

זיהוי חיידקים מחוללי דלקת נרתיק נמקית בשיטות מטאגנומיות
Identification of microbial communities associated with Bovine Necrotic
Vulvovaginitis using metagenomic methods

דוח לתכנית מחקר מספר 705-0029-10
מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף ענף בקר ומספוא.

יובל גוטליב- ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, האוני' העברית בירושלים, רחובות.
נחום שפיגל- ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, האוני' העברית בירושלים, רחובות.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים*.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : לא

חתימת החוקר _____

***ללא איורים.**

תכן עניינים :

1 עמ' פותח.
2 תכן עניינים.
3 תקציר.
3 מבוא ומטרות.
4 עיקרי ניסויים ותוצאות.
8 דיון ומסקנות.
9 רשימת ספרות.

תקציר:

1. הצגת הבעיה: מחלת דלקת נרתיק נמקית (דנ"נ) פוגעת לרוב במשקים מאוחדים גדולים, וגורמת לנזקים כלכליים קשים בגין פגיעה בפוריות הפרות, ירידה בתנובה, הוצאות טיפול ובהעדר טיפול אף לתמותה. ברוב הפרות לאחר ההמלטה מתפתחת בנרתיק דלקת שגרתית (דנ"ש) חולפת, אולם בדנ"נ הדלקת הופכת נקרוטית, כנראה כתוצאה מזיהום פולימיקרוביאלי שבו חיידקים מסייעים זה לזה במנגוני האלימות וגורמים למצב הספטי הקשה האופייני למחלה.
2. מטרת המחקר: מטרתו העיקרית של המחקר היא לזהות בשיטות מטאגנומיות את המערכת המיקרוביאלית האחראית להתפתחות המחלה.
3. שיטות העבודה: דגימות מנרתיקים של פרות חלב נדגמו ממשקים שונים באמצעות מטושים וביופסיה ע"פ קרטריונים של סוג משק וימים משוערים ממועד ההמלטה. דנ"א מוצה מהדגימות ומקטעי החיידקים הוגברו והפרדו בגיל מתאים, בנוסף נערך זיהוי מביופסיות בשיטת ריצוף עמוק.
4. תוצאות עיקריות: מגוון חיידקים דיפרנציאלי נמצא בין הפרות השונות טרם המלטה. נמצאו אוכלוסיות חיידקים שונות בין פרות עם דנ"נ לפרות עם דנ"ש, מספר חיידקים זהו כחיידקים אינדיקטיביים לדנ"נ.
5. מסקנות: למרות שאוכלוסיית החיידקים הגורמת לדנ"נ שונה מזו הגורמת לדנ"ש, לא נראה כי קיים פרופיל מנבא הופעת מחלה, אולם ניתן למצוא חיידקים יחודיים שונים ואף מנבאים בכל אחד ממופעי דלקת הנרתיק.

מבוא ומטרות:

דלקת נרתיק נמקית (דנ"נ) בבקר (Bovine Necrotic Vulvovaginitis) הופיעה לראשונה ברפתות החלב המאוחדות בישראל בשנת 2000 ומאז גורמת להפסדים כלכליים במשקים הנפגעים בעיקר כתוצאה מירידה בפוריות (מספר ימים בין הריונות), עלות טיפול והוצאות פרות חולות [1-2]. המחלה מופיעה לאחר ההמלטה ופוגעת בעיקר במבכירות, ולעיתים אף בפרות בוגרות ומאופיינת בדלקת כיבית נרחבת של הנרתיק, הגורמת לנמק של רקמות רכות וככל הנראה כל החיות סובלות גם מדלקת רחם חמורה. בחלק מהמקרים התהליך הדלקתי מתפשט בתעלת ההמלטה ומערכת המין ומלווה בדלקת קרום הבטן והדבקויות. התפתחות סיסטמית של המחלה עלולה להוביל למוות [3]. במטרה למצוא את הגורם למחלה נערך מחקר לזיהוי נוכחות חיידקים בפרות חולות בשיטת התירבות ונמצא דומיננטי החיידק *Prophyromonas levii* ויוחס לו תפקיד בגרימת מחלת הדנ"נ.

השוואת ביופסיות מנרתיקי פרות במשקים שונים מגלה שינויים ייחודיים המאפיינים את תהליכי המחלה בדנ"נ השונים מהתהליכים המופיעים בדלקות נרתיק שגרתיות לאחר ההמלטה. בפרות החולות במחלה נראה שבשלב הראשוני תאי אפיתל רירית הנרתיק עוברים שינויים אפופטוטיים (מוות תאי מתוכנן) ללא מעורבות גורמים חיידקיים. בשלב הבא, בעקבות השינויים האפופטוטיים, פולשת אוכלוסיה מעורבת של חיידקים בין תאי האפיתל האפופטוטיים וגורמת בהדרגה להרס תאי האפיתל. בעקבות הרס זה נצפתה פלישה של אוכלוסיה מעורבת של חיידקים ליריעות רקמות

החיבור התת-רירית המשגשגת ומעכלת את הרקמות וגורמת להרס נרחב והפצת הזיהום מעבר לפגיעה הראשונית ברירית (4). יש לציין שרוב אוכלוסיית החיידקים בשלב זה של המחלה הינם גרם חיוביים בעוד שהחיידקים המאכלסים את השכבות החיצוניות של הרירית הינם גרם שליליים בעיקר. מאפיין חשוב של המחלה הינו העדר מוחלט של תאים לבנים (בעיקר נויטרופילים) מאזורי שגשוג החיידקים והרס רקמות הרירית ותת-הרירית. בנוסף לכך נצפו חיידקים הפולשים לכלי הדם העשירים בתת-הרירית. התמונה הפתולוגית בפרות הסובלות מדלקת רירית שגרתית לאחר ההמלטה שונה לחלוטין, השינויים מאופיינים בנזק מכאני של הרירית המלווה בפלישה של חיידקים ובתסנון נוטרופילי עשיר. בתסנון זה נראים נוטרופילים רבים הבולעים את החיידקים באזורי הדלקת, תהליך אשר נעדר לחלוטין בפרות הדני"נ (4).

למרות הממצאים שפורסמו עד כה ולאור העדויות שהצטברו במעבדת המחקר, נראה כי במחלה מעורבים מספר גורמים חיידקיים. ניתן לזהות אוכלוסיית חיידקים בשיטות מטאגנומיות המאפשרות תיאור ואיפיון מגוון רחב יותר של חיידקים, ובעיקר כאלו שאינם ניתנים לתירבות [5]. בשיטות המבוססות על גן 16S ribosomal RNA (*rrs*), משתמשים לזיהוי רגיש של זיהומים חיידקיים הגורמים למחלות באדם ובחיות בית ומשק [6].

הרכב אוכלוסיית החיידקים בנרתיק הפרה הנורמלית אינו ידוע, ואף שבודדו חיידקים שונים מפרות החולות בדני"נ, חסר מידע רב על הרכב אוכלוסיית החיידקים בנרתיק פרות במצב זה ובמצבים של טרום המלטה והמלטה שאינה מתפתחת לדני"נ. יתכן ושינויים בהרכב אוכלוסיית חיידקי הנרתיק בעגלות ופרות לפני ההמלטה מהווים גורם סיכון להתפתחות דני"נ לאחר ההמלטה. כלומר, במשקים מסוימים חיידקים ספציפיים המאכלסים את רירית הנרתיק מבלי לגרום נזק בחיות לפני המלטה, מסוגלים לגרום למחלת הדני"נ לאחר ההמלטה מסיבות שאינן ידועות כרגע. אנו סבורים שאיפיון אוכלוסיית חיידקי הנרתיק בשיטות מטאגנומיות בחיות לפני ההמלטה ולאחריה יאפשר לזהות את המינים המעורבים במחלה, ושהרכב אוכלוסיית החיידקים בנרתיק הפרה משפיע על סיכוייה לחלות בדני"נ לאחר המלטה.

מטרת מחקר זה היא לאפיין ולהשוות באמצעות שיטות מטאגנומיות את אוכלוסיית החיידקים בעגלות, מבכירות ופרות בקבוצות הבאות:

- א. חיות לפני המלטה במשקים חופשיים מהמחלה (דגימות מטושים מהנרתיק).
- ב. חיות לפני המלטה במשקי דני"נ במהלך התפרצות המחלה (דגימות מטושים מהנרתיק).
- ג. חיות לאחר המלטה במשקים חופשיים מהמחלה (ביופסיות מלקויות בנרתיק).
- ד. חיות לאחר הממלטה הסובלות מדני"נ וחיות ללא דני"נ במשקי דני"נ בזמן התפרצות (ביופסיות מלקויות ברתיק).

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו:

איסוף דגימות ואנליזת מטושים טרם המלטה: שמונים וחמש דגימות מטושים מנרתיק של פרות חלב מגזע הולשטיין ישראלי נאספו מארבעה משקים (גת, גל און, כפר גליקסון, רגבה). איסוף הדגימות נעשה תוך שמירה על סטריליות מקסימאלית, ובאופן אחיד מעגלות ופרות לפני המלטה, שנמצאו

235 ימים בהריון לכל הפחות. בדומה לשנה הקודמת דני"א הופק ממטושים באמצעות קיטים להפקת דני"א ע"פ הוראות היצרן, הוגבר באמצעות PCR עם תחלים יעודיים להגברת רוב החיידקים הידועים והורץ במכשיר DGGE. מכיוון שכמות ה DNA ממטושים שנלקחו טרם המלטה נמוכה מאוד, הצלחנו לתעד 38 דגימות, מתוכן רק 3 פתחו דני"נ לאחר המלטה. פרופיל החיידקים שהתקבל מהדגימות היה שונה ומגוון בין פרות שונות ולא ניתן היה לקבוע פרופיל יחודי לפרות שפיתחו דני"נ לאחר המלטה. אולם תוצאות רצפי DNA חיידקי שהתקבלו בשיטת ריצוף עמוק תוך שימוש במכשיר 454 (Roche), הראו מגמה שונה בכמות עותקי הדני"א הבקטריאלי בין אוכלוסיות הפרות, ככל שמתרחקים ממועד ההמלטה בעיקר בחיידקי מערכת הפרוטראובקטריה, אשר כמותם היחסית יורדת ככל שמועד ההמלטה קרב בפרות שילקו בדני"נ לעומת כאלו שלא. מכיוון שמדובר בגודל מדגם קטן יהיה צורך לחזור על ניסוי זה בעתיד.

זיהוי חיידקים מביופסיות באמצעות ריצוף עמוק לאחר המלטה: בעקבות מגבלת כמות ה DNA והשונות הגבוהה בין הפרות, חלק מהדוגמאות שנאספו לאחר המלטה נשלחו להפקת DNA איכותית במעבדות חי ברחובות, ולקביעת רצפי חיידקים בשיטת ריצוף עמוק המאפשרת לזהות רמות טקסונומיות שונות שלהחיידקים. אנליזת הרצפים מראה כי בדומה לתוצאות שהתקבלו בעבר באנליזת DDGE, אוכלוסיית החיידקים בנרתיק פרות הלוקות בדני"נ שונה מבנרתיק פרות הביקורת ושוני זה מתבטא ברמת הסוג, המחלקה והמערכה. בנוסף, נראה כי פרופיל אוכלוסיית החיידקים שונה בין פרות ממשקים שונים, בכל הרמות הטקסונומיות: אוכלוסיית החיידקים שונה בין פרות ממשקים שונים באופן מובהק, מלבד במשק B מול D. מכיוון שהרצפים המתקבלים מהאנליזה קצרים יחסית ומשווייכים ל (operational taxonomic unit) OUT ולא למינים, התייחסנו אל רמת המחלקה בהדגמת השוני בין הפרות השונות. ניתן לראות כי מחלקת Bacteroidia נמצאה באופן מובהק בכמות ובשכיחות רבה יותר באוכלוסיית הדני"נ ואילו מחלקת Clostridia נמצאת בשכיחות גבוהה יותר בפרות הביקורת. בבחינת סוגי החיידקים נמצא כי ישנם סוגי חיידקים הנמצאים באופן מובהק בשכיחות גבוהה ובכמות רבה יותר באחת מאוכלוסיית המחקר. על מנת לאתר מי מבין ה-OTUs אחראים עיקריים לשוני בין הקבוצות, חושב ערך "Indicator Value" (IV) עבור כל OTU. IV מורכב מתדירות ההארעות של כל OTU ושכיחותו בכל קבוצת מחקר. ערכי IV נעים בין 0-100, כאשר הערך גדל אם ה-OTU מופיע בתדירות ו/או בשכיחות גבוהה. באוכלוסיית הפרות הנגועות, נמצאו אינדיקטיביים ביותר *Parvimonas* spp. (IV=98.9), שני מיני *Porphyromonas* (IV=98.6, 97.3), *Bacteroides unclassified Bacteroidales* (IV=98.5), *unclassified Clostridiales* (IV=93.6), *unclassified Clostridiales* (IV=92).

באוכלוסיית פרות הביקורת נמצא אינדיקטיבי ביותר *unclassified Clostridiales* (IV=97.3).

פריימרים ספציפיים תוכננו עבור ה OTU האינדקטיביים ביותר כדי למצוא רצף גדול יותר ולשייכם למינים, ובנוסף להדגים אותם שוב ולוודא המצאותם בדגימות השונות. *Parvimonas* נמצא בכל דגימות הדני"נ ובנוסף גם בדגימות ביקורת ממשק אחד. *Un. Clostridiales* נמצא בכל פרות המדגם, לעומתם, *Porphyromonas* ו- *Bacteroides* נמצאו רק בדגימות דני"נ.

דיון ומסקנות:

מחלת דני"נ נובעת בעיקר מזיהום חיידקי [3]. היכולת לאפיין באופן מדויק את הגורם למחלה הינה הכרחית על מנת לספק טיפול ולפתח אמצעי מניעה מתאימים. שיטות המבוססות על גידול חיידקים בתרבית במקרים רבים לא מספיקות על מנת שנוכל לרכוש יכולת זו. אחת הסיבות לכך יכולה להיות האינטראקציה בין החיידקים השונים אשר משפיעה על מופעם ברקמה וכן בתרבית. חיידקים אשר לכאורה אינם פתוגניים עשויים להשפיע על גשוג חיידקים פתוגניים ברקמה ולהשפיע על התפתחות מחלה. לפיכך, יש חשיבות רבה להבנת הרכב אוכלוסיית החיידקים בלקויות מנרתיק פרה הסובלת מדני"נ לעומת פרה הלוקה בדלקת נרתיק שגרתית. במהלך המחקר נעשה שימוש בשיטות מטאגנומית לזיהוי האוכלוסייה החיידקית, אשר אינן תלויות בגידול החיידקים במעבדה.

בסיום שנת המחקר הראשונה בה זיהינו פרופיל חיידקים שונה בין פרות שפיתחו דני"נ לבין פרות שלא פתחו את המחלה, שיערנו שהופעת המחלה קשורה לשינוי בחברת החיידקים ברירת הנרתיק לקראת ההמלטה. לפיכך אספנו דוגמאות מטושים מנרתיק פרות לקראת המלטה. באנליזת DGGE של דוגמאות מטושים מפרות הנמצאות בימי הריון אחרונים נמצא כי אוכלוסיית החיידקים מצומצמת יחסית, אולם שונה מאוד בין פרות שונות. בנוסף, מספר הפרות שכן פיתחו דני"נ בסופו של דבר היה מצומצם ($n=3$) ולא הראה פרופיל יחודי. לפיכך, בעקבות הזמינות העכשווית של שיטת ריצוף עמוק לקביעת מעקבות חיידקים (שלא היתה זמינה בזמן כתיבת ההצעה) ועל מנת לאשש את ההשערות שמועלות כתוצאה מהתוצאות הראשוניות שהושגו ולברר טוב יותר, המשכנו את עבודת המחקר לזיהוי מגוון החיידקים המעורבים במחלה בשיטה זו המאפשרת זיהוי יחידות טקסונומיות של חיידקים וכימות יחסי שלהם בדוגמה. מאנליזת הרצפים והדוגמאות כנראה שלפרות בהן אוכלוסיות חיידקים המשתייכות לפרוטאובקטריה סיכוי גבוה יותר ללקות בדני"נ. מכיוון שלשמחת המגדלים אירוועי דני"נ היו נמוכים בתום תקופת המחקר, יש להתייחס לממצא זה בזירות מכיוון שלמעשה רק 3 פרות שנדגמו מככל הפרות טרם המלטה לקו בסופו של דבר בדני"נ ואפשרו את השוואה.

השוואה בין רצפי החיידקים שהתקבלו בדגימות השונות מראות שונות מובהקות בין ליקויי דני"נ וליקויים שגרתיים וכן תלות ברפת ממנה הגיעה הדגימה. החיידקים העיקריים שכמותם היחסית עולה בלקויות דני"נ שייכם למחלקת הבקטרואידיטס. נמצאו מספר רצפים איננדקטיביים המופעים יותר בלקויות דני"נ, אולם חלקם גם מופיעים בדגימות הביקורת. מכיוון שהדגמת הרצפים האינדקטיביים נעשית באנליזת PCR רגילה שתוצאותיה הן יש או אין, החיידקים האינדקטיביים עשויים להמתא בכמות ניכרות בלקויות דני"נ לעומת לקויות הביקורת. לפיכך דרושה אנליזה כמותית.

בכל מקרה, נמצאו חיידקים מהמינים *Prophyromonas* ו-*Bacteriodes* שנמצאים רק בלקויות דניני וראוי לבחון את תפקידם ואת תפקידם של המינים האינדקטיביים האחרים בהתפתחות המחלה. בנוסף, יתכן ולקבוצת *Clostridiales* אפקט מגן התלוי במינון.

רשימת ספרות:

1. Blum, S., Brenner, J., Friedgut, O., Stram, Y., Koren, O., Dagoni, I., Munbaz, A. and Elad, D. *Isolation of Porphyromonas levii from vaginal samples from cows in herds negative for bovine necrotic vulvovaginitis*. Vet Rec, 2008. **163**(25): p. 745-7.
2. Yeruham, I., et al., *Necrotic vulvovaginitis in dairy cattle in Israel*. Vet Rec, 2007 **160** : (5) p. 164-166.
3. Elad, D., Friedgut, O., Alpert, N., Stram, Y., Lahav, D., Tiomkin, D., Avramson, M., Grinberg, K., Bernstein, M., *Bovine necrotic vulvovaginitis associated with Porphyromonas levii*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(3): p. 505-507.
4. שיינין, ש. ושפיגל, נ. (2009) חקירת השינויים והמיקרואורגניזמים המעורבים בדלקת נרתיק נמקית. בבקר. הכנס השנתי ה-21 למדעי הבקר, ירושלים, יוני 2009. חוברת תקצירים עמ' 57-58.
5. Rogers, G.B., M.P. Carroll, and K.D. Bruce, *Studying bacterial infections through culture-independent approaches*. J Med Microbiol, 2009. **58**(11): p. 1401-1418.
6. Sontakke, S., Cadenas, M. B., Maggi, R. G., Diniz, P. P. V. P. and Breitschwerdt, E. B. *Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology*. Journal of Microbiol Methods, 2009. **76**(3): p. 217-225.