

אומדן שיעור טעות ברישום קרבה גנטית בין פרים ופרות בעדר הבקר בישראל

מיכה רוז, יואלה בלנק, משה בנקד, ענת ינאי ואסתר פלדמסר
היחידה לגנטיקה, מכון לבע"ח, מינהל המחקר החקלאי

מבוא

ההורים יהיו הומוזיגוטיים לסמן, אך לבדיקה אין עוצמה סטטיסטית כי גם להורים פוטנציאליים אחרים יהיה אותו הגנוטיפ. זאת, אם לסמן יהיו הרבה אללים, אז העוצמה הסטטיסטית לקביעת קרבה גנטית גבוהה יותר. לדוגמה, לסמן יחיד עם 5 אללים בעלי שכיחות דומה באוכלוסייה עוצמה סטטיסטית לגילוי אבהות של 42%, לעוצמה של מעל 95% דרושים 6 סמנים גנטיים כאלה.

זיהוי אבהות מבוסס על קיום אלל אחד משותף בצאצא ובאב המשוער בכל אחד מהסמנים הגנטיים הנבדקים. סוג ומספר הסמנים הנבדקים נקבע על פי רמת הבטחון הדרושה. אם בגנוטיפ של האב המשוער לסמן גנטי מסויים מופיעים זוג אללים ששכיחותם באוכלוסייה גבוהה, הרי הופעת אחד מהאללים של האב בצאצא אינה מעידה בהכרח על אבהות, כי כאמור, אבות פוטנציאליים אחרים יכלו להוריש את האלל. במקרה כזה יידרשו מספר רב יותר של סמנים גנטיים, כדי לקבוע אבהות במהימנות גבוהה. ולהפך, אללים נדירים אשר נמצאים גם באב וגם בצאצא מעידים בהסתברות גבוהה על אבהות ולכן, יידרשו מעט סמנים בלתי תלויים לקביעת אבהות באותה מהימנות סטטיסטית.

שיטות וחומרים

בטבלה 1 מוצג מבנה הניסוי לבדיקת אבהות של 102 פרים ו-215 פרות הרשומים בספר העדר כצאצאים של 7 פרים. דיגמות דם ושערות נדגמו מהפרות מ-12 קיבוצים ומושב יחיד (כפר יהושע). פיזור הפרות במספר רב של משקים קיבוציים הינו חיוני לאומדן מייצג של שיעור הטעות ברישום אבהות של פרות בקיבוצים.

טיפוח עדר הבקר לחלב מבוסס על נתוני ספר העדר. לאחרונה פותח בעולם ובארץ מודל הפרט לחישוב הערכות גנטיות של פרטים בעדר. על פי מודל זה הערך הגנטי של פרט מחושב על פי תכונות הפרט ותכונות הפרטים הקרובים אליו גנטית. לפי כך, שימוש יעיל במודל מותנה בדיוק הנתונים על קשרים גנטיים באוכלוסייה. השיטה המקובלת למבחני הורות התבססה על בדיקות מעבדה של חלבוני דם וסרום ואנזימים. שיטה זו מחייבת שימוש בדם טרי, ייצור נוגדנים שונים והפרדת מספר רב של חלבונים להשגת רמת בטחון של מעל 90% בבדיקה. קיימות מספר מעבדות המתמחות בכך בהולנד, ארה"ב ועוד. בישראל לא הוקמה מעבדה מסוג זה בגלל התשתית היקרה הדרושה להפעלתה.

ברשימה קודמת בחקר ומעש (1992) עסקנו באימות קרבה גנטית בספר העדר באמצעות סמנים גנטיים מסוג "מיקרוסְטְלִיטִים". לבדיקת קרבה גנטית דרושות דוגמאות דנ"א של האב, האם והצאצא. בתנאי הממשק של העדר הישראלי אחוז היציאה הממוצע של פרות בעדר הוא כ-35% ולכן, לא ניתן לבסס בדיקות קרבה גנטית על זמינות האמהות לבדיקה. בנוסף, איסוף דוגמאות זרמה הוא זמין יותר מאיסוף דם או שערות של פרות. לפי כך, פיתחנו מערכת לקביעת אבהות המבוססת על בדיקת סמנים גנטיים באב ובצאצא בלבד תוך חישוב רמת המהימנות של הבדיקה בהתאם לכמות הסמנים, מספר האללים של הסמן ושכיחותם באוכלוסייה. זוג האללים של הצאצא לסמן גנטי נתון נתרמים האחד מהאב והאחר מהאם. אם הסמן הגנטי אינו פולימורפי, כלומר יש לו רק אלל יחיד באוכלוסייה, אז גם הצאצא וגם

של התפלגות בִּינוּמית $\sqrt{pq/n}$, כאשר p ו־ q הם שיעור הטעות וההצלחה ברישום קרבה גנטית ו־ n הוא מספר התצפיות.

תוצאות

באיור 1 מודגמת השיטה של בדיקת אבהות. שערות של קבוצת פרות, שהן בנות משוערות לפר שץ, נבדקו לשני סמנים גנטיים ב־זמנית (CYP21, DU2S1) באותה ראקצית PCR. הגנוטיפ של הפר שץ מופיע בצד שמאל של התמונה. ב־11 מתוך 12 הפרות מופיע אלל של הפר שץ בכל אחד משני הסמנים הנבדקים. נמצאה ראייה לשלילת האבהות של הפר שץ לפרה אחת על בסיס בדיקה של 2 סמנים גנטיים. באיור 2 ו־3 מוצגות תוצאות של מספר פרות לכל אחד מהפרים אדיר, פרחח, גבי ו־שוואג משערות (עיגול ריק) או דם (עיגול מלא) ל־3 סמנים גנטיים נוספים. בכל קבוצת פרות נמצאה לפחות פרה אחת, שהגנוטיפ שלה לא מכיל אלל של האב המשוער ולכן היא לא יכולה להיות בתו.

בטבלה 2 מוצגות תוצאות בדיקת אבהות במדגם פרות. נמצאו 9 פרות מתוך 176 בקיבוצים, שאינן בנות לאב כפי שמופיע ברישומי ספר העדר. ל־5 פרות נמצא גנוטיפ לסמן גנטי יחיד שאינו תואם את הגנוטיפ של האב המשוער; ל־4 פרות אחרות נמצאו שני סמנים גנטיים שבהם אין התאמה בין גנוטיפ הפרה והאב המשוער. שיעור הטעות (ש״ט) בקביעת אבהות הוא 5.1 ± 1.6 אחוז. במושב היחיד שבדקנו נמצאו 6 פרות מתוך 39 שאינן בנות לאב המשוער. ש״ט נאמד כ־ 15.4 ± 5.8 אחוז שהוא פי 3 מזה בקיבוצים. בבדיקה נוספת נמצאו 5 פרות במשק המושבי שלא נולדו במשק ו־3 מהן נשללו כבנות של האב המשוער. לפי כך, אם כוללים בחישוב רק פרות שנולדו במשק, מתקבל ש״ט של 8.8 ± 4.9 אחוז הגבוה מזה שנתקבל בקיבוץ.

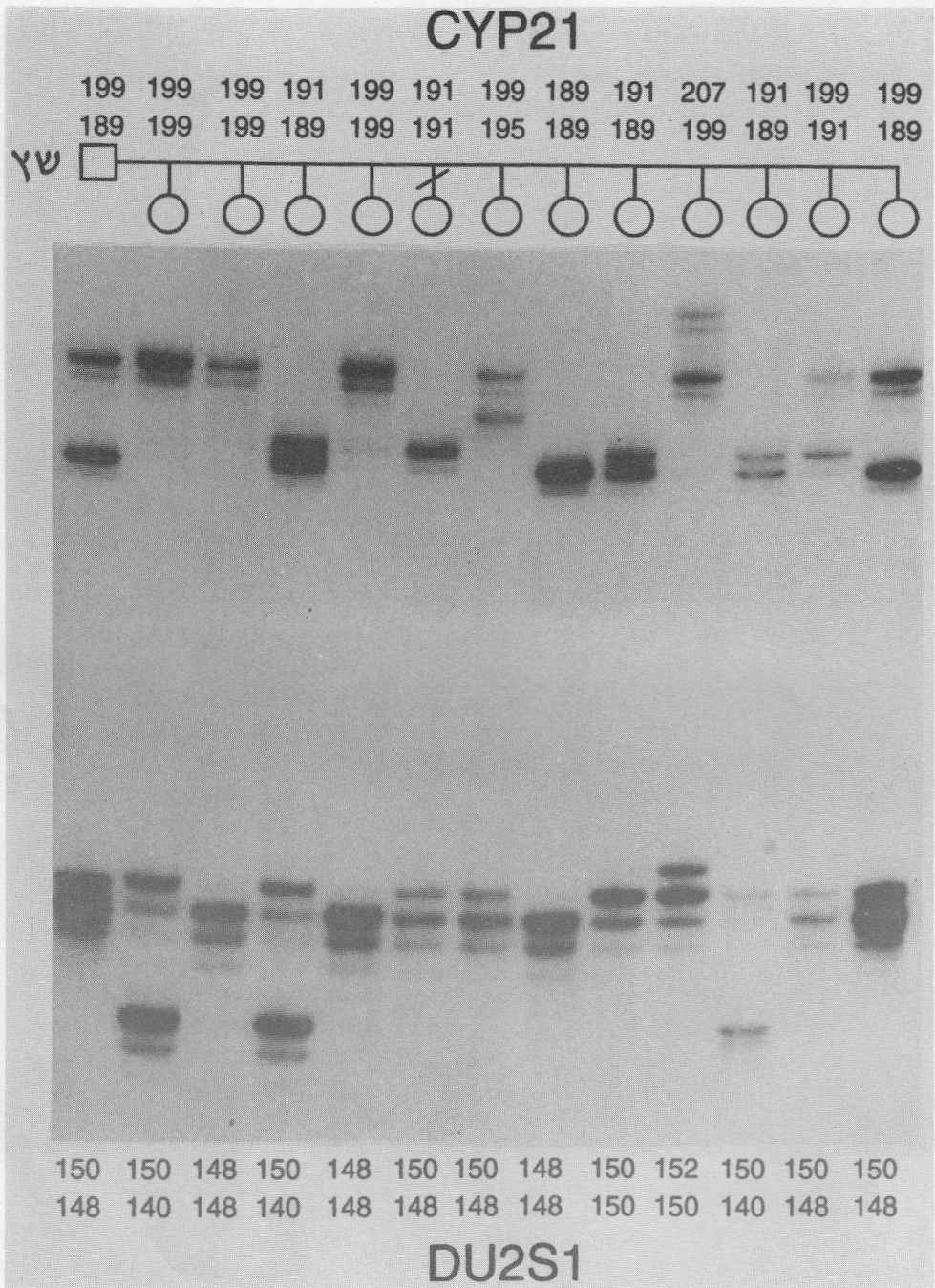
בטבלה 3 מוצגות תוצאות בדיקת האבהות של פרים מהאגודות להזרעה. מתוך 124 פרים נמצאו שלושה (שלפר, חבר ובטש), אשר אינם בנים לפרים המשוערים פרחח ושוואג. לכל אחד

טבלה 1. פיזור הפרות במשקים ומקור הדנ"א של הפרות במדגם.

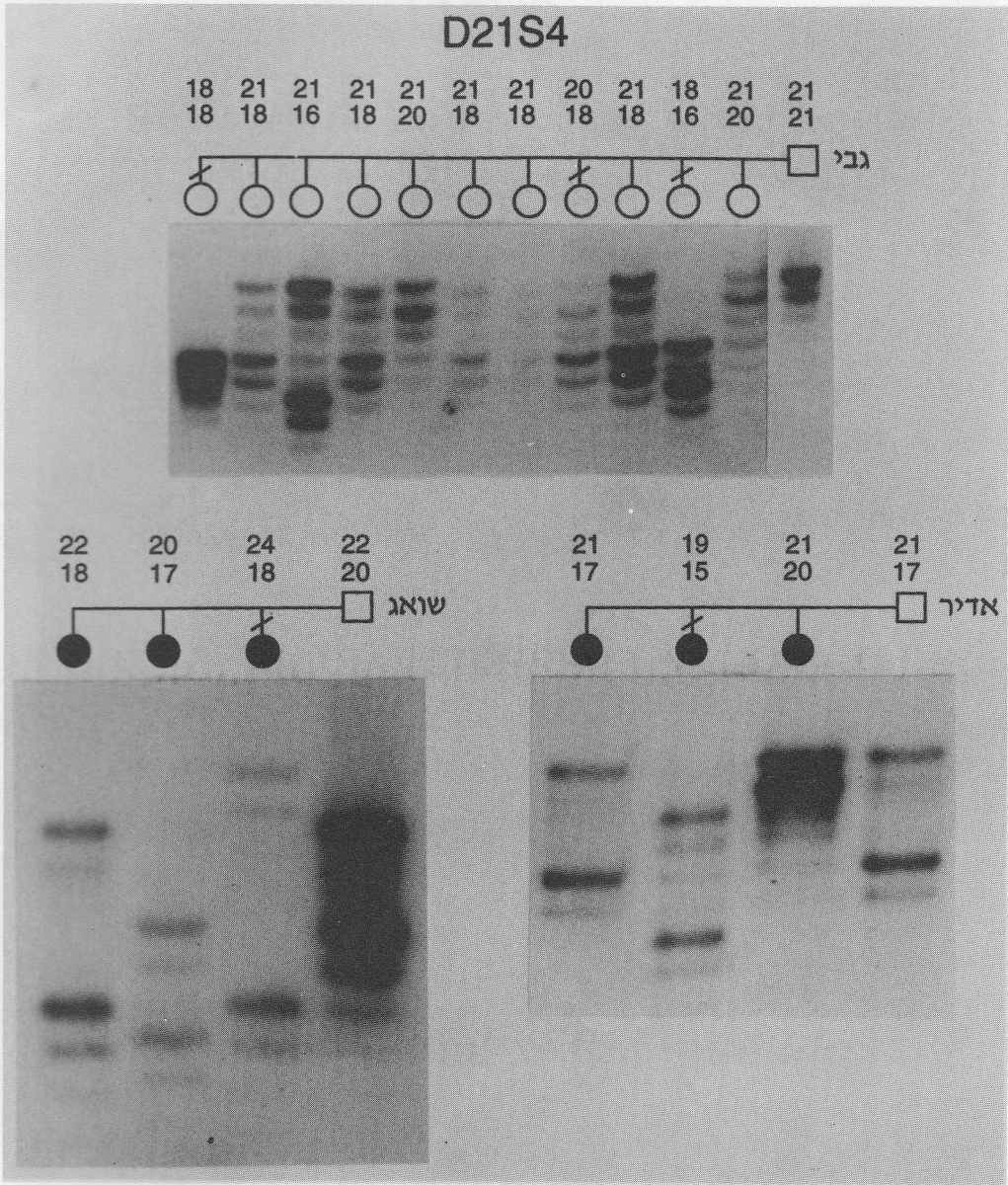
מקור הדנא	שם המשק	מס. פרות
שער	צרעה	17
	משמר דוד	5
	נתיב הל"ה	7
	נען	15
	גבעת ברנר	11
	גזר	4
	ניר אליהו	9
	אייל	3
	כפריהושע	39
	דם	עין צורים
יבנה		17
תימורים		20
זיקים		18
נגבה		11
חולדה		16
סה"כ		

לעומת זאת, דגימה של פרות במשק מושבי יחיד אינה מספיקה להסקת מסקנות. דנ"א הופק ממנות זרמה של הפרים ומשיער או דם פרות. לא נבדקו האמהות של הפרות והפרים. לבסיס הנתונים נוספו 22 בדיקות אבהות של פרים שנעשו בהולנד על פי קבוצות דם.

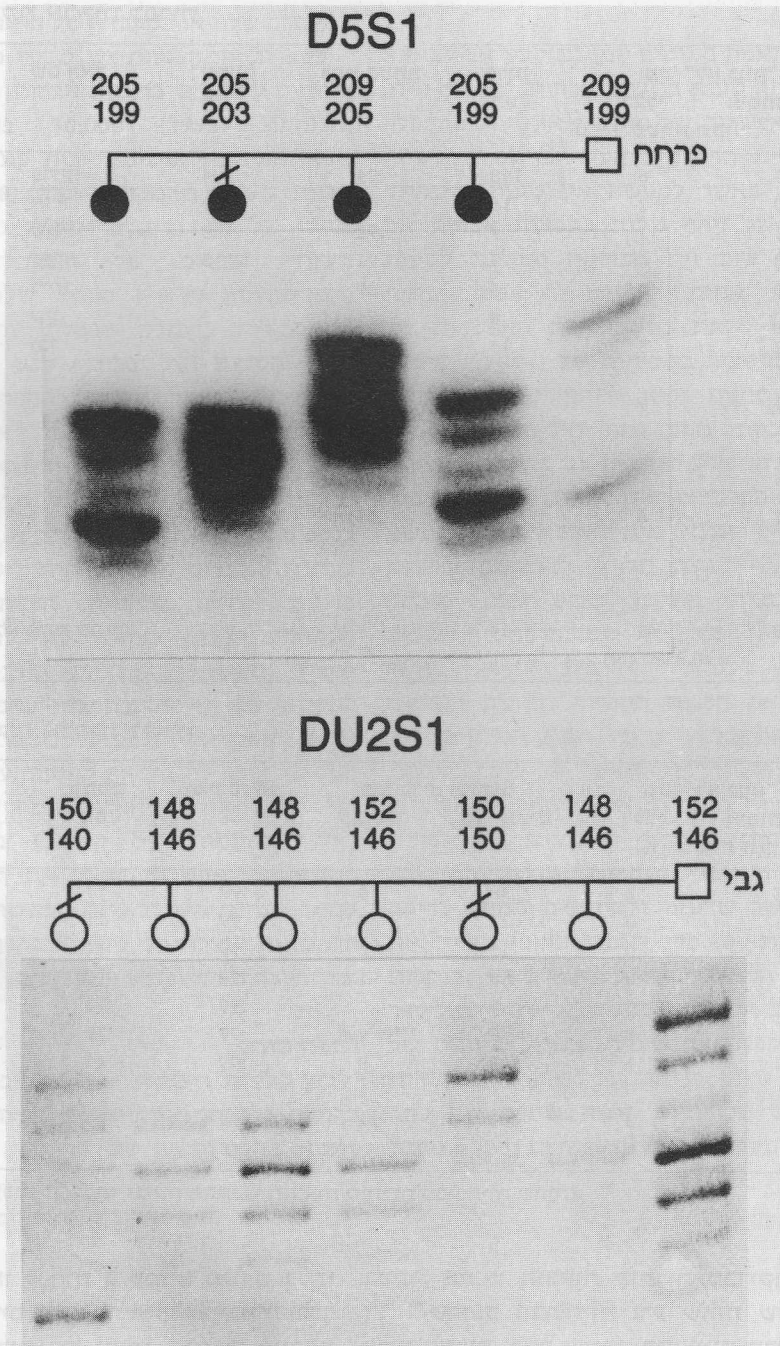
כיום ידועים יותר מ־500 סמנים גנטיים בגֵּנום הבקר. לקבלת עוצמה סטטיסטית מירבית בקביעת אבהות, נבחרו לבדיקה סמנים גנטיים לכל בית אב בנפרד על פי שלושה קריטריונים: 1. פולימורפיות של הסמן הגנטי (מעל 5 אללים); 2. האללים של הסמן הגנטי המופיעים בגנוטיפ האב נמצאים בשכיחות נמוכה באוכלוסייה הכללית; ו־3. מיקום הסמנים על כרומוסומים שונים כדי להבטיח התפלגות בלתי תלויה. כדי לחסוך בעבודה ועלויות נבדק מספר מזערי של כ־3 סמנים גנטיים בפרות המקנה עוצמה סטטיסטית הגבוהה מ־9. לזיהוי אבהות לעומת זאת, לפרים נבדקו 11 סמנים גנטיים בעוצמה סטטיסטית של מעל 99. לאומדן טעות ברישום קרבה גנטית חושבה סטיית תקן



איור 1: גנוטיפ פרות ל-2 סמנים גנטיים ברזומנית (CYP21, DU2S1) למטרת בדיקת אבהות של הפר שץ. עיגולים ריקים מצטיינים דוגמת שיער של פרות. קו מחבר שבור בין פרה לאב מציין שלילת אבהות. גנוטיפ פרה 5 משמאל (191, 191), לסמן CYP21 אינו מכיל אלל אבהי של הפר שץ (189, 199).



איור 2: גוטיפ פרות לסמן הגנטי D21S4 ל-3 קבוצות של האבות גבי, אדיר ושואג. עיגולים ריקים ומלאים מציינים דוגמת שיער ודם, בהתאמה, של פרות. קו מחבר שבור בין פרה לאב מצייין שלילת אבהות.



איור 3: גנוטיפ פרות של האבות פרח וגבי לסמונים גנטיים D5S1 ו-DU2S1, בהתאמה. עיגולים ריקים ומלאים מציינים דוגמת שיער ודם, בהתאמה, של פרות. קו מחבר שבור בין פרה לאב מציינ שלילת אבהות.

טבלה 2. בדיקת אבהות לפרות.

העדר	שם האב	סמנים 'מס'	רמת בטחון	פרות 'מס'	מס' "לא בנות" כללי אימות כפול (+ סטיית תקן)	מס' "לא בנות" כללי אימות כפול (+ סטיית תקן)
קיבוץ	פרחח	1-4	.94	148	6	3
קיבוץ	אדיר	3		16	2	0
קיבוץ	שואג	3	.92	9	1	1
קיבוץ	שץ	3	.91	3	0	0
מושב	לייזר	3	.89	15	0	0
מושב	שץ	3	.91	8	1	0
מושב	גבי	2	.93	16	5	2
סה"כ לקיבוצים		3	.92	176	9	4
						(5.1% ± 1.6)
סה"כ למושב		3	.91	39	6	2
						(15.4% ± 5.8)
סה"כ למושב ללא פרות קנויות				34	3	0
						(8.8% ± 4.9)

טבלה 3. בדיקת אבהות לפרים.

שם האב	סמנים 'מס'	רמת בטחון	מס' פרים נבדקים קב' דם סמ' גנטים	מס' "לא בנים" כללי אימות כפול (+ סטיית תקן)	מס' "לא בנים" כללי אימות כפול (+ סטיית תקן)
פרחח	11	.99	8	2	2
גיוס	11	.99	4	0	0
לייזר	11	.99	2	0	0
שץ	11	.99	1	0	0
רשם	11	.99	9	0	0
גבי	11	.99	2	0	0
שואג	11	.99	5	1	1
סה"כ	11	.99	22	3	3
					(2.4% ± 1.4)

* שלפר וחבר (כמו כן, לכתר ובוטח התקבלו תוצאות סותרות מכופתיות שונות).
** בטש.

מהפרים נמצאו לפחות 2 סמנים גנטיים בלתי תלויים המעידים על טעות ברישום אבהות ובכך שוללים אפשרות של טעות בבדיקה הנובעת ממוטציה בסמן הגנטי. שיי"ט בפרים הוא 2.4 ± 1.4 אחוז והוא נמוך פי 2 מזה שבנקבות. בהוסף, נמצאו תוצאות סותרות מבדיקות על דנ"א שהופק מכופתיות זרע שונות של שני פרים נוספים, כתר ובוטח. התוצאות מכופתית זרע אחת התאימו לאב המשוער, בעוד שהתוצאות מהכופתית האחרת שללו אבהות.

דיון

במעבדה שלנו או במעבדה של האגודה להזרעה. בספרות המקצועית יש מספר מצומצם של דיווחים על שי"ט ברישום אבהות; בהולנד בדק בובנהאוז (1992) 10,000 פרות ומצא אי־התאמה בין גנוטיפ האבות לגנוטיפ הפרות הבנות ב־10% מהמקרים. רנדל (1958) העריך שי"ט של 4% ברישום אבהות בעדרי הבקר השוודי ובפרים של האגודות להזרעה. ניימ־סורנסון (1958) העריך שלפחות ל־5% מהמבכירות בדנמרק שושלת יוחסין שגויה. אחוז הטעות של פרות יקבע את שיעור המהימנות וגודל המדגם הדרוש למבחן הצאצאים של הפרים. עד עתה לא היה בידינו אומדן לשי"ט באבהות בעדר הישראלי. תוצאות המדגם הנוכחי מצביעות על שי"ט של 5% בנקבות בקיבוצים ו־2.5% בזכרים. את השי"ט בעתודות וזכרים ניתן להפחית ל־0 במצעות בדיקת אבהות שגרתית לפרות שנבחרות כעתודות לפרים צעירים עוד לפני היכנסם למבחן הצאצאים. את השי"ט בנקבות ניתן להקטין על ידי הסברה למזריעים על גורמי שי"ט אפשריים ושימוש מוגבר ומתוחכם במסופון. ניתן להגביר את הפיקוח על המעבדות של שתי האגודות להזרעה והמזריעים על ידי בדיקה מדגמית של קבוצות פרות משני המרחבים. האפשרות לבצע את הבדיקה של סמנים גנטיים על חלב פרות מפשטת את איסוף הדוגמאות ויוצרת כלי ניהולי לבקרה של שי"ט נמוך בעבודת המעבדות והמזריעים.

הבעת תודה

לדן קלי על ריכוז הנתונים על אבהות שנעשו בהולנד, ולרפתנים על שיתוף הפעולה באיסוף דוגמאות הדם והשער של הפרות.

רשימת הספרות נמצאת בידי המחברים.

אי־התאמה בגנוטיפ סמן גנטי בין אב לצאצא משמעותה טעות ברישום אבהות. יחד עם זאת, קיימת אפשרות של מוטציה או טעות בהכפלה של אנזים הפולימרז העלולים לגרום לשינוי בגנוטיפ, כאשר למעשה אין טעות באבהות. במקרה של זיהוי טעות בקביעת אבהות או מבצעים שוב את הבדיקה והסיכוי לטעות חוזרת של אנזים הפולימרז הוא אפסי. לעומת זאת, יש לקחת בחשבון את האפשרות של הופעת מוטציה בשכיחות של 1 לאלף. שימוש במספר סמנים יביא לזיהוי טעות בקביעת אבהות ביותר מסמן גנטי יחיד ובכך יבטל את הסיכון להשפעת מוטציה על קביעת האבהות. למחצית הפרות שנתגלו "לא בנות" של האבות המשוערים נמצא אימות כפול על ידי שני סמנים גנטיים בלתי תלויים המבטלים אפשרות של מוטציה. התקבל שי"ט גבוה ומובהק סטטיסטית בנקבות של הרפת המושבית (15.4%), לעומת הקיבוצית (5.1%). כאשר הוצאנו את הפרות הקנויות מניתוח הנתונים במושב התקבל שי"ט של 8.8%, הגבוה גם הוא מזה בקיבוצים. המדגם של 34 פרות במושב, ללא הפרות הקנויות, אינו מספיק כדי לקבוע אם קיימים הבדלים מובהקים בין השי"ט הקיבוצי והמושבי. יחד עם זאת, הפער בשי"ט בין המושב שדגמנו והקיבוצים מחייב בדיקה בקק מתאים, כדי לאמוד באופן מדויק את השי"ט המושבי. שי"ט של כ־5% בנקבות בקיבוצים הוא כפול מזה שבזכרים. ניתן לייחס זאת להקפדה על ביצוע הזרעות מכוונות של עתודות ודיוק בדיווח על הזרעות. התוצאות הסותרות מכופתיות זרמה שונות של כתר ובוטח מעלות את האפשרות של טעות