

**משרד החקלאות - דו"ח לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי**

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
845 - 0277 - 11	בחינת מהלך הפרשה הצואתית של <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> וכייל הנוגדנים לחיידק בבקר לחלב

ג. כללי		
מוסד מחקר של החוקר הראשי		
המכון הווטרנרי		
תאריכים	סוג הדו"ח	
תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון	תקופת המחקר עבודה מוגש הדו"ח	מסכם
שנה / חודש	תחלה סיום שנה / חודש	שנה / חודש
/	12 / 2012	01 / 2011

ב. צוות החוקרים		
שם פרטי	שם משפחה	
דניאל	אלעד	חוקר ראשי
חוקרים משניים		
אורי	קורן	1
זינה	ביידר	2
קליה	גרינברג	3
עדין	שווימר	4
		5
		6
		7

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח		
שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
הנהלת ענף בקר מוסד המחקר המבצע	846	50 41

ה. תקציר שים לב - על התקציר להיכתב בעברית לפי סעיף ה' שבהנחיות לכתיבת דיווחים מחלת הבת שחפת, הנגרמת ע"י החיידק *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), ופוגעת עיקר במעלי גרה. החיידק מופרש בצואה של חיות נגועות, גם ללא סימנים קליניים. עגלים/טלאים עד גיל כ-6 חודשים הן החיות שנמצאות בסיכון הגבוה ביותר להדבקות, עקב חשיפה לצואה מזוהמת בחיידק. אין למחלה טיפול או חיסון (בישראל) ולכן הדרך היחידה להתמודד איתה היא לצמצם את הזיהום הסביבתי בחיידק באמצעים ממשקיים והוצאת פרות מפרישות. היות והספרות מדברת על חוסר עקביות בהפרשת החיידק יש חשיבות בזיהוי מתכונת הפרשה שתאפשר לקבוע פרוטוקול דיגום שיבטיח את הסיכויים הטובים ביותר לזהות חיות מפרישות.

מטרות המחקר היו קביעת מתכונת דיגום צואות מפרות חשודות כנגועות בבת שחפת אשר תמטב את סיכויי זיהוי פרות מפרישות MAP, השפעת עקת ההמלטה על הפרשה ובדיקת הקשר בין רמת נוגדנים לערכי בדיקת ה-qPCR דגימות צואה שנלקחו משך 7-5 ימים מההלך שבוע אחד מ-16 פרות ו-15 עגלות, לפני ואחרי המלטה, נבדקו בשיטת qPCR לנוכחות חיידקי MAP כולל כימותם.

תוצאות המחקר הראו כי הפרשת החיידקים היא עקבית, למרות ששינויים חד פעמיים ברמת הפרשה אפשריים. דגימה אחת יכולה, לכן, לספק התוויה אמينة באשר למצב פרה. כמוכן לא נמצאה השפעת עקת המלטה על רמת הפרשה ולא נמצא קשר בין רמת הנוגדנים בחלב/דם לבין רמות הפרשה.

על פי ממצאי המחקר נקבעו קריטריונים חדשים, שהיו עד עתה שרירותיים, להגדרת החיות המפרישות על פי הסכנה ההדבקה שהן מהוות לחיות אחרות. קריטריונים אלה יובאו לידיעת הרופאים המטפלים. ממצאי המחקר מצדיקים את הרחבתו למשקים נוספים לאישוש הממצאים

ו. אישורים

הנני מאשר שקראתי את ההנחיות להגשת דיווחים לקרן המדען הראשי והדו"ח המצ"ב מוגש לפיהן

חוקר ראשי פרופ. דניאל אלעד	מנהל המחלקה פרופ. דניאל אלעד	מנהל המכון הווטרנרי (פרקליט)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
-------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	----------------------	------------	--------------------------

בחינת מהלך ההפרשה הצואתית של *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* וכייל הנוגדנים לחיידק בבקר לחלב

Assessing the fecal shedding frequency of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and antibody titer variations in dairy cows.

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף החלב
ע"י

דניאל אלעד, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון

Daniel Elad, Dept. of Clinical Bacteriology and Mycology. The Kimron Veterinary Institute,
P.O.Box 12, Bet Dagan 50250, Israel. daniel.elad@gmail.com

אורי קורן, החקלאית

Ori Koren, Hachaklait Veterinary Services Ltd, P.O. Box 3039 Caesarea Ind. Park, Israel.
mkoren@hachaklait.co.il

זינה ביידר, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון

Zina Baider, Dept. of Clinical Bacteriology and Mycology. The Kimron Veterinary Institute,
P.O.Box 12, Bet Dagan 50250, Israel. zinab@moag.gov.il

עדין שווימר, מועצת ענף החלב

Adin Shwimmer, Israeli Dairy Board, 4 Derech Ha'Horesh, Yehud 56470, Israel.
adin@milk.org.il

קליה גרינברג, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון

Kalia Grinberg, Dept. of Clinical Bacteriology and Mycology. The Kimron Veterinary
Institute, P.O.Box 12, Bet Dagan 50250, Israel. mkaliag7@walla.com

תקציר

מחלת הבת שחפת, הנגרמת ע"י החיידק *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), ופוגעת בעיקר במעלי גרה. החיידק מופרש בצואה של חיות נגועות, גם ללא סימנים קליניים. עגלים/טלאים עד גיל כ-6 חודשים הן החיות שנמצאות בסיכון הגבוה ביותר להדבקות, עקב חשיפה לצואה מזוהמת בחיידק. אין למחלה טיפול או חיסון (בישראל) ולכן הדרך היחידה להתמודד איתה היא לצמצם את הזיהום הסביבתי בחיידק באמצעים ממשקיים והוצאת פרות מפרישות. היות והספרות מדברת על חוסר עקביות בהפרשת החיידק, יש חשיבות בזיהוי מתכונת ההפרשה, שתאפשר לקבוע פרוטוקול דיגום שיבטיח את הסיכויים הטובים ביותר לזיהוי חיות מפרישות.

מטרת המחקר היא לקבוע מתכונת דיגום צואות מפרות חשודות כנגועות בבת שחפת אשר תמטב את סיכויי זיהוי פרות מפרישות MAP. כמו-כן יבדוק המחקר את השפעת עקת ההמלטה על הפרשה. דגימות צואה שנלקחו משך 5-7 ימים במהלך שבוע אחד מ-16 פרות ו-15 עגלות, לפני ואחרי ההמלטה, נבדקו בשיטת qPCR לנוכחות חיידקי MAP כולל כימותם. תוצאות המחקר הראו כי הפרשת החיידקים היא עקבית, למרות ששינויים חד פעמיים ברמת הפרשה אפשריים. דגימה אחת יכולה, לכן, לספק תוויה אמינה באשר למצב פרה. כמו-כן לא נמצאה השפעת עקת המלטה על רמת הפרשה ולא נמצא קשר בין רמת הנוגדנים בחלב/דם לבין רמת הפרשה בצואה. על פי ממצאי המחקר נקבעו קריטריונים חדשים, שהיו עד עתה שרירותיים, להגדרת החיות המפרישות על פי סיכון ההדבקה שהן מהוות לחיות אחרות. קריטריונים אלה יובאו לידיעת הרופאים המטפלים. ממצאי המחקר מצדיקים את הרחבתו למשקים נוספים לאישוש הממצאים

.....
הצהרת החוקר הראש י:

הממצאים בדו " ח זה הינם תוצאות ניסויי מ.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : כן (בעיקר לרופאים המטפלים). ההמלצות תופצנה באמצעות דואר אלקטרוני דרך השירותים הווטרינריים

חתימת החוקר  **תאריך: 20 לינואר 2013**

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר ר:

1. בהכנה

בחינת מהלך ההפרשה הצואתית של *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* בבקר לחלב

דו"ח מסכם

אלעד ד. (חוקר ראשי), קורן א, ביידר ז, שווימר ע, גרינברג ק.

מבוא

מחלת הבת שחפת, הנגרמת ע"י החיידק *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP), היא בראש וראשונה מחלה של מעלי גרה אך היא תוארה במקרים נדירים גם בחיות אחרות (Beard et al., 2001). המחלה מיוחדת בכך שאוכלוסיית החיות בסיכון היא בעיקר עגלים עד גיל 6 חודשים (Larsen et al., 1975) אך סימנים קליניים מופיעים רק בחיות בוגרות (בכ-10% מהן), בתדירות העולה עם הגיל (Olsen et al., 2002). דרך ההדבקה העיקרית היא oro-fecal כאשר חיות בוגרות המפרישות את החיידק הן מקור הזיהום. דרכי הדבקה נוספות הן דרך חלב/קולוסטרום מזוהם מהסביבה או עקב הפרשת החיידק דרך העטין או הדבקה תוך רחמית. אפשרות ההעברה באמצעות זרמה לא ברור (Olsen et al., 2002). החיידק מיישב את מערכת העיכול, בעיקר את הרקמה הלימפתית (Payer's patches) (Siguroadottir et al., 2001) ויוצר מוקדים אשר בחלקם מתנקים מהחיידק ובחלקם הוא מתרבה ויוצר מוקדים חדשים (Cocito et al., 1994). הנגעים מאופיינים בתגובה גרנולומטוטית אשר, בניגוד לאלו הנגרמות ע"י חיידקים יציבי חומצה אחרים כגון שחפת, איננה מגבילה את התפשטות החיידק (Lei et al., 2008). תגובה זו גורמת להתעבות דופן המעי ובכך לירידה בתפקודי ספיגת הנוזלים והמזון אשר מובילים לשלשולים והרזיה.

מקובל לחלק את שלבי המחלה בבקר ל-4 (תרשים 1) (Whitlock & Buergelt, 1996):

- א. שלב חבו ובו אין סימנים קליניים, אין נוגדנים, הפרשת החיידק בצואה, אם היא קיימת היא מזערית.
- ב. שלב תת קליני, עדיין ללא סימנים קליניים אך עם תגובה חיסונית תאית, תחילת יצירת נוגדנים והפרשת כמויות לא גדולות של החיידק בצואה.
- ג. שלב קליני בו מופיע שלשול, תגובת נוגדנים מוגברת, תגובה תאית דועכת והפרשת החיידקים בצואה. מצבי עקה כגון זו של המלטה, בעיקר במבכירות, עלולה לגרום למעבר ממצב תת קליני לקליני (Karcher et al., 2008).
- ד. שלב קליני מתקדם ובו שלשולים בעוצמה רבה, הפרשת כמויות גדולות של החיידק בצואה ובמקרים רבים, עקב מצבי אלח, הימצאותו בחלב, בזרמה וברחם. התגובה התאית נעלמת ולפעמים גם יצירת החלבונים מצטמצמת עקב אי ספיגת חומצות אמינו ממערכת העיכול. פיזית החיה רזה ביותר, למרות שהיא ממשיכה לאכול כרגיל.

התגובה החיסונית בשלבי המחלה הראשונים היא תאית. בהמשך (בגיל כשנתיים) מתפתחת תגובה הומוראלית בה רמת הנוגדנים עולה עם הזמן. במקביל מתגברת הפרשת החיידקים בצואה ודועכת התגובה התאית (Olsen et al., 2002).

הנזקים הכלכליים להם גורמת המחלה כוללים (Pillars et al., 2009):

- א. נזקים ישירים עקב הצורך להוציא מהרפת חיות חולות
- ב. נזקים עקיפים, אותם לעתים קשה לזהות, הנובעים מירידה בעמידות הכללית של החיות הנגועות בפני זיהומים אחרים, ירידה בפוריות וירידה בתנובת החלב כבר בשלבים התת-קליניים. עקב אחוז הוצאת הפרות הגבוה (כ-30% שנתית) בישראל, ייתכן ופרות שסובלות מפגיעות חבויות אלה מורחקות מהרפת מבלי לדעת על השפעת הזיהום ב-MAP על החלטה זו. בכל מקרה יש בכך בכדי למנוע את מימוש הפוטנציאל הגנטי של החיות, על הנזקים הכלכליים הנובעים מכך.

לאחרונה (Pradhan et al., 2011) סווגו הפרות בהתאם להפרשת החיידקי בצואתם:

- א. היעדר הפרשה
 - ב. הפרשה סבילה: פרות שמפרישות את החיידק אליו נחשפו באופן פומי, ללא יישוב מערכת העיכול שלהן. שכיחותן בעדר נגוע לא ברור (Pradhan et al., 2011; Whitlock et al., 2005) אך סביר כי היא גבוהה יותר ככל שהסביבה מזוהמת יותר.
 - ג. הפרשה פעילה: פרות שמפרישות את החיידק לאחר שזה יישב את מערכת העיכול שלהן.
 - ד. מפרישות על (supershedders): פרות שמפרישות מעל 10.000 חיידקים לגרם צואה. הסכנה שפרות אלה מהוות להדבקה של חיות בסביבתן הוא גבוה לעין ערוך מזו שמקורה בקבוצות האחרות וקיימת לכן חשיבות ניכרת לזהותן ולהוציאן מהעדר בעדיפות ראשונה.
- לא קיים טיפול למחלה. יש תרכיבים אשר אינם מונעים הדבקה אך מצמצמים את הפרשת החיידק. צמצום ההפרשה אמנם חשוב, בהתחשב בחשיבות ההעברה ה-fecal-oro שלו, אך בישראל אין אישור להשתמש בתרכיב חיות והוא יכול לשבש את אפשרויות המעקב אחר נגיעות בשחפת. דרך המניעה השנייה היא באמצעים ממשקיים שמטרתם להפסיק את מעגל ההדבקה: הרחקת פרות מפרישות מצד אחד וניתוק העגלים מזיהום צואתי מצד שני.
- ברור לאור האמור לעיל כי יכולת זיהוי הפרות המפרישות מוקדם ככל האפשר והרחקתן מהרפת היא רכיב מרכזי בכל תוכנית להורדת הנגיעות במחלה. ניתן לחלק את דרכי האבחון המיועדים לכך לשתי קבוצות:

1. זיהוי תגובה חיסונית הכוללות

- א. שיטות לגילוי תגובה הומוראלית, בעיקר ELISA. הסגוליות של בדיקה זו היא גבוהה מאד (97%-98%) אך יכולתה לגלות חיות נגועות בשלבי המחלה הראשוניים היא מוגבלת ביותר בגלל היעדרות נוגדנים או נוכחותם בכייל נמוך. בשלבי המחלה המתקדמים (מגיל שנתיים ומעלה) היכולת הזו אמנם משתפרת בהדרגה (מכ-15% עד 85%) אך משך כל הזמן הזה החיות הנגועות לא מזוהות (Collins, 1996).
- ב. שיטות אחרות, בחלקן ישנות (פחות רגישות מה-ELISA) ובחלקן עדיין לא מקובלות לשימוש נרחב כגון אלו שמבוססות על לגילוי תגובה תאית אשר סגוליותן הנמוכה אינה מאפשרת את אימוצן (Olsen et al., 2002)

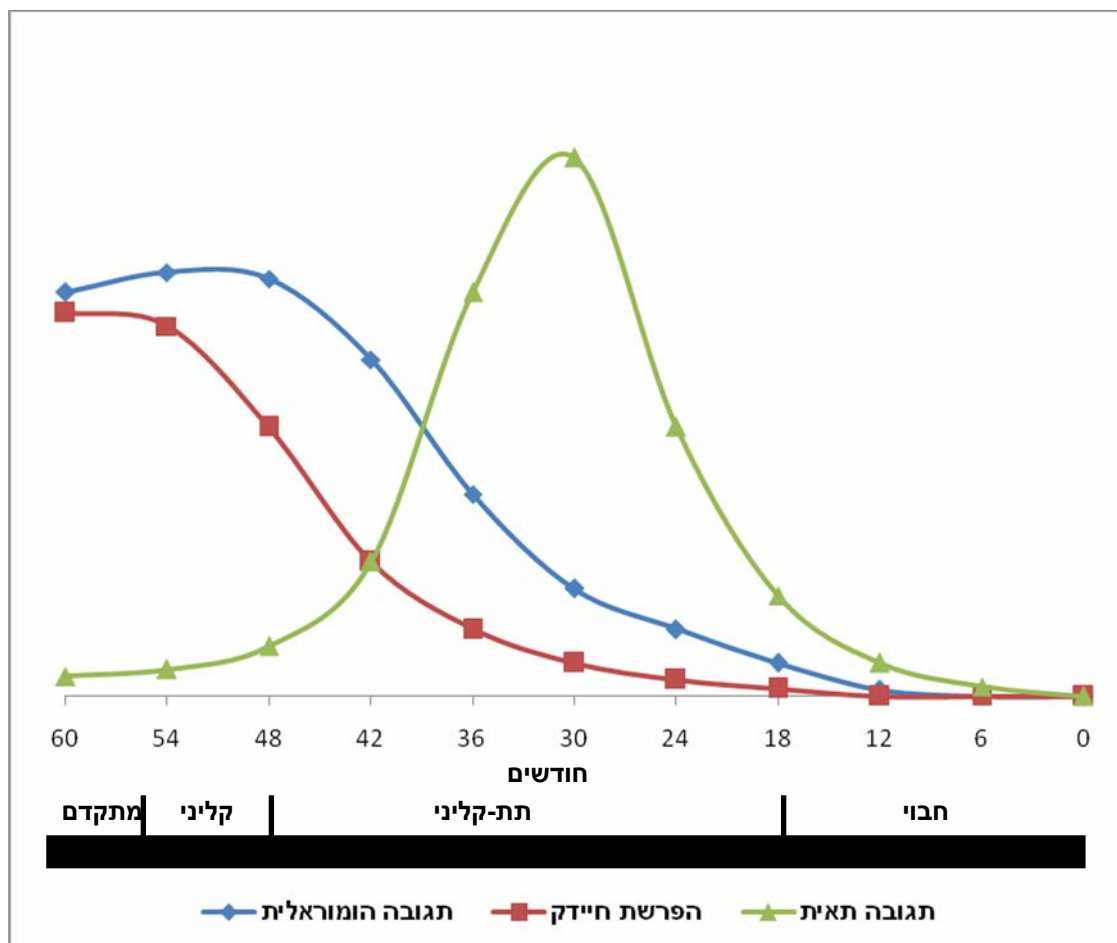
2. גילוי החיידק או מקצת רכיביו

- א. בדיקה מיקרוסקופית. בדיקה זו דורשת טכנאי מיומן, הצפייה הממושכת במיקרוסקופ שוחקת את המבצע ולכן מורידה את הרגישות, היא מאבחנת חיידקים יציבי חומצה ולא MAP באופן ספציפי.
- ב. תרבויות. תהליך מורכב ובעיקר ממושך (חודשיים ומעלה) (Kalis et al., 1999).

ג. PCR. בדיקה מהירה (2 ימים), בעלת סגוליות גבוהה מאד ובעלת רגישות שאינה נופלת מזו של התרביות (Gwózdź et al., 1997). גרסת ה-real time של הבדיקה מאפשרת לקבל מידע כמותי על חיידקי ה-MAP בצואה (Fang et al., 2002).

חסרון משותף לכל הבדיקות בקבוצה זו נובע מהעובדה שהפרשת חיידקי ה-MAP אינה עקבית, תופעה שעלולה להוביל לתוצאה שהיא false negative (Olsen et al., 2002). למיטב ידיעתנו אין מידע על מתכונת ההפרשה: ייתכן והיא מופיעה במחזוריות ארוכה (שבועות-חודשים) וייתכן שהיא מופיעה במחזוריות קצרה (ימים). בדיקת מחזוריות ארוכת הטווח היא עתירת משאבים היות ויש לבצע בדיקות חוזרות במשך פרקי זמן ארוכים. בנוסף משמעותה לקבלת החלטה באשר להוצאת פרה מהרפת היא פחותה היות ומדובר בהחלטה שיישומה הוא מיידי. לקבלת החלטה זו יש משמעות רבה יותר למתכונת הפרשה בטווחי זמן קצרים: ייתכן שביצוע מספר בדיקות במהלך שבוע ישפר משמעותית את היכולת לזהות חיות מפרישות MAP. גורמים שונים יכולים להשפיע על מתכונת הפרשת חיידקי MAP בצואה אך את מרביתם קשה לזהות ולבדוק. גורם אחד אשר את השפעתו ניתן לבדוק בקלות היא עקת ההמלטה, אשר יכולה, כמצוין לעיל, לגרום למעבר משלב תת-קליני לקליני, המלווה בהגברת הפרשת החיידק.

תרשים 1: תיאור סכמתי להמחשת שלבי מחלת הבת שחפת, התגובות החיסוניות התאית וההומוראלית והפרשת חיידקי *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* בבקר



מטרות המחקר

מטרת המחקר העיקרית היא לקבוע מתכונת דיגום צואות מפרות חשודות כנגועות בכת שחפת (חיוביות ב-ELISA אך ללא סימנים קליניים) אשר תמטב (optimize) את סיכויי זיהוי פרות מפרישות MAP.

מטרות נוספות הן:

- א. קיבוץ הערכים המתקבלים מבדיקות ה-qPCR להגדרות בעלות משמעות לרופא/מגדל.
- ב. לבדוק קשר בין בדיקות נוגדנים להפרשת החיידק בצואה
- ג. לבדוק האם ניתן להעריך השתייכות פרה לקבוצת המפרישות הסבילות, המפרישות הפעילות או למפרישות העל.
- ד. לבדוק בדיקה ראשונית האם השונות בתוצאות תלויה בהפרשה בלתי סדירה של החיידק או בחלוקתו בצורה בלתי אחידה בצואה

חומרים ושיטות

מחקר זה הינו מקדמי ונערך במשק עם נגיעות גבוהה (מעל 10%) בכת שחפת (א'). הוא בחן את מתכונת הפרשת חיידקי MAP בצואה במספר מצומצם של פרות ועגלות/מבכירות, תוך בחינת השפעת הגיל ועקת ההמלטה. בנוסף נבדקו 2 פרות במשק אחר (ב').

חיות ודיגום

פרות: במשק א' נבדקו 16 פרות, כולן פרט לאחת חיוביות בבדיקות חלב לנוגדנים ל-MAP. כל אחת נדגמה 5-7 פעמים (למעט שתיים שנדגמו 4 פעמים) במהלך שבוע. אחת עשר פרות נדגמו לפני ההמלטה ואחריה, בהפרש של 2-3 חודשים. שתי פרות נוספות נדגמו במשק ב'.

עגלות/מבכירות: הנוגדנים ל-MAP מופיעים יחסית מאוחר במחלה, אחרי תחילת הפרשת הנוגדנים (תרשים 1). עקב זאת עגלות/מבכירות עלולות להפריש את החיידק ללא נוכחות נוגדנים ולכן קיים קושי לבחור המבכירות להכללה במעקב. נדגמו, לכן, 15 עגלות אחרי המלטה, ללא קשר למצבן האימונולוגי, ופעם נוספת 7-8 חודשים מאוחר יותר. דגימות הצואה נבדקו באמצעות ערכת qPCR לבת שחפת של חברת טטרקור (ארה"ב).

ממוצעי התוצאות לפני ואחרי המלטה לכל חיה שנבדקה פעמיים נבחנו בתבחין two tailed dependent paired ttest באתר

<https://statistics.laerd.com/calculators/dependent-t-test-paired-samples-calculator.php>

והמשמעות הסטטיסטית של ערך ה-t שהתקבל נבדק ב-

<http://www.danielsoper.com/statcalc3/calc.aspx?id=8>

הקורלציה בין ערכי רמות הנוגדנים בחלב מצד אחד ותוצאות מבחני ה-qPCR לפני ההמלטה, אחרי ההמלטה, שילוב שתי התקופות וההפרש בין ממוצעי שתי התקופות נבדקו באמצעות פונקציית Correl() של תוכנת Microsoft Excell.

תוצאות

פרות:

פרט לפרה אחת כולן היו חיוביות ב-ELISA לבת שחפת בחלב אך שליליות קלינית, ובכך מתאימות לקריטריונים המקובלים במעבדה לבדיקת הפרשה ב-qPCR. שלוש פרות (2, 3, 16) סווגו כחיוביות הן לפני והן אחרי ההמלטה. פרה אחת (8) הייתה חיובית לפני ההמלטה אך הפכה שלילית לאחריה, 3 חודשים מאוחר יותר. ארבע פרות (10, 11, 14, 15) סווגו כשליליות לפני ההמלטה ושלוש מהן נשארו כך גם לאחריה (14 לא נבדקה במועד זה). שלוש פרות (5, 6, 7) סווגו כחיוביות נמוך לפני ואחרי ההמלטה. פרות מס' 1, 4, 9, 12 נבדקו רק במועד אחד ונמצאו שליליות. ככלל נמצא שסיווג הפרות לפי הפרשת חידקי MAP כפי שעלה ממבחני ה-qPCR היא עקבית למרות שנצפו תוצאות חריגות בודדות בסדרות הדגימות במספר מקרים וייתכן שמדובר בהפרשה סבילה. התוצאות המפורטות לפרות מוצגות בטבלה מס' 1. הדגימות משתי הפרות שנבדקו ברפת ב' הראו אף הן עקביות ברמות הפרשת החיידקים.

עגלות/מבכירות

פרט ל-2 עגלות, כולן היו שליליות בבדיקת נוגדנים ל-MAP. כל העגלות היו שליליות ו/או חיוביות נמוך אחרי ההמלטה. תשעה חודשים לאחר מכן, כאשר נדגמו שוב, הפכה אחת מהן (מס' 3) חיובית גבוה והורחקה מהרפת. מבכירה זו הייתה אחת מהחיות החיוביות ב-ELISA, אך תופעה דומה לא נצפתה במבכירה השנייה (מס' 4). גם בקבוצת זו נצפו מספר תוצאות חריגות אך ככלל ההפרשה הייתה שלילית ו/או חיובית נמוך באופן עקבי. התוצאות המפורטות לעגלות/מבכירות מוצגות בטבלה מס' 2.

חזרות

בדיקות חוזרות של צואות נבחרות בוצע ב-6 דגימות מ-3 פרות: 7, 10 ו-14. נמצא כי שונות התוצאות היא מצומצמת ולכן אם יש תוצאות חריגות הן אינן נובעות מפיוזר בלתי אחיד בצואה אלא כתוצאה מהפרשת החיידק. התוצאות המפורטות לבדיקות אלה מוצגות בטבלה מס' 3.

סטטיסטיקה

ההבדלים בין תוצאות מבחן ה-qPCR לפני ואחרי ההמלטה נמצאו כחסרי משמעות מבחינה סטטיסטית ($p=0.1482$ לפרות ו- $p=0.3374$ לעגלות/מבכירות). התוצאות המפורטות מוצגות בטבלה מס' 4. מקדמי הקורלציה בין כיילי הנוגדנים לתוצאות ה-qPCR היו נמוכים מאד (בין 0.27-0.2). התוצאות המפורטות מוצגות בטבלה מס' 5.

דיון ומסקנות

המטרה המרכזית של מחקר זה הייתה לקבוע באיזו מידה מהווה בדיקה בודדת של qPCR התוויה לקבלת החלטות באשר לסיכון שמהווה הפרה הנבדקת לסביבתה ולחיות אחרות. היות וההחלטה צריכה להתקבל בזמן אמיתי, קיימת חשיבות לשונות ההפרשה בפרקי זמן קצרים בלבד וזה הנתון שנבדק. מתוצאות מחקר מקדמי זה עולה כי הפרשת חיידקי MAP היא עקבית במידה רבה. אמנם היו שינויים מזדמנים ברמות ההפרשה אך בהתחשב בעובדה שמדובר ברפת עם נגיעות גבוהה (מעל 10%) סביר להניח כי מדובר בהפרשה סבילה. ממצא זה הוא שונה מהמקובל בספרות (Olsen et al., 2002). ייתכן והדבר נובע מהעובדה שבמחקרים אשר הגיעו למסקנה כי הפרשת החידק איננו סדיר מבוססות על תרביות. רגישותה של שיטה זו נמוכה מה-qPCR במספר מאפיינים שיכולים להסביר את ההבדלים:

א. בתרביות נבדקת כמות קטנה יותר של צואה

ב. כהכנה לתרביות, הצואה עוברת טיפולים שמטרתם לצמצם את הזיהום, אך הם פוגעים גם ב-MAP.

יחד עם זאת חשוב להדגיש שבמחקר זה נבדקו מספר מצומצם של חיות וכי הוא שם לעצמו למטרה לבחון את ההפרשה בטווחי זמן קצרים. לא מן הנמנע כי בטווחי זמן ארוכים יותר (חודשים) אכן ההפרשה לא סדירה.

תוצאות הבדיקות החוזרות של הצואות הראו כי חלוקת החיידקים בצואה אחידה למדי (בהתחשב גם בהדירות הבדיקה) ולכן שונות התוצאות נובעת מזו של הפרשת החיידקים ולא של פיוזר בלתי אחיד בצואה.

מסקנה נוספת היא, שבניגוד למצופה, עקת ההמלטה לא השפיעה על הפרשת חיידקי MAP אפילו לא במבכירות בהם עקת ההמלטה אמורה להיות משמעותית יותר מאשר בפרות בוגרות.

לא נמצא קשר בין כויל הנוגדנים של החיות שנבדקו להפרשת החיידק בצואתם. יחד עם זאת עגלה אחת מתוך השתיים שבדמן נמצאו נוגדנים נגד MAP הפכה למפרישה מוקדמת (early shedder). יערך מעקב אחרי הפרשת החיידק ע"י המבכירה החיובית סרולוגית השנייה.

הגדרת הפרות על פי רמת הפרשת חיידקי ה-MAP כפי שעלה מתוצאות בדיקת ה-qPCR היו עד עתה שרירותיות במידה רבה. לאור התוצאות של מחקר זה נעשתה הגדרה חדשה, רציונאלית יותר, של קבוצות הפרות המפרישות את החיידק (כמפורט במקרא לטבלאות 1 ו-2). הושם דגש על זיהוי מפרישי העל אשר, כאמור בהקדמה, מהוות את הסיכון העיקרי לזיהום הסביבה ושל חיות אחרות. מצד שני, הוחלט כי פרות שמפרישות מספר נמוך של חיידקים הם בסבירות גבוהה מפרישות סבילות ולכן הן תדווחנה כשלילות. בעתיד ישולב מידע על רמת הנגיעות בעדר ממנו נשלחה הדגימה במתן משמעות לתוצאה.

לסיכום, תוצאות מחקר זה מצדיקות הרחבת הבדיקות למשקים נוספים ולפרקי זמן ארוכים יותר. כמוכן יש צורך לבדוק האם התוצאות הנמוכות מאד במחקר זה מקורם בסגוליות של הערכה או בצואות עצמן. לשם כך תבדקנה 10 דוגמאות צואה ממשק הידוע כשלילי לבת שחפת.

הבאות תודה

החוקרים מודים למר שמאי צור ולמר קורן שגיא מקיבוץ חפץ חיים על עזרתם בביצוע המחקר.

רשימת ספרות

- Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J Clin Microbiol.* 39:1517-21.
- Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev.* 7:328-45.
- Collins MT. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12:357-71.
- Fang Y, Wu WH, Pepper JL, Larsen JL, Marras SA, Nelson EA, Epperson WB, Christopher-Hennings J. 2002. Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples. *J Clin Microbiol.* 40:287-91.

- Gwózdź JM, Reichel MP, Murray A, Manktelow W, West DM, Thompson KG. 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 57:233-44.
- Kalis CH, Hesselink JW, Russchen EW, Barkema HW, Collins MT, Visser IJ. 1999. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. *J Vet Diagn Invest.* 11:345-51.
- Karcher EL, Beitz DC, Stabel JR. 2008. Parturition invokes changes in peripheral blood mononuclear cell populations in Holstein dairy cows naturally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 124:50-62.
- Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC. 1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res.* 36:255-7.
- Lei L, Plattner BL, Hostetter JM. 2008. Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. *Clin Vaccine Immunol.* 15:783-93.
- Olsen I, Sigurðardóttir G, Djønnø B. 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet Q.* 24:12-28.
- Pillars RB, Grooms DL, Wolf CA, Kaneene JB. 2009. Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented on six Michigan dairy farms. *Prev Vet Med.* 90:223-32.
- Pradhan AK, Mitchell RM, Kramer AJ, Zurakowski MJ, Fyock TL, Whitlock RH, Smith JM, Hovingh E, Van Kessel JA, Karns JS, Schukken YH. 2011. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a longitudinal study of three dairy herds. *J Clin Microbiol.* 49:893-901.

Sigurðardóttir G, Press CM, Evensen O. 2001. Uptake of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* through the distal small intestinal mucosa in goats: an ultrastructural study. *Vet Pathol.* 38:184-9.

Whitlock RH, Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 12:345-56.

Whitlock, RH, Sweeney, RW, Fyock, T., Smith J. 2005. MAP supershedders: another factor in the control of Johne's disease. p. 164. In: Manning EJB and S. S. Nielsen SS (ed.), *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, WI.

טבלה מס' 1: תוצאות בדיקות פרות לנוכחות ומספר חיידקי MAP בצואה ונוגדנים בחלב

רפת א'															
מס'	ELISA	סרולוגיה	שליש שלישי להריון						אחרי המלטה						
1	0.93	חיובית	פרה זו נבדקה לראשונה אחרי ההמלטה והוצאה מהרפת לפני הבדיקה השנייה						0.39	1.16	7.61	4.37	0.14		
2	0.49	חיובית	165.21	534.11	151.24	715.00	173.34		130.85	56.01	86.51	257.09	793.22		
3	1.18	חיובית	9431.19	9747.90	4176.75	6965.82	2733.37		0.76	1742.49	23391.85	167.14	6.61		
4	0.55	חיובית	7.47	4.40	37.97	27.80			פרה זו הוצאה מהרפת לפני הבדיקה השנייה						
5	0.92	חיובית	24.13	14.97	12.08	11.58	77.15	22.89	28.04	26.13	18.38	14.96	10.04		
6	0.40	חיובית	7.96	58.46	29.95	69.40	21.38	51.26	59.43	337.47	46.38	31.03	348.26	25.82	
7	0.40	חיובית	1.94	1.53	30.22	54.85	13.41	15.13	0.69*	239.81	76.22	52.80	50.86	84.63	
8	1.57	חיובית	3.04	213.55	0.92	1360.49	1546.96	207.40		0.03	3.18	4.90	5.43	2.76	
9	0.62	חיובית	פרה זו נבדקה לראשונה אחרי ההמלטה והוצאה מהרפת לפני הבדיקה השנייה						29.91	50.99	100.36	1.55	5.52		
10	0.10	שלילית	321.52	5.20	1.73	0.01*	1.53	0.04*	2.48	2.98	1.93	0.68*	2.00	90.21	
11	1.33	חיובית	2.99	8.61	10.61	7.53	42.66			2.71	7.47	5.97	0.06	0.13	
12	0.64	חיובית	פרה זו נבדקה לראשונה אחרי ההמלטה והוצאה מהרפת לפני הבדיקה השנייה						25.08	1.18	2.82	0.23	0.62	1.11	
13	1.12	חיובית	273.71	0.40	0.18	3.60	4.79			16.16	99.88	7.13	130.63	13.30	
14	0.47	חיובית	5.39	4.99	2.79*	4.94	4.21*			פרה זו הוצאה מהרפת לפני הבדיקה השנייה					
15	1.50	חיובית	3.24	2.73	29.69	7.86	0.34			1.63	0.95	7.83	12.70		
16	1.02	חיובית	1025.74	10042.3	2405.10	3885.55	1227.91			1580000	69.22	797.25	1493.02	827.61	1340.66

רפת ב'						
148618	36549	60992	147338	118332	39186	
0.92	1.96	0.21	2.41	3.71	2.93	3.18

מקרא	
שלילי	0-10
חיובי נמוך	10-100
חיובי	100-10000
חיובי גבוה	מעל 10000
לא נבדק	
ראה/י טבלה 3	*

טבלה מס' 2: תוצאות בדיקות עגלות/מבכירות לנוכחות ומספר חיידקי MAP בצואה ונוגדנים בדם

מס'	ELISA	סרולוגיה	אחרי המלטה					שליש שלישי להריון					
1		שלילית	7.11	34.86	1.95	2.15	2.00	4.70	4.41	7.50	7.56	4.18	
2		שלילית	1.10	1.48	4.41	0.09	1.53	187.12	65.35	20.18	3.09	6.10	
3	1.09	חיובית	39.35	3.35	18.43	28.99	1739.29	39461.14	30402.11	28933.78	34780.57	14401.21	
4	1.16	חיובית	0.10	3.61	65.65	0.47	1.50	2.38	1.64	14.86	105.52	1.80	
5		שלילית	1.62	0.14	0.10	16.52	1.92	1.27	5.51	10.91	7.67	2.42	
6		שלילית	0.35	0.01	0.00	0.01	1.27	17.32	5.24	8.34	3.46	33.69	
7		שלילית	2.84	0.01	0.62	607.64	18.76	4.78	31.56	12.15	7.23	3.69	
8		שלילית	32.39	3.17	0.82	2.34	0.29	0.87	1.24	16.07	6.34	5.92	
9		שלילית	11.30	1.47	2.01	6.08	10.91	0.33	20.03	1.94	2.31	0.51	
10		שלילית	0.50	0.01	0.00	0.88	510.25	19.33	9.46	1.63	25.65	6.08	
11		שלילית	0.07	0.54	0.04	0.93	1.67	16.74	3.07	86.50	1.32		
12		שלילית	6.14	4.60	2.74	3.71	3.97	9.09	32.60	13.83	11.04	14.02	15.76
13		שלילית	20.82	41.63	73.91	89.12	1.89	19.74	2.70	4.01	3.16	38.41	
14		שלילית	5.11	3.70	2.86	1.97	0.45	7.57	14.41	10.50	11.42	24.31	
15		שלילית	5.65	4.66	7.90	14.77	1.39	2.71	0.00	2.04	0.00	5.28	

מקרא

שלילי	0-10
חיובי נמוך	10-100
חיובי	100-10000
חיובי גבוה	מעל 10000
לא נבדק	

טבלה 3: חזרות לבדיקת הזירות הבדיקה

מס' פרה	7	10	10	10	14	14
תוצאה מקורית	0.69	0.01	0.04	0.68	2.79	4.21
חזרות	2.32	2.23	34.49	1.64	4.94	3.51
	2.10	1.48	3.30	3.79	2.37	4.58
	4.23	1.40	9.29	2.48	3.02	0.17
	3.62	1.49	1.56	2.66	2.05	64.90
	2.67	0.28	4.58	5.08	0.36	2.36
	1.53					

מקרא

שילי	0-10
חיובי נמוך	10-100

טבלה 4: ניתוח סטטיסטי של התוצאות לפני ואחרי ההמלטה (לא כולל חיות שנדגמו במועד אחד בלבד)

מס' פרה	ממוצע לפני המלטה	ממוצע אחרי המלטה	מס' עגלה/מבכירה	ממוצע לפני המלטה	ממוצע אחרי המלטה
2	306.26	264.74	1	5.67	9.61
3	5836.39	5061.77	2	56.37	1.72
4	15.70	4.95	3	29595.76	365.88
5	22.32	17.38	4	25.24	14.27
6	116.67	190.79	5	5.56	4.06
7	58.84	100.86	6	13.61	0.33
8	279.33	3.26	7	11.88	125.97
10	33.53	19.56	8	6.09	7.80
11	8.87	3.27	9	5.02	6.35
13	54.98	53.42	10	12.43	102.33
15	7.28	5.78	11	26.91	0.65
16	2311.47	905.55	12	16.06	4.23
			13	13.60	45.47
			14	13.64	2.82
			15	2.01	6.87
					p=0.3374
					p=0.1482

טבלה 5: קשר בין ערכי מבחן ה-ELISA (כייל נוגדנים) בפרות לממוצעי תוצאות מבחן ה-qPCR והפרש בין הדגימה לפני ואחרי ההמלטה

מס'	ELISA	ממוצע לפני המלטה	ממוצע אחרי המלטה	ממוצע כללי	הפרש בין הממוצעים
1	0.93	2.73		2.73	
2	0.49	264.74	347.78	306.26	83.04
3	1.18	5061.77	6611.01	5836.39	1549.24
4	0.55	4.95	15.70	10.33	10.75
5	0.92	17.38	27.26	22.32	9.89
6	0.40	190.79	42.55	116.67	-148.24
7	0.40	100.86	16.82	58.84	-84.04
8	1.57	3.26	555.39	279.33	552.13
9	0.62	37.67		37.67	
10	0.10	19.56	47.50	33.53	27.94
11	1.33	3.27	14.48	8.87	11.21
12	0.64	5.17		5.17	
13	1.12	53.42	56.54	54.98	3.12
14	0.47		4.46	4.46	
15	1.50	5.78	8.77	7.28	2.99
16	1.02	905.55	3717.38	2311.47	2811.83
R		0.27	0.20	0.26	0.27

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרות המחקר היו קביעת מתכונת דיגום צואות מפרות חשודות כנגועות בבת שחפת אשר תמטב את סיכויי זיהוי פרות מפרישות MAP, השפעת עקת המלטה על ההפרשה ובדיקת הקשר בין רמת נוגדנים לערכי בדיקת ה-qPCR
עיקרי התוצאות.
תוצאות המחקר הראו כי הפרשת החיידקים היא עקבית, למרות ששינויים חד פעמיים ברמת ההפרשה אפשריים. כמו-כן לא נמצאה השפעה של עקת המלטה על רמת ההפרשה ולא נמצא קשר בין רמת הנוגדנים בחלב/דם לבין רמות ההפרשה בצואה.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
המסקנה המרכזית של המחקר היא שדגימה אחת יכולה לספק מידע אמינה באשר למצב פרה. ממצא זה מאפשר הערכה של משמעות תוצאת ה-qPCR להפרשת חיידקי MAP בצואה באשר לסיכון שמהווה החיה הנבדקת לסביבתה.
מטרות המחקר הושגו במלואם.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר השאלה המרכזית שדורשת ליבון היא באיזו מידה מייצגים ממצאי המחקר, שנערך ברובו ברפת אחת במספר מצומצם של בעלי חיים, את התמונה הרחבה יותר. כמוכן תבדקנה 10 דוגמאות צואה ממשק הידוע כשליילי לבת שחפת לליבון השאלה האם התוצאות הנמוכות מאד במחקר זה מקורם בסגוליות של הערכה או בצואות עצמן.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
< ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
ללא פרסום - יש לעדכן את מידע המחקר
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים