת ASA נפסל בשלבים מוקדמים בשל הפרעות בוויזואליזציה של התוצרים בג'ל.
- פיתחנו וייעלנו פרוטוקולים ל HRM וריצוף סנגר לקביעת גנוטיפ עמידות לסקרייפי.
- ריצוף סנגר אמין יותר ומספק מידע גם על קודונים הנוספים שקשורים ברגישות לסקרייפי.
- לשיטת HRM דיוק והצלחה נמוכים יותר (85%) אך התאמה כלכלית טובה יותר לסריקת אוכלוסייה גדולה.
- ניתן למגר את המחלה בישראל ע"י המשך הטיפול, והחלפת האילים בכל העדרים באילים הומוזיגוטיים לעמידות.

רב תודות לצוות הצאן ולשותפי למחקר

אנדריי שיראק, מירב כוהן, אלכס רוזוב, גיא בומל, לוקאס, איל סרוסי



המחקר מומן ע"י מועצת החלב

