

1 זחלי עש הדונג גלריה מלונלה כמודל לחקר חיידקי אשריכיה קולי

2 מחוללי דלקות עטין

3

4 *Galleria mellonella* as a model for the study of

5 mammary pathogenic *Escherichia coli*

6

7 שם התלמיד: עודד ארדרונאי, Oded Ardrnai ([oded.ardronai@mail.huji.ac.il](mailto:oded.ardronai@mail.huji.ac.il))

8 שנה"ל בה צפוי/ה התלמיד/ה לסיים את הלימודים לתואר DVM: 2016

9

10 כמילוי חלקי של הדרישות לקבלת תואר דוקטור לרפואה וטרינרית מטעם ביה"ס לרפואה

11 וטרינרית ע"ש קורט של האוניברסיטה העברית בירושלים.

12

13 בהדרכת: פרופ' נחום שפיגל ([shpigein@agri.huji.ac.il](mailto:shpigein@agri.huji.ac.il)) \_\_\_\_\_

14

15 מקום ביצוע העבודה: ביה"ס לרפואה וטרינרית, הפקולטה לחקלאות, רחובות.

16

17 מאשר/לא מאשר פרסום תקציר העבודה בעברית בעיתון רפואה וטרינרית.

18 חתימת המדריך: \_\_\_\_\_

19

20 שמות של סוקרים/שופטים פוטנציאליים עליהם ממליץ המנחה: ד"ר דניאל ברקן

21 ([daniel.barkan@mail.huji.ac.il](mailto:daniel.barkan@mail.huji.ac.il)), ד"ר ישראל ניסן ([israel.nissan@gmail.com](mailto:israel.nissan@gmail.com)),

22 פרופ' יובל גוטליב ([yuvalgd@yahoo.com](mailto:yuvalgd@yahoo.com)).

23

24 תאריך: 05/06/2016

|   |    |
|---|----|
| <b>תקציר:</b>   | 25 |
| דלקת עטין חיידקית הנובעת מחיידקי א. קולי' הינה אחד מהגורמים להפסדים הגדולים ביותר       | 26 |
| במשק החלב ברחבי העולם. למרות שנעשו מחקרים רבים על א. קולי' מחוללי דלקת עטין             | 27 |
| עדיין לא זוהו גורמי אלימות ספציפיים המובילים לדלקת עטין.                                | 28 |
| במעבדתו של פרופ' נחום שפיגל נבחנו 2 זני חיידקי א. קולי' מחוללי דלקת עטין בעזרת מודל     | 29 |
| ניסויי של עכברות מניקות:  | 30 |
| <i>E. coli</i> P4-NR (P4-NR) הגורם לדלקת עטין מפושטת לעומת <i>E. coli</i> P4-96 (P4-96) | 31 |
| הגורם לדלקת עטין קלה ומקומית יותר.  | 32 |
| בריצוף הגנום של חיידקים אלו התגלה ש-P4-NR מכיל מערכת הפרשה מטיפוס 6. מערכת              | 33 |
| זו מאפשרת הזרקה של חלבונים לתאים שכנים, גם תאים של המאחסן וגם לחיידקים שכנים.           | 34 |
| ההערכה היא שלמערכת זו משמעות רבה מבחינת אלימות החיידק ואכן מוטנט של P4-NR               | 35 |
| ( $\Delta$ PAI1) אשר אינו מכיל מערכת הפרשה זו הראה אלימות מופחתת בבלוטות החלב של        | 36 |
| העכברה.   | 37 |
| המטרה של מחקר זה הייתה לבחון האם זחל עש הדונג יכול לשמש כחיית מודל לחקר                 | 38 |
| חיידקי א. קולי' מחוללי דלקות עטין.  | 39 |
| זחל עש הדונג, גלריה מלונלה הינו אחד מהמודלים המוצלחים שהתפתח בשנים האחרונות             | 40 |
| בכדי לבחון פתוגניים של יונקים. זאת כמובן בשילוב עם יכולות הריצוף הגנטי המאפשרות         | 41 |
| מציאת מוקדים בגנום היכולים לשמש כאי אלימות.   | 42 |
| הסיבות להפיכתו של זחל עש הדונג לחיית מודל מוצלחת נובעות מכך שהמערכת החיסונית            | 43 |
| שלהם דומה ומקבילה בתחומים רבים למערכת החיסון המולדת ביונקים. התאים ההמוציטים            | 44 |
| בזחל מבצעים פאגוציטוזה, אנקפסולציה, קרישה, אגרגטים ואף מייצרים חומרים אנטי              | 45 |
| בקטריאליים בדומה לניוטרופילים ביונק.  | 46 |
| לעש הדונג יש מספר יתרונות כמודל: הוא זול, קל לגידול ופותר לנו בעיות אתיות רבות.         | 47 |
| בנוסף לכך המודל נוח לעבודה, הזחל בגודל של כ- 2 ס"מ וניתן לגדלו בטמפ' של $37^{\circ}$ C  | 48 |
| המייצגת את טמפ' היונק.  | 49 |

|    |  |
|----|--|
| 50 | במחקר הנוכחי בחנו האם זחל עש הדונג יכול לשמש כחיית מודל לחיידקי ה- א. קולי                     |
| 51 | הנבחנים במעבדתנו ובנוסף לכך ערכנו השוואה בין הזנים השונים.                                     |
| 52 | הדבקת הזחלים בוצעה ע"י הזרקת החיידקים ישירות לחלל המוצל. לאחר ההדבקה בוצעה                     |
| 53 | תצפית שבחנה תמותה, מלניזציה והתגלמות. שגשוג החיידק בזחל נבחן אף הוא ע"י כתישה                  |
| 54 | וזריעה של זחלים שהודבקו בזמנים שונים, וע"י שימוש במכשיר ה-IVIS ובחיידקים המכילים               |
| 55 | פלסמיד לומיניסנטי.   |
| 56 | תוצאות הניסוי הראו כי P4-NR הנו אלים לזחלי עש הדונג. הוא מוביל לתמותה, מלניזציה                |
| 57 | וירידה ביצור הקורים שלהם לעומת P4-96 אשר אינו מראה אלימות כלל מלבד פגיעה קלה                   |
| 58 | בהתגלמות הזחלים כאשר מזריקים אותו במינונים גבוהים. בנוסף לכך P4-NR הראה יכולת                  |
| 59 | שגשוג והתרבות בתוך זחלי עש הדונג בעוד P4-96 לא הצליח לשגשג כלל.                                |
| 60 | בניסיון להשוות בין P4-NR למוטנטים שלו $\Delta PAI1$ ו- $\Delta PAI2$ , לא נראתה מגמה ברורה ולא |
| 61 | נראו הבדלים מובהקים ועקביים בין זנים אלה בין כלל הניסויים, זאת בשונה מהתוצאות                  |
| 62 | במודל העכבר בו P4-NR הראה אלימות מקומית גבוהה יותר משל $\Delta PAI1$ . יתכן ותוצאות            |
| 63 | הניסוי אינן עקביות ומובהקות עקב מדגם קטן מידי במבחן ההשוואה בין P4-NR למוטנטים.                |
| 64 | כמו כן, יתכן ומערכת הפרשה מסוג 6 אותה נושא P4-NR מגבירה את האלימות המקומית                     |
| 65 | כפי שהודגם במודל העכבר אך אינה מגבירה את האלימות הסיסטמית כפי שנבחן במודל                      |
| 66 | הזחל.  |
| 67 |  |
| 68 |  |
| 69 |  |
| 70 |  |
| 71 |  |
| 72 |  |
| 73 |  |
| 74 |  |

|  |    |
|--|----|
| <b><u>Abstract</u></b>   | 75 |
| Mammary pathogenic <i>Escherichia coli</i> (MPEC) is a major cause of infection            | 76 |
| and inflammation (mastitis) in dairy animals, which leads to numerous                      | 77 |
| economic losses. Despite many years of research, The Pathogenicity of                      | 78 |
| MPEC is still poorly understood and no specific virulence factors or                       | 79 |
| pathotypes of the bacteria have been reported.   | 80 |
| Genetic analysis of two closely related MPEC strains (P4-NR and P4-96) in                  | 81 |
| our lab, revealed that MPEC strain P4-NR contains 3 pathogenicity islands                  | 82 |
| (PAIs). PAI1 consist a full type VI secretion system (T6SS), a newly                       | 83 |
| discovered bacteriophage-like injection machine that allows secretion and                  | 84 |
| injection of effector proteins into neighboring prokaryotic and eukaryotic cells.          | 85 |
| Challenge studies in lactating mice using P4-NR mutant strains Which lacks                 | 86 |
| T6SS, led to a more localized disease with reduced damage to milk                          | 87 |
| production compared to the wild type strain.   | 88 |
| The goal of this research was to examine whether the greater wax moth,                     | 89 |
| <i>Galleria mellonella</i> can be use as an alternative model for the study of MPEC        | 90 |
| pathogenicity.   | 91 |
| <i>Galleria mellonella</i> is one of the most successful developed models for the          | 92 |
| study of microbial infections in recent years. It is due to the remarkable                 | 93 |
| similarities between their innate immune response to that of vertebrates.                  | 94 |
| Furthermore, they are cheap, easy to maintain, do not require ethical                      | 95 |
| approval, and survive at 37 <sup>0</sup> C, which allows the investigation of temperature- | 96 |
| dependent microbial virulence factors.   | 97 |
| In the present study I have examined the MPEC strains described above by                   | 98 |
| using challenge studies. I have examined mortality rate, melanization and                  | 99 |

cocoon formation. I also examined the bacterial proliferative capacity by 100  
plating larval extracts on agar plates and by using bioluminescent 101  
microorganisms to detect the pathogen load by biophotonic imaging. 102  
The study results showed that the MPEC strain P4-NR is very virulent to the 103  
wax moth larvae, it leads to death, melanization and a decrease in cocoon 104  
formation In contrast to the P4-96 strain which hardly showed any virulence 105  
despite a small decrease in cocoon formation when injected in high doses. 106  
No significant different was observed between the P4-NR strain and its 107  
mutants in contrast to results in the lactating mice model. It might be due to a 108  
small study samples tests. But it is possible that the T6SS increases the local 109  
virulence, as shown in the mouse model, but doesn't increase the systemic 110  
virulence as shown in the larvae model. 111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

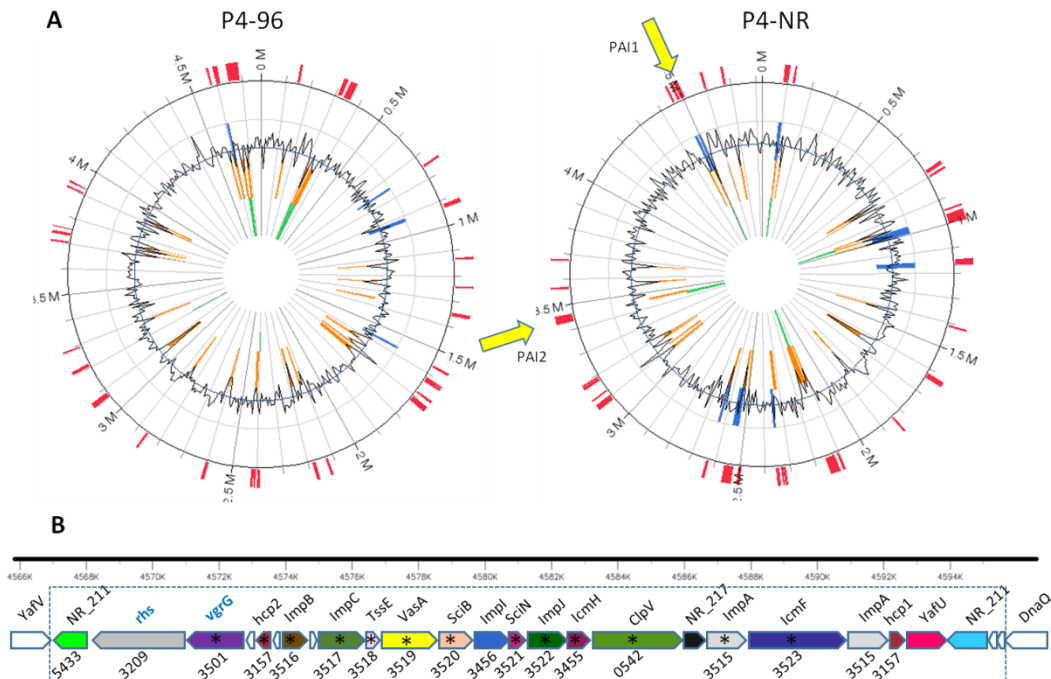
|         |   |     |
|---------|---|-----|
|         | <b><u>תוכן עניינים:</u></b>                             | 125 |
| 2.....  | <b>תקציר</b>  | 126 |
| 7.....  | <b>מבוא</b>   | 127 |
| 12..... | <b>מטרות ובעיות המחקר</b>                               | 128 |
| 13..... | <b>שיטות וחומרים</b>                                    | 129 |
| 13..... | חיידקים (זנים, גידול וספירה)                            | 130 |
| 15..... | זחלי עש הדונג (הכנת מזון, גידול, בחירה)                 | 131 |
| 17..... | שיטת הזרקה  | 132 |
| 19..... | שיטות סטטיסטיות   | 133 |
| 19..... | <b>תוצאות</b>   | 134 |
| 19..... | מבחני אלימות P4-NR לעומת P4-96                          | 135 |
| 23..... | מבחני אלימות P4-NR לעומת $\Delta$ PAI1 ו- $\Delta$ PAI2 | 136 |
| 25..... | בחינת שגשוג החיידקים ע"י שימוש בביופוטניקה              | 137 |
| 27..... | <b>דיון ומסקנות</b>                                     | 138 |
| 29..... | <b>תודות</b>  | 139 |
| 29..... | <b>ביבליוגרפיה</b>                                      | 140 |
|         |   | 141 |
|         |   | 142 |
|         |   | 143 |
|         |   | 144 |
|         |   | 145 |
|         |   | 146 |
|         |   | 147 |
|         |   | 148 |
|         |   | 149 |

|  |  |     |
|--|--|-----|
|  | <b>מבוא</b>  | 150 |
|  | דלקת עטין חיידקית הינה מחלה נפוצה בנשים מניקות ובחיות משק המייצרות חלב (1).          | 151 |
|  | במשקי החלב החקלאיים המחלה מובילה להפסדים כלכליים של ביליוני דולרים ברחבי             | 152 |
|  | העולם הנגרמים עקב ירידה בתנובה ובאיכות החלב ועקב עלויות הטיפול ויציאת הפרות          | 153 |
|  | מהעדר (2; 3; 1; 4)   | 154 |
|  | א. קולי ידוע כאחד מהגורמים העיקריים לדלקות עטין אקוטיות בפרות חלב בכל העולם (2; 3;   | 155 |
|  | 1; 5). בנוסף לכך דלקות עטין הנגרמות מ- א.קולי, הינן הגורם להפסד הכלכלי הגבוה ביותר   | 156 |
|  | כאשר מתייחסים למדד בודד (4).   | 157 |
|  | א. קולי הנו חלק מהפלורה הטבעית המאכלסת את מערכת העיכול ביונקים ויש לציין             | 158 |
|  | שמרבית זני ה- א. קולי כלל לא פתוגנים. בנוסף לכך ישנה שונות רבה בין הזנים השונים,     | 159 |
|  | בריצוף של כ- 10 זני א. קולי בעלי כ- 4000-5000 גנים הייתה חזרה גנומית רק בכ- 3000     | 160 |
|  | גנים (1; 6).   | 161 |
|  | את חיידקי ה- א. קולי הפתוגנים ניתן לחלק לשתי קבוצות עיקריות; (1) א. קולי הגורם       | 162 |
|  | לתחלואה במעי- Intestinal pathogenic <i>E. coli</i> (IPEC), (2) א. קולי הגורם לתחלואה | 163 |
|  | מחוץ למעי- Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (ExPEC). לקבוצת ה- ExPEC        | 164 |
|  | משתייכים מספר פתוטייפים כגון; א. קולי הגורם לדלקת במערכת השתן, זני קולי פתוגנים      | 165 |
|  | לעופות וזנים הגורמים לדלקת קרומי המח באדם. (7; 8; 1)                                 | 166 |
|  | ניתן לסווג את זני הקולי מחוללי דלקת עטין כזן ExPEC ואף הוצע לסווגו כפוטוטייפ חדש     | 167 |
|  | Mammary Pathogenic <i>E. coli</i> (MPEC) (1; 6).                                     | 168 |
|  | ל- MPEC זה יש כנראה יכולת יחודית להתיישב בנישות בלוטת החלב השונות הכוללות את         | 169 |
|  | שכבת האפיתל המרפדת את תעלת חלל הפטמה, בריכת החלב, בריכת הבלוטה, צינורות              | 170 |
|  | החלב ואפיתל מתמחה בנאדיות החלב (1).  | 171 |
|  | יש לציין שלמרות שנעשו מחקרים אפידמיולוגים רבים על MPEC, עדיין לא נמצאו גורמי         | 172 |
|  | אלימות ייחודיים לזני א. קולי מחוללי דלקת עטין (9). הסיבה לכך נובעת משום שזנים אלה    | 173 |
|  | מציגים גורמי אלימות מגוונים המובילים לדלקת עטין, ועד כה לא הוגדרו גורמים חיוניים אשר | 174 |

|   |     |
|---|-----|
| בלעדיהם א. קולי אינו מסוגל לגרום דלקת עטין. מצב זה נראה גם ב- ExPEC אחרים. לכן                  | 175 |
| הייתה הערכה כי אלימות החיידק מבוססת על מרכיבים חיידקים המכונים BAMPs -                          | 176 |
| bacterial associated molecular patterns כגון: ליפופוליסכריד, חומצות גרעין, פלגלה                | 177 |
| ועוד. כיום ידוע שישנו קשר ישיר בין זני MPEC שונים למופע של המחלה, וכנראה שישנו                  | 178 |
| קשר בין גורמי האלימות אשר החיידק מבטא למופע הקליני של המחלה. בעוד זנים מסוימים                  | 179 |
| מובילים לדלקת קלה החולפת מעצמה, ישנם זנים המובילים לדלקת קשה, אלח דם ואף מוות                   | 180 |
| (1). לאיתור גורמי האלימות הנ"ל יש השלכות אפידמיולוגיות נרחבות, השלכות שיכולות                   | 181 |
| להיות קשורות בפיתוח שיטות טיפול ומניעה חדשות. כמו כן הנטיה הגוברת להמנע משימוש                  | 182 |
| בחומרי אנטיביוטיים בחיות המשק מעלה את חשיבות המחקר בתחום זה.                                    | 183 |
| במעבדתו של פרופ' שפיגל נחקרים שני זני MPEC דומים אך שונים;                                      | 184 |
| <i>E. coli</i> P4-NR (P4-NR) ו- <i>E. coli</i> P4-96 (P4-96) תת זן שלו אשר התגלה במעבדה-        | 185 |
| P4-NR מגלה עמידות לסרום בקר, מגיע לריכוז גבוה יותר מ-P4-96 בעקומת גידול ויוצר                   | 186 |
| מושבות עגולות, חלקות ומוגדרות לעומת P4-96 היוצר מושבות גדולות, לא סדירות                        | 187 |
| ומחוספסות (10). בניסוי הוקעה בעכברות מניקות P4-NR גורם לדלקת עטין מפושטת לעומת                  | 188 |
| P4-96 הגורם לדלקת עטין קלה ומקומית יותר (תוצאות שטרם פורסמו).                                   | 189 |
| בריצוף גנטי של זנים אלו, התגלה שהזן P4-NR מכיל שלושה איי אלימות (PAIs) אשר                      | 190 |
| חסרים בזן P4-96 (כפי שמתואר באיור 1A). אי האלימות הראשון (PAI1), מכיל מערכת                     | 191 |
| הפרשה מלאה מטיפוס 6 (T6SS) המתוארת באיור 1B (תוצאות שטרם פורסמו).                               | 192 |
| בכדי לבחון את משמעות איי אלימות אלו יצרנו במעבדה 2 מוטנטים של P4-NR:                            | 193 |
| $\Delta$ PAI1 ( <i>E. coli</i> P4-NR $\Delta$ PAI1) – מוטנט שחסר את PAI1 (כפי שמתואר באיור 1B). | 194 |
| $\Delta$ PAI2 ( <i>E. coli</i> P4-NR $\Delta$ PAI2) – מוטנט שחסר את PAI2.                       | 195 |
| בניסוי הוקעה בעכברות $\Delta$ PAI1 היה אלים פחות מ-P4-NR, הוא גרם למחלה מקומית                  | 196 |
| בלבד ופגע פחות ביצור החלב לעומת זן P4-NR. מכאן הסקנו כי למערכת הפרשה מטיפוס                     | 197 |
| 6 ישנה חשיבות מבחינת אלימות החיידק והיא מובילה לאלימות מקומית מוגברת המתבטאת                    | 198 |
| בשגשוג ובהתפשטות נרחבים יותר בתוך רקמת העטין (תוצאות שטרם פורסמו).                              | 199 |



- 200 מערכת הפרשה מטיפוס 6 התגלתה לאחרונה והיא נפוצה בקרב חיידקים גרם שליליים. זוהי
- 201 מערכת הזרקה דמוית בקטריופאג' המאפשרת הפרשה והחדרה של חלבונים לתאים
- 202 פרוקריוטים ואוקריוטים שכנים (11). כמו כן מערכת הפרשה זו נמצאה באופן עקבי
- 203 בזני MPEC רבים לעומת זני א. קולי קומנסלים (6).



**איור 1:** תוצאות מבחנים ביואינפורמטיים המציגים איי אלימות (PAIs). תיאור סכמטי המציג הבדלים באיי אלימות בין P4-NR ו-P4-96 (יוצר בעזרת IslandViewer (web tool). החצים הצהובים מסמנים את מיקום PAI1 ו-PAI2 אשר חסרים בזן P4-96 (A). הצגה של הלוקוס המלא של TS66, הגנים rhs ו-vgrG (בכחול) חסרים בזן P4-96. המסגרת המקוקוות מסמנת את כל הגנים שהוסרו במוטנט ΔPAI1 (B).

- 204
- 205 בכדי להמשיך לבחון את האלימות של חיידקי ה- MPEC בכלל והזנים המדוברים הנ"ל
- 206 בפרט, הוחלט לבחון את זחל עש הדונג, גלריה מלונלה כמודל לחיידקי א. קולי מחוללי דלקת
- 207 עטין.
- 208 זחל עש הדונג החל לשמש בשנים האחרונות כחיית מודל מצוינת לבחינת פתוגניים אנושיים
- 209 כגון סטרפטוקוקוס פיוגנס, ירשיניה פסאודוטובקולוזיס (12), ExPEC (13), ואף פתוגניים
- 210 פטרייתים כגון אספרגילוס פומיגטוס (14; 15). כ- 1000 מאמרים פורסמו בנוגע אליו ב-
- 211 Pubmed כאשר מעל 200 מהם היו בין השנים 2014-2015 (16). לעש הדונג יש מספר

|     |  |
|-----|--|
| 212 | יתרונות לשמש כחיית מודל: הוא זול, קל לגידול ומספק פתרון לבעיות אתיות רבות. בנוסף         |
| 213 | לכך המודל נוח לעבודה. הזחל גדול למדי (גודל של כ- 2 ס"מ), ניתן להזריק לו כמויות           |
| 214 | גבוהות ומדודות של חיידקים ואף לקבוע LD <sub>50</sub> . כמו כן ניתן להחזיק את הזחל במשך 3 |
| 215 | שבועות עד אשר הוא מתגלם (17; 18; 19). נתון חשוב נוסף הוא שאת לרוות עש הדונג ניתן         |
| 216 | לגדל בטמפ' של 37°C המייצגת את טמפ' גוף היונק וזאת בשונה ממודלי חרקים אחרים               |
| 217 | (כגון זבוב הדרוזופילה). לטמפ' הגידול ישנה משמעות רבה כאשר רוצים לבחון את אלימות          |
| 218 | ואת תפקוד החיידק הן מבחינת הפעילות האנזימתית של הפתוגן בגוף החי (17) והן מבחינת          |
| 219 | פעילות המערכת החיסונית בחרק (20).  |
| 220 | יש לציין שעש הדונג שימש כמודל לבחינת דרכי טיפול באנטיביוטיקות שונות (21) ואף שימש        |
| 221 | לבחון דרכי טיפול בוירוסים כנגד חיידקים למרות שטיפול זה מבוצע כיום רק ברוסיה              |
| 222 | וגיאורגיה (16).  |
| 223 | במודל עש הדונג נעשה שימוש בשיטות מגוונות לבחינת אלימות הפתוגן ודרכי החדרתו.              |
| 224 | ברוב המחקרים הדרך העיקרית להחדרת הפתוגן היתה בהזרקה ישירה להמולימפה. ניתן                |
| 225 | להחדיר את הפתוגן גם בדרכים נוספות, למשל ע"י גורם שניוני כגון נמטודה, ע"י טפטוף           |
| 226 | הפתוגן באזור בו פוצעים את הקוטיקולה, ואף ניתן להחדיר את הפתוגן דרך מערכת העיכול          |
| 227 | ע"י מזון (22; 19; 16). בכדי לבחון את אלימות הפתוגן ניתן לבדוק מספר פרמטרים, אשר רובם     |
| 228 | מבוצעים ע"י תצפית ישירה, כגון: אחוז תמותה, רמות מלניזציה, תנועתיות, טוויט קורים          |
| 229 | והתגלמות. בנוסף לכך ניתן לבדוק עליה של רמות לקטאט דהידרוגנאז בהמולימפה אשר               |
| 230 | מעידות על הרס תאים, ואף ניתן לבחון את יכולת השגשוג של החיידק בזחל. בדיקה זו יכולה        |
| 231 | להתבצע ע"י זריעה ישירה של המולימפת הזחל על צלחות אגר או בביופוטוניקה, ע"י שימוש          |
| 232 | במיקרואורגניזמים ביו-לומיניסנטיים (16).  |
| 233 | הסיבה ליכולתו של עש הדונג לשמש כחיית מודל נעוצה בכך שמערכת החיסון שמורה                  |
| 234 | בממלכת החיות. אומנם לחרקים אין מערכת חיסון נרכשת אך מערכת החיסון שלהם                    |
| 235 | מקבילה בתחומים רבים למערכת החיסון המולדת ביונקים (23; 24; 25), והיא כוללת מחסומים        |
| 236 | פיזקליים ותגובות מקומיות וסיסטמיות כנגד פתוגנים (25). הקוטיקולה מהווה את המחסום          |

|   |     |
|---|-----|
| הראשון לסביבה החיצונית והיא אנלוגית לאפידרמיס ביונקים. מערכת העיכול מכילה         | 237 |
| peritropic matrix, שהיא מעין רשת כיטין המונעת מגע ישיר של פתוגנים ומזון עם המעי.  | 238 |
| מערכת הדם בחרקים הינה פתוחה וחלל גוף החרק, ההמוצל, מכיל בעיקר המולימפה            | 239 |
| (אנלוגי לדם ביונק). בהמוצל ישנם גופיפי שומן אנלוגיים לכבד המתפקדים כמאגר שומן וגם | 240 |
| אחראים על ייצור המוציטים ופקטורים נוספים של מערכת החיסון (22;25). בדומה ליונקים   | 241 |
| מערכת ההגנה התאית וההמוראלית של מערכת החיסון קשורות זו לזו. המערכת התאית          | 242 |
| מורכבת מהמוציטים המבצעים פאגוציטוזה, אנקפסולציה, קרישה, אגרגטים ואף מייצרים       | 243 |
| חומרים אנטי בקטריאליים כגון סופר אוקסיד בדומה למקרופאגים וניוטרופילים (19;26).    | 244 |
| המערכת ההמוראלית, מכילה מולקולות הגנה מסיסות כגון חלבונים אנטימיקרוביאליים        | 245 |
| (AMPs), חלבונים דמויי משלים, מלנין, ותוצרים של קסקדות פרוטאוליטיות (למשל          | 246 |
| פנולאוקסידאז) אשר מובילים לשיתוק או הרג של הפתוגן (26).                           | 247 |
| יש לציין שישנם כשמונה סוגים של המוציטים ולא כל החרקים מכילים את כולם. בנוסף לכך   | 248 |
| יש הבדל בין סוגי ההמוציטים העיקריים הפעילים בין החרקים השונים בתגובה לפתוגן. בעש  | 249 |
| הדונג התאים הפלסמטוציטים והגרנולריים הם המעורבים העיקריים בהגנה החיסונית          | 250 |
| התאית. תאים אלו הם הדומים ביותר בתפקודם ובדרך פעולתם לניוטרופילים, וזה מהווה      | 251 |
| יתרון נוסף שיש לעש הדונג על חרקים אחרים בבחינת פתוגנים של יונקים. כשמשווים בין    | 252 |
| המוציטים לניוטרופילים (איור 2), ניתן לראות כי שניהם תלויים באופסניזציה של         | 253 |
| המיקרואורגניזמים ע"י חלבוני משלים בכדי לבצע פאגוציטוזה, שניהם תוקפים פתוגנים ע"י  | 254 |
| שפעול פרץ חמצוני אשר המרכיבים העיקריים שלו הם חומרים מחמצנים כגון $H_2O_2$ ,      | 255 |
| רדיקאליים חופשיים והיפוכלורית, בנוסף לכך שניהם רגישים לאותם מעכבים (26) ושניהם    | 256 |
| מייצרים רשתות חוץ תאיות המכילות חומצות גרעין וחלבונים המשתקות והורגות את הפתוגן   | 257 |
| (27). כל אלה הופכים את זחל עש הדונג לחיית מודל יעילה, טובה ונוחה לחקר פתוגניים של | 258 |
| האדם בפרט ויונקים בכלל.   | 259 |
|   | 260 |
|   | 261 |

|                                     | Hemocytes                                       | Neutrophils                          |
|-------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Phagocytosis                        | Lectin-mediated                                 | Lectin-mediated                      |
| ROS                                 | $O_2^-$ , $H_2O_2$ , $NO^-$                     | $O_2^-$ , $H_2O_2$ , $NO^-$          |
| Degranulation                       | Yes   | Yes                                  |
| AMPs                                | Peroxynelectin, transferrin, lysozyme, defensin | MPO, transferrin, lysozyme, defensin |
| Receptors                           | TLRs, B-1,3-glucan, IL-IR                       | TLRs, B-1,3-glucan, IL-IR            |
| Transcription factors               | NFκB, IκB                                       | NFκB, IκB                            |
| Cascades                            | IMD, JNK, JAK-STAT                              | IMD, JNK, JAK-STAT                   |
| Kinases                             | p38 MAPK, ERK, PKC, PKA                         | p38 MAPK, ERK, PKC, PKA              |
| Neutrophil extracellular nets (NET) | NET-like structures present                     | NETs present                         |

איור 2: דמיון בין המוציטים לניוטרופילים באדם (Niall Browne, 2013)

263

264

265 בעיית המחקר ומטרות העבודה:

266 המחקר ב-MPEC הינו רב, אך עד היום לא נמצא גורמי אלימות יחודיים לחיידקי א. קולי

267 מחוללי דלקות עטין.

268 מטרת העל של המחקר הינה לפתח את מודל עש הדונג לחקר מנגנוני האלימות של חיידקי

269 א. קולי מחוללי דלקת עטין. במידה ומודל זה ימצא כמתאים, עשוי הדבר לסייע רבות למחקר

270 בתחום זה ולהקטין את השימוש בחיות אחרות כגון פרות, כבשים, עזים ועכברים.

271 המטרות שלי בעבודה היו:

272 • הקמת מושבה של זחלי עש הדונג.

273 • העמדת מערכי ניסוי שונים הבוחנים את אלימות הפתוגן בזחלי עש הדונג.

274 • השוואה במודל עש הדונג בין זני MPEC בעלי אלימות שונה במודל דלקת עטין

275 בעכברות מניקות.

276

277

278

279

280

281

|  |   |     |
|--|---|-----|
|  | <b>שיטות וחומרים:</b>   | 282 |
|  | המחקר מורכב מ- 3 מערכי ניסוי (אשר יוסברו באופן מפורט בהמשך).  | 283 |
|  | <b>מערך ניסוי 1-</b> בחינה של אלימות החיידק ע"י הזרקת חיידקים לזחל וביצוע תצפית על רמות תמותה, מלניזציה והתגלמות של הזחלים.   | 284 |
|  | <b>מערך ניסוי 2-</b> בחינת שגשוג חיידקי ההוקעה בתוך הזחל ע"י כתישת מדגם זחלים כל שעתיים, זריעתם על צלחת אגר וספירת מושבות.  | 285 |
|  | <b>מערך ניסוי 3-</b> בחינת שגשוג חיידקי ההוקעה בתוך הזחל ע"י שימוש במכשיר ה- IVIS (in-vivo imaging system). בחלק זה הוזרקו לזחלים חיידקים עם פלסמיד לומינסנטי, ונעשתה קריאה של רמות הלומינסנציה במכשיר ה- IVIS. | 286 |
|  |   | 287 |
|  |   | 288 |
|  |   | 289 |
|  |   | 290 |

**החיידקים** 291

| סימוכין      | מאפיינים   | שם בעבודה | שם החיידק                      |
|--------------|--|-----------|--------------------------------|
| (28)         | זן MPEC אשר נבחן בניסויי הוקעה בפרות ועכברות.  | P4-NR     | <i>E. coli</i> P4-NR           |
| (29)         | זן MPEC מוטנט של P4-NR שהתגלה במעבדה   | P4-96     | <i>E. coli</i> P4-96           |
| עבודה במעבדה | מוטנט של <i>E. coli</i> P4-NR אשר חסר את PAI1  | ΔPAI1     | <i>E. coli</i> P4-NRΔPAI1      |
| עבודה במעבדה | מוטנט של <i>E. coli</i> P4-NR שאינו מכיל מספר גנים המקודדים לחלבונים ממשפחת ה- RHS שהוא הטוקסין המרכזי של מערכת הפרשה מטיפוס 6 | ΔPAI2     | <i>E. coli</i> P4-NRΔPAI2      |
| (30)         | זן מעבדתי ששימש כמקור ל- Keio Collection   | K-12      | <i>E. coli</i> K-12 - BW 25113 |
| (31)         | זן מעבדתי לא פתוגני  | DH-5α     | <i>E. coli</i> DH-5α           |

292

**פלסמידים:** 293

| סימוכין | פירוט  | שם פלסמיד |
|---------|--|-----------|
| (32)    | ביטוי גן mCherry באופן קבוע ורציף, עמיד לאמפיצילין.                                  | pKB2690   |
| (33)    | ביטוי <i>Photobacterium luminescens lux operon</i> באופן קבוע ורציף, עמיד לאמפיצילין | pCP38     |

294

295 החיידקים הופקו מסטוקים מעבדתיים, אשר גודלו ממושבה אחת והוקפאו יחד עם גליצרו

296 ב- 80°C.

|   |                                    |     |
|---|------------------------------------|-----|
|   | <b><u>מדיום גדילה:</u></b>         | 297 |
| LB: 1% bacto trypton, 0.5% yeast extract, 1% NaCl                                   |                                    | 298 |
| LB agar: LB + 1.5% bacto agar   |                                    | 299 |
|   | <b><u>אנטיביוטיקה:</u></b>         | 300 |
|   | אמפיצילין: 100 מיקרוגרם/מ"ל        | 301 |
|   |                                    | 302 |
|   | <b><u>גידול והפקת החיידקים</u></b> | 303 |
| בוצעה זריעת בידוד של החיידקים ב-LB אגר. הזן P4NR נזרע בצלחת LB אגר המכילה           |                                    | 304 |
| אמפיצילין.  |                                    | 305 |
| צלחות הפטרי הונחו למשך הלילה (18-24 שעות) באינקובטור בטמפ' של 37 <sup>0</sup> C.    |                                    | 306 |
| מכל צלחת נלקחו דגימות מ- 3 מושבות בצורה אקראית. את הדגימות הוספנו ל- 10 מ"ל         |                                    | 307 |
| תמיסת LB. דגימות אלו עברו הדגרה למשך הלילה (12-24 שעות), בטלטול 110RPM ב-           |                                    | 308 |
| 37 <sup>0</sup> C.  |                                    | 309 |
| בבוקר המחרת העברנו 100 מק"ל מתרבית הלילה ל- 10 מ"ל תמיסת LB טרייה וגידלנו           |                                    | 310 |
| בטלטול 110 RPM, ב- 37 <sup>0</sup> C למשך שלוש שעות, בכדי להגיע לאמצע השלב המעריכי. |                                    | 311 |
| בתום הדגרה זו המבחנות עברו סרוז עשר דקות ב- 3000xg, שפיכה של הנוזל והרחפה ב-        |                                    | 312 |
| 10 מ"ל PBS סטרילי.  |                                    | 313 |
| לבסוף, מכל תמיסת חיידקים הוכנו שבעה מיהולים עשרוניים ב- 96-well plate u-bottom,     |                                    | 314 |
| 200 מק"ל הוספו לבארית הראשונה וממנה הועברו 20 מק"ל ל-180 מק"ל PBS באופן             |                                    | 315 |
| סדרתי עד למיהול 10 <sup>-7</sup> .  |                                    | 316 |
|   |                                    | 317 |
|   | <b><u>ספירת החיידקים</u></b>       | 318 |
| לצורך ספירת החיידקים השתמשנו בזריעה בטיפות ובזריעה ע"י בידים סטריליים.              |                                    | 319 |
|   | <b><u>זריעה בטיפות:</u></b>        | 320 |
| צלחות האגר הוצאו מהמקרר ויובשו תחת מנדף למשך כ-20 דקות.                             |                                    | 321 |

|     |  |
|-----|--|
| 322 | נלקחו 5 מק"ל של תמיסת חיידקים מהמיהולים העשרוניים שהוכנו כפי שהוסבר לעיל.                      |
| 323 | צלחות הפטרי הונחו באינקובציה למשך לילה (20-12 שעות) בטמפ' של $37^{\circ}\text{C}$ ובוצעה       |
| 324 | ספירת חיידקים יום למחרת. כמות החיידקים חושבה מהטיפות בהן גדלו בין 2-50 מושבות.                 |
| 325 | <u>זריעה בבידים:</u>   |
| 326 | צלחות האגר הוצאו מהמקרר ויובשו תחת מנדף למשך כ-20 דקות.  |
| 327 | השתמשנו בבידים סטריליים על מנת לפזר את תמיסת החיידקים באופן אחיד על הצלחת.                     |
| 328 | נלקחו 50 מק"ל מבאריות המיהול של $10^{-5}$ - $10^{-6}$ אשר הוכנו כפי שהוסבר לעיל.               |
| 329 | צלחות הפטרי הונחו באינקובציה למשך לילה (20-12 שעות) ב- $37^{\circ}\text{C}$ , ובוצעה ספירה יום |
| 330 | למחרת. כמות החיידקים חושבה מהצלחות בהן גדלו עד 500 מושבות.                                     |
| 331 |  |
| 332 | <u>זחלי עש הדונג</u>   |
| 333 | <u>הכנת המזון לזחלים:</u>  |
| 334 | חומרים: 100 גר' סולת, 200 גר' קמח, 50 גר' שמרים יבשים, 100 גר' סובין חיטה, 125 גר'             |
| 335 | גליצרו, 125 גר' דבש.   |
| 336 | כל המצרכים (מלבד הגליצרו) נקנו מחנות ושייכים לחברות מסחריות רגילות ללא יחוד                    |
| 337 | מסויים ולא עברו סטריליזציה במעבדה.   |
| 338 | החומרים עורבבו לכדי עיסה אשר נשמרה במקרר בטמפ' של $4^{\circ}\text{C}$ .                        |
| 339 |  |
| 340 | <u>גידול הזחלים:</u>   |
| 341 | בוצע שימוש בזחלי עש הדונג, גלריה מלונלה אשר גודלו במעבדתנו. הזחלים הראשונים                    |
| 342 | התקבלו ממעבדתו של פרופ' איתמר גלזר מהמרכז הוולקני.   |
| 343 | הזחלים גודלו בצנצנות פלסטיק עגולות בגדלים של 1-2 ליטר. מכסה הצנצנות חורר בכדי                  |
| 344 | שתהיה תחלופת גזים. הצנצנות וכל הציוד עברו שטיפה בסבון וחיטוי ע"י השריה                         |
| 345 | באקונומיקה 10% למשך 24 שעות. הניקוי והחיטוי בוצעו בתחילת ובסוף כל מחזור. במצבים                |

|     |   |
|-----|---|
| 346 | בהם צמחו פטריות ועובש בצנצנת, הצנצנות הוחלפו בצנצנות חדשות. בחלקו הפנימי של                     |
| 347 | מכסה הצנצנת הונח נייר מגבת אשר עליו עש הדונג מטיל את הביצים.                                    |
| 348 | הזחלים גודלו באינסקטריום בטמפ' של $27^{\circ}\text{C}$ , ובתנאי תאורה קבועים (12 שעות חושך ו-12 |
| 349 | שעות אור).  |
| 350 | לזחלים סופק מזון חדש בהתאם לניצולת המזון שלהם. בשלבי הלרווה הבוגרים המזון ניתן                  |
| 351 | כל יומיים/שלושה. חלק מהזחלים נלקחו לשימוש לצורך המחקר ולחלקם ניתנה האפשרות                      |
| 352 | להתפתח עד לשלב הסופי בו הפכו לעש והטילו ביצים על גבי נייר המגבת בצנצנת על מנת                   |
| 353 | לשמר את מושבת הגידול.   |
| 354 | בכדי לאסוף את הביצים, מיכל הפלסטיק הונח בקירור למשך מספר דקות בכדי שהעש לא                      |
| 355 | יתעופף החוצה בזמן פתיחת הכלי.   |
| 356 | הנייר עם הביצים נאסף והוחלף בנייר חדש. הנייר עם הביצים עבר השריה של שעה                         |
| 357 | בפורמאלדהיד 20% מתחת למנדף ולאחר מכן הביצים נשטפו במים מתחת לברז.                               |
| 358 | לבסוף הנייר עם הביצים הונח לייבוש למשך 24 שעות והוכנס לכלי נקי עם מעט מזון בתוכו                |
| 359 | ליצירת מחזור חדש.   |
| 360 |   |
| 361 | <b><u>בחירת הזחלים:</u></b>   |
| 362 | הזחלים הנבחרים הינם בשלב לרווה 6 לפני התגלמות, בגודל של כ- 2 ס"מ, ובעלי צבע                     |
| 363 | קרמי אשר מעיד על בריאות תקינה. זחלים אשר עברו מלניזציה או לקות מסוימת לא הוכנסו                 |
| 364 | למחקר.  |
| 365 | הזחלים נאספו יום לפני ההזרקות, וחולקו בצורה אקראית לקבוצות של 6-10 זחלים בתוך                   |
| 366 | צלחות פטרי.   |
| 367 |   |
| 368 |   |
| 369 |   |
| 370 |   |

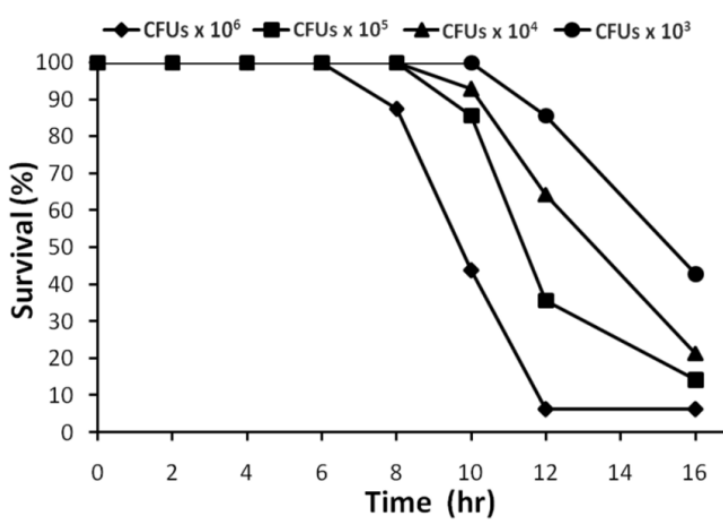


|  |                       |     |
|--|-----------------------|-----|
|  | <b><u>הזרקות:</u></b> | 371 |
| בשלב הראשון- הזחלים הונחו במקרר ב- 4°C למשך כשעה לפני ההזרקה. פעולה זו                                 |                       | 372 |
| נעשתה על מנת להוריד את התנועתיות של הזחל ובכך הקלה על פעולת ההזרקה.                                    |                       | 373 |
| בשלב השני- הזרק לזחלים 5 מק"ל של תמיסת חיידקים בריכוזים השונים (10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> CFUs) |                       | 374 |
| בהתאם לניסוי). ההזרקה בוצעה מאחורי הרגל המדומה הימנית האחרונה.   |                       | 375 |
| ההזרקה בוצעה ע"י מזרקי אינסולין 0.3 מ"ל בעלי מחט 30G.  |                       | 376 |
| מזרקים הוחלפו בין קבוצה לקבוצה, בין זני חיידקים שונים הוחלפו גם הכפפות.                                |                       | 377 |
|  |                       | 378 |
| <b><u>מערך ניסוי 1- בחינת אלימות החיידק ע"י תצפית רמות מלניזציה, התגלמות ותמותה:</u></b>               |                       | 379 |
| נעשתה השוואה בין הזנים הבאים: ΔPAI1, ΔPAI2, P4-96, P4-NR, K-12 ו- DH-5α.                               |                       | 380 |
| זחלי ביקורת הוזרקו בתמיסת PBS סטרילית או הושארו ללא הזרקה כלל.   |                       | 381 |
| הזחלים חולקו לקבוצות של 6-10 זחלים בכל צלחת פטרי. לכל חיידק הוקצו 4 צלחות פטרי,                        |                       | 382 |
| כאשר לכל צלחת הוזרק ריכוז אחר של תמיסת חיידקים הנע בין 10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup> CFUs           |                       | 383 |
| (המיהולים, חלוקת הזחלים וההזרקות בוצעו כפי שהוסבר לעיל). לאחר ההזרקה הזחלים                            |                       | 384 |
| הונחו באינקובטור בטמפ' של 37°C ובדקו כל כשעתיים במשך 12-19 שעות. בתצפית                                |                       | 385 |
| נבחנו רמות מלניזציה, התגלמות ותמותה.   |                       | 386 |
| • <b>תמותה-</b> התמותה הוגדרה כאשר הזחל לא זז גם לאחר שנוגעים בו.                                      |                       | 387 |
| • <b>חישוב רמות המלניזציה-</b> חישוב רמת המלניזציה הינה סובייקטיבית והיא הוכנסה                        |                       | 388 |
| לאינדקס ניקוד (כפי שהודגם באיור 4-A):  |                       | 389 |
| מלניזציה נמוכה = 1 נקודה.  |                       | 390 |
| מלניזציה בינונית = 2 נקודות.   |                       | 391 |
| מלניזציה מלאה = 3 נקודות.  |                       | 392 |
| • <b>בחינת טויות קורים והתגלמות</b> – נעשתה הבחנה רק בין כאלה שטוו קורים סביב                          |                       | 393 |
| עצמם עד לכדי התגלמות לעומת כאלה שלא (כפי שמודגם באיור 5-A).  |                       | 394 |
|  |                       | 395 |

|   |     |
|---|-----|
| <b><u>מערך ניסוי 2- בחינת הישרדות והתרבות החיידק בגוף הזחל לאחר הזרקה ע"י כתישה</u></b> | 396 |
| <b><u>וזריעה של הזחלים</u></b>  | 397 |
| בחלק זה נבחנו רק זני החיידקים: P4-NR, P4-96, ΔPAI1, ΔPAI2.                              | 398 |
| לביקורת בוצעה הזרקה עם PBS סטרילי.  | 399 |
| הזחלים חולקו לקבוצות עפ"י מערך ניסוי 1. בניסוי זה בוצעו הזרקות של שתי קבוצות ריכוז      | 400 |
| מכל חיידק $10^5$ ו- $10^6$ CFUs. כל שעתיים שני זחלים מכל קבוצה עברו הומוגניזציה וזריעה  | 401 |
| על צלחת פטרי. ספירה של החיידקים בוצעה כפי שהוסבר לעיל.                                  | 402 |
| הומוגניזציה: בוצעה ע"י הומוגנטור עם להבים סטריליים שהוחלפו בין כתישה לכתישה ובין        | 403 |
| דגימות. ההומוגניזציה בוצעה במבחנות סטריליות של 5 מ"ל. לכל מבחנה הוכנס זחל עם 1          | 404 |
| מ"ל PBS סטרילי. התהליך עצמו בוצע על קרח.  | 405 |
|   | 406 |
| <b><u>ניסוי 3- הישרדות והתרבות החיידק ע"י שימוש במכשיר ה- IVIS</u></b>                  | 407 |
| נעשה שימוש במכשיר IVIS Lumina series 3 – Caliper LifeSciences .                         | 408 |
| בחלק זה נבחנו החיידקים P4-NR, ΔPAI1, ΔPAI2 המכילים את הפלסמיד pCP38                     | 409 |
| המבטא <i>Photorhabdus luminescens lux operon</i> באופן רציף. כמו כן נבחן P4-96          | 410 |
| המכיל פלסמיד pKB2690 המבטא חלבון mCherry באופן קבוע ורציף.                              | 411 |
| בניסוי זה כל קבוצה הכילה 3 זחלים אשר הוכנסו לפיפטות פלסטיק בגודל 10 מ"ל. הזחלים         | 412 |
| הופרדו זה מזה ע"י תחימה בצמר גפן בכדי למנוע תזוזה של הזחלים. לכל קבוצה הוזרק            | 413 |
| $10^4$ CFUs של אחד ממיני החיידקים הנ"ל. 4 הקבוצות הוכנסו למכשיר ה-IVIS אשר ביצע         | 414 |
| קריאה של רמות לומיניסציה כל 15 דקות (כפי שנראה באיור 9).                                | 415 |
| הקריאה בוצעה במכשיר (IVIS Lumina Series III (PerkinElmer Inc., MA USA) עם               | 416 |
| מסך עירור סגור ומסך פליטה פתוח בשביל לומיניסציה (Bin 8, FOV 12.5, f2, 2 sec).           | 417 |
| קריאת הפלורסנציה מחלבון ה-mCherry התגלתה כלא שימושית בגלל רעש רקע רב                    | 418 |
| מרקמת הזחלים והחלטנו להתעלם ממנה.   | 419 |
|   | 420 |

|                |  |     |
|----------------|--|-----|
|                | <b><u>שיטות סטטיסטיות:</u></b>   | 421 |
|                | הניתוח הסטטיסטי בוצע בתוכנת SPSS.  | 422 |
| Kaplan – Meier | בכדי לבחון את השפעת החיידק על הישרדות הזחל נעשה שימוש במודל                        | 423 |
|                | ומבחן log rank להשוואת עקומות הישרדות.   | 424 |
|                | בכדי לבחון את הקשר בין שני משתנים קטגוריאליים (קשר בין זן החיידק וריכוזו לבין רמות | 425 |
|                | מלניזציה) נעשה שימוש במבחן חי בריבוע וכן מבחן חי בריבוע לבחינת מגמה.               | 426 |
|                | בכדי לבחון את הקשר בין זן החיידק להתגלמות נעשה שימוש במבחן המדויק של פישר.         | 427 |
|                | בכדי לבחון שינוי לאורך זמן עבור משתנים כמותיים (Total Flux ו-Avg Radiance) בניסוי  | 428 |
|                | האחרון, נעשה שימוש במבחן פרידמן הא-פרמטרי לבחינת מגמה.                             | 429 |
|                | בחינת הבדל ב-Avg Radiance ו-Total Flux בין 3 החיידקים השונים בכל נקודת זמן         | 430 |
|                | לחוד נעשה בעזרת מבחן Kruskal – Wallis הא-פרמטרי.                                   | 431 |
|                | בכדי לבדוק בו זמנית את אפקט הזמן וזן החיידק על Total Flux ו-Avg Radiance נעשה      | 432 |
|                | שימוש במודל ניתוח שונות עם מדידות חוזרות.  | 433 |
|                | בכדי לבחון את השפעת סוג החיידק, מינון ההזרקה והזמן על כמות ה-CFUs נעשה שימוש       | 434 |
|                | במודל ניתוח שונות דו-כיווני או תלת כיווני עם השוואות POST HOC על פי Scheffe.       | 435 |
|                | כל המבחנים הסטטיסטיים היו דו כיווניים וערך $p \leq 0.05$ נחשב כמובהק סטטיסטית.     | 436 |
|                |  | 437 |
|                | <b><u>תוצאות:</u></b>  | 438 |
|                | <b><u>1. בחינת אלימות P4-NR לעומת P4-96.</u></b>                                   | 439 |
|                | בחלק זה בוצעו מס' מבחנים הכוללים הדבקה של הזחלים בחיידקים שונים ע"י הזרקה          | 440 |
|                | של $10^3$ - $10^6$ CFUs של תמיסת חיידקים להמוצל הזחל. בוצעה תצפית על רמות תמותה,   | 441 |
|                | מלניזציה והתגלמות כאשר לביקורת נעשה שימוש בזני מעבדה לא אלימים K-12                | 442 |
|                | ו- <i>DH-5<math>\alpha</math></i> , PBS סטרילי וזחלים אשר להם לא הוזרק דבר.        | 443 |
|                | בנוסף לכך נבדק האם החיידק משגשג בזחל: מתוך הזחלים שהודבקו, כל שעתיים נלקחו 2       | 444 |
|                | זחלים שעברו כתישה וזריעה על צלוחית אגר.  | 445 |

447 הוקעה בזן P4-NR הובילה לתמותה גבוהה, התלויה במינון הזרקה ( $p < 0.001$ ). בהזרקת  
 448 המינון הגבוה ( $10^6$  CFUs) של P4-NR נצפתה תמותת זחלים כעבור שש שעות מהזרקה  
 449 (כפי שמתואר באיור 3). לעומת זאת הוקעה ב- P4-96 או זני הביקורת האחרים לא הובילה  
 450 לתמותה כלל.  
 451

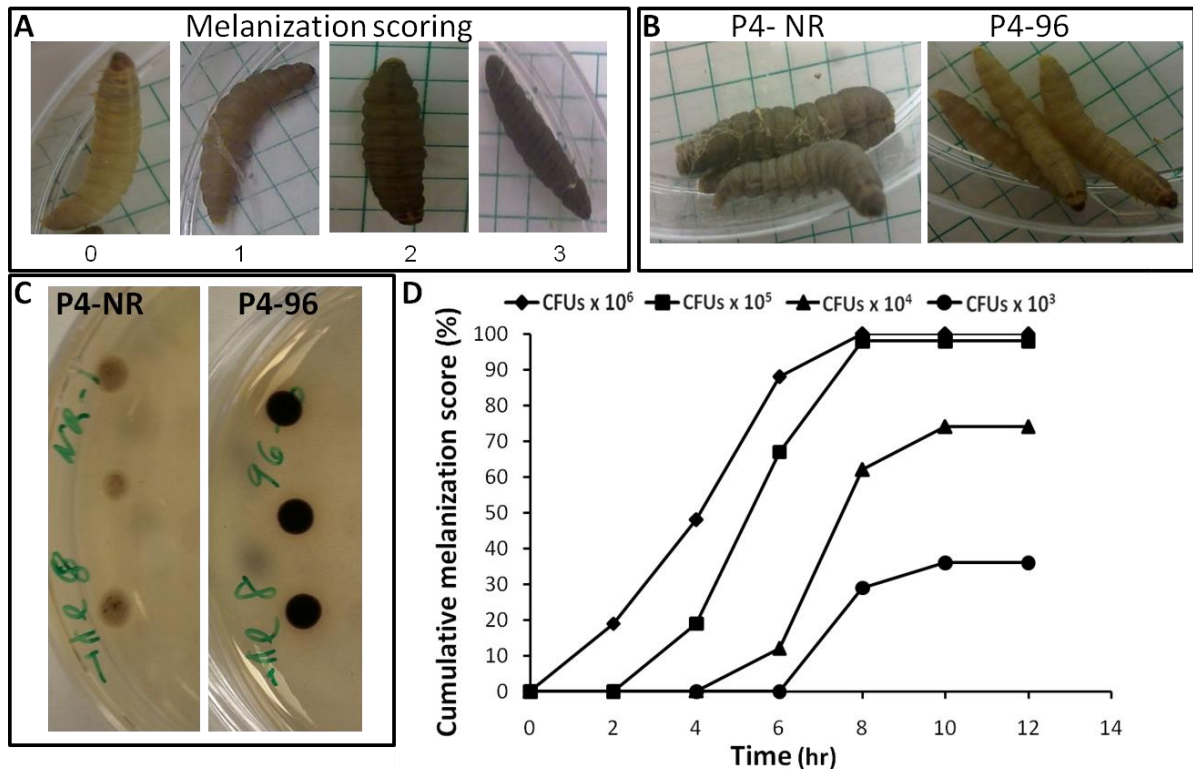


**איור 3:** הוקעה של הזחלים בזן P4-NR הובילה לתמותה של הזחלים. התמותה תלויה מינון הזרקה. לעומת זאת הוקעה בזנים האחרים לא הובילה לתמותה כלל ( $p < 0.001$ ).  
 בגרף: עקומת השרדות של זחל עש הדונג לאחר הזרקת החיידק P4-NR במינונים שונים ( $10^3 - 10^6$  CFUs). בוצעה בדיקה של תמותת הזחלים כל שעתיים למשך 16 שעות. בכל סידרה היו 14-16 זחלים.

452

מבחן המלניזציה (Melanization) 453

454 כשבוחנים את רמת המלניזציה, המעידה על התקדמות המחלה בזחלים, הוקעה בזן P4-NR  
 455 הובילה לעליה ברמת המלניזציה בזחל. עליה זו הינה מובהקת ותלויה מינון הזרקה, כמו כן  
 456 נראתה מגמת עליה של רמות המלניזציה לאורך הזמן ( $p < 0.001$ ) (איור 4-D). הוקעה בזן  
 457 P4-96 ובזני הביקורת האחרים לא הובילה למלניזציה כלל (איור 4-B). דירוג המלניזציה  
 458 בוצע ע"י חלוקה לרמות כמתואר באיור 4A. תופעת מלניזציה נוספת שנצפתה בניסוי זה  
 459 מתוארת באיור 4C, בה ניתן לראות מוקדי זריעה של זחלים שנכתשו, עברו הומוגניזציה  
 460 ונזרעו על צלחת אגר 8 שעות לאחר הוקעה ב- P4-NR וב- P4-96. מוקדי הזריעה של  
 461 הזחלים להם הוזרק P4-96 עברו מלניזציה והשחירו בעוד מוקדי הזריעה של הזחלים להם  
 462 הוזרק P4-NR לא שינו את צבעם.



**איור 4:** P4-NR משרה מחלה וגורם למלניזציה התלויה במינון הזרקה. דירוג רמות מלניזציה בזחל המייצגות את התקדמות המחלה (A). מלניזציה מלאה היתה שלב מקדים לתמותה באופן עקבי (A.3). 6 שעות לאחר הזרקה P4-NR גורם למחלה ומשרה מלניזציה בזחלים לעומת P4-96 אשר לא משפיע על הזחלים כלל (B). ירידה ביכולת הזחל לסנטז מלנין לאחר הזרקה P4-NR כנראה עקב התשת המערכת החיסונית. 8 שעות לאחר הזרקה P4-NR ו-P4-96 הזחלים נכתשו ונזרעו על צלחות אגר אשר עברו אינקובציה למשך הלילה. מוקדי הזריעה של הזחלים להם הוזרק P4-96 עברו מלניזציה והשחירו מאוד (תמונה ימין) בעוד מוקדי הזריעה של הזחלים להם הוזרק P4-NR לא שינו צבעם (תמונה שמאל) (C). רמות המלניזציה המצטברת בזחלים בעקבות הוקעה בזן P4-NR מוצגות בגרף P4-NR משרה מחלה התלויה במינון ההזרקה וגורם למלניזציה בזחלים ביחס ל-P4-96 ולזני החיידקים האחרים אשר לא הובילו למלניזציה כלל (D) ( $p < 0.001$ ).

463

464

מבחן טויות קורים והתגלמות (Cocoon formation) 465

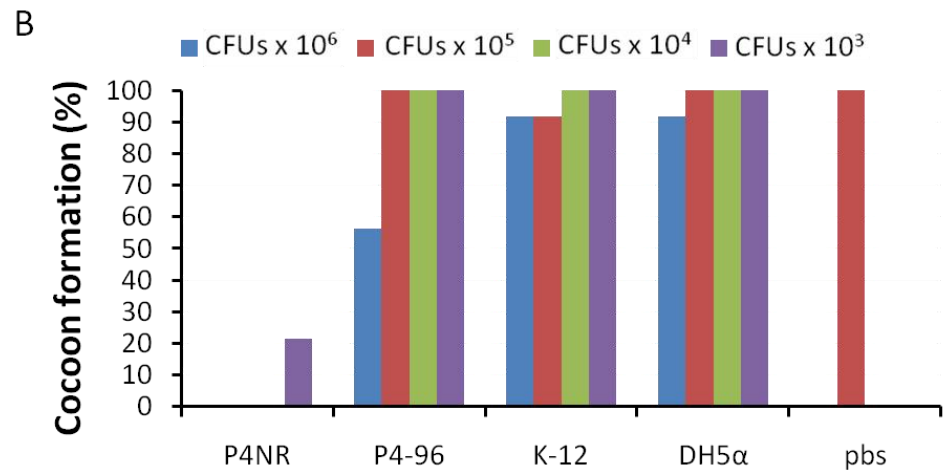
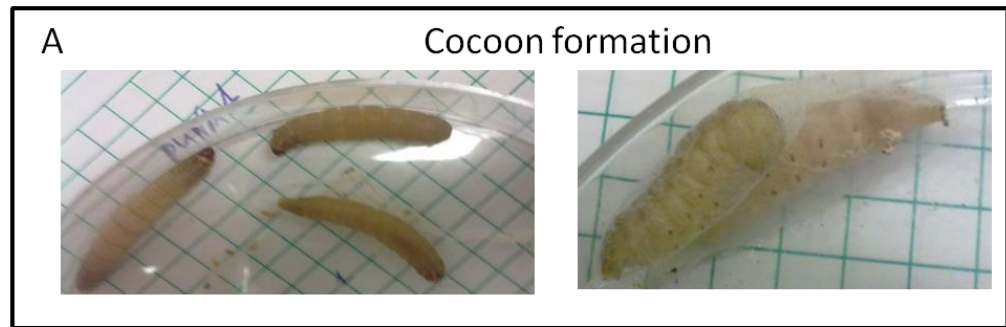
כאשר בוחנים את טויות הקורים והתגלמות הזחלים ניתן להבחין כי חלה ירידה משמעותית 466

ומובהקת בהתגלמות הזחלים להם הוזרק זן P4NR בכל קבוצות המיחולים לעומת שאר 467

הקבוצות ( $p < 0.001$ ). התגלמות בקבוצה זו נצפתה רק ב- 20% מהזחלים אשר הוזרק להם 468

ריכוז של  $10^3$  CFUs (ריכוז ההזרקה הנמוך ביותר). 469

470 הזרקת P4-96 במינון גבוה ( $10^6$  CFUs), הובילה אף היא לירידה משמעותית בהתגלמות  
 471 לעומת קבוצות הביקורת ( $p=0.0013$ ). בקבוצה זו כ- 44% מהזחלים לא התגלמו.  
 472 בכל שאר קבוצות הביקורת ובהזרקת של P4-96 לא נצפתה ירידה מובהקת בהתגלמות  
 473 הזחלים (איור 5).



**איור 5:** הוקעה של זחלי עש הדונג בזן P4-NR מוביל לפגיעה בהתגלמות. טוויית קורים והתגלמות כמדד מחלה, זחלים בריאים טוויים קורים ומתגלמים (תמונה ימין) בעוד בזחלים חולים חלה ירידה בטוויית הקורים והם אינם מתגלמים (תמונה שמאל) (A).  
 P4-NR גורם למחלה ופוגע בהתגלמות הזחלים באופן מובהק בכל המינונים לעומת שאר החיידקים וביקורת ה- PBS ( $p < 0.001$ ). הזרקת מינון גבוה ( $10^6$  CFUs) של P4-96 הובילה אף היא לירידה מובהקת בהתגלמות הזחלים ביחס לקבוצות הביקורת ( $p = 0.0013$ ).  
 הגרף מציג את % התגלמות הזחלים לאחר הזרקת חיידקים שונים במינונים משתנים

474

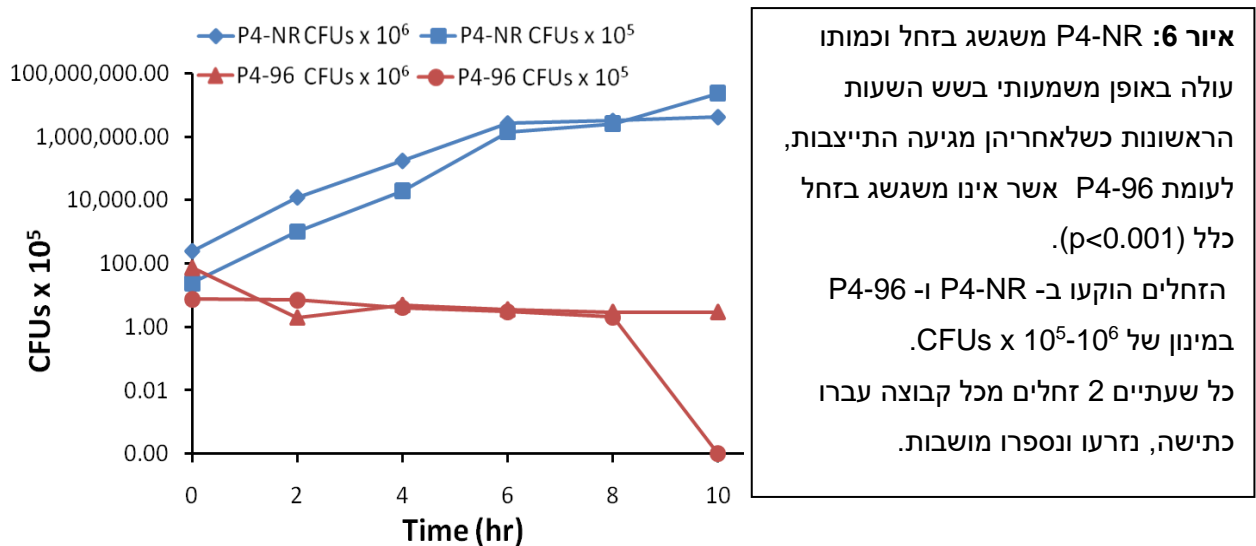
475

476

477

478 מבחן התרבות ושגשוג הזנים P4-NR ו-P4-96 בזחל

479 זחלים עברו הוקעה בזנים P4-NR ו-P4-96, ע"י הזרקת  $10^5$ - $10^6$  CFUs להמוצל. כל  
480 שעתיים שני זחלים עברו כתישה, הומוגניזציה ונזרעו על צלחת אגר אשר עברה הדגרה במשך  
481 הלילה.  
482 P4-NR שגשג בזחל לעומת P4-96 אשר אינו שגשג כלל ( $p < 0.001$ ). בזחלים שהוקעו ב-  
483 P4-NR היתה עליה בספירת החיידקים במשך 6 השעות הראשונות כשלאחריהן הגיעה  
484 התייצבות. כמו כן קיים הבדל ויזואלי בהזרקת המהולים השונים של P4-NR אך הבדל זה  
485 אינו מובהק סטטיסטית. בזחלים שהוקעו ב-P4-96 לא היתה עליה בכמות החיידקים ואף  
486 נצפתה ירידה בכמות החיידקים בזחל (איור 6).



487

488 **2. בחינת אלימות P4-NR לעומת  $\Delta$ PAI1 ו- $\Delta$ PAI2**

489 בכדי לבחון את הקשר בין אלימות זן MPEC במודל הזחל למערכת הפרשה מטיפוס 6.  
490 בוצעו ניסויי הוקעה אשר בחנו את הזן P4-NR (המכיל מערכת הפרשה מלאה),  $\Delta$ PAI1 ו-  
491  $\Delta$ PAI2, אשר פגומים בגנים המקדדים למערכת הפרשה זו (כפי שהוסבר לעיל). ו-P4-96  
492 אשר חסרים לו גנים נוספים מלבד מערכת הפרשה.  
493 חלק זה של הניסוי בוצע באופן דומה לניסוי הקודם. בוצעה הוקעה של הזחלים בזנים הנ"ל  
494 ע"י הזרקת  $10^3$ - $10^6$  CFUs של תמיסת חיידקים להמוצל הזחל. בחלק זה בוצעה רק

495 עקומת הישרדות ובדיקה של שגשוג החיידק בזחל ע"י כתישה של זחלים וזריעה על צלוחית

496 אגר.

497 2.1 מבחן הישרדות

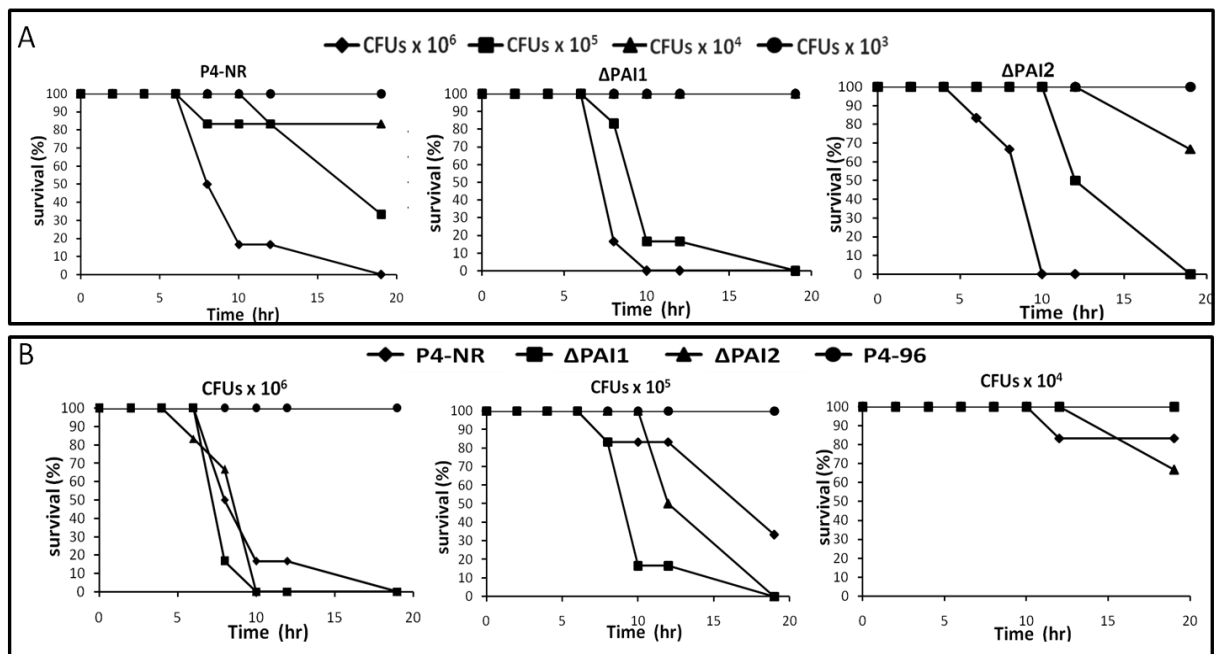
498 הוקעה ב- P4-NR,  $\Delta$ PAI1 ו-  $\Delta$ PAI2 הובילה לתמותה של הזחלים. התמותה הינה תלוית

499 מינון הזרקה ( $p < 0.001$ ) (איור 7A). לעומת זאת הוקעה בזן P4-96 לא הובילה לתמותה

500 כלל (איור 7). כאשר משווים בין P4-NR למוטנטים שלו,  $\Delta$ PAI1 גרם לתמותה מוגברת רק

501 בהזרקת  $10^5$  CFUs ( $p=0.021$ ), אך במינוני ההזרקה האחרים לא נצפתה שונות כלל בין

502 הזנים כפי שמודגם באיור 7B.



**איור 7:** P4-NR והמוטנטים שלו ( $\Delta$ PAI1/ $\Delta$ PAI2) מראים אלימות גבוהה ותלוית מינון כלפי זחלי עש הדונג. בגרפים מוצגות עקומות הישרדות של כל אחד מהמינים בריכוזי הזרקה שונים (A). P4-NR והמוטנטים שלו מראים אלימות מובהקת לעומת P4-96 וביקורת ה- PBS אשר לא הראו אלימות כלל ( $p < 0.001$ ). נראתה שונות מובהקת בין P4-NR למוטנטים רק בריכוז הזרקה של  $10^5$  CFUs בו  $\Delta$ PAI1 הראה אלימות מוגברת מ- P4-NR, ברמת מובהקות של  $P=0.021$  (B).

503

504 2.2 התרבות ושגשוג P4-NR לעומת  $\Delta$ PAI1/ $\Delta$ PAI2

505 P4-NR והמוטנטים שלו משגשים בזחל לעומת P4-96 שאינו משגשג כלל. בזחלים שהוקעו

506 ב- P4-NR,  $\Delta$ PAI1 ו-  $\Delta$ PAI2 חלה עליה מובהקת בכמות החיידקים שנספרו לעומת זחלים

507 שהוקעו ב- P4-96, כפי שמודגם באיור 8 ( $p < 0.001$ ). כאשר משווים בין P4-NR למוטנטים



508 שלו, ניתן לראות כי השינוי לאורך זמן הינו תלוי זן, וההבדל ברמת השגשוג ביניהם מתחיל

509 שש שעות מהדבקה ( $p < 0.001$ ). P4-NR מפסיק לשגשג כעבור 6 שעות מהזרקה,  $\Delta PAI2$

510 מפסיק לשגשג כעבור 8 שעות בעוד  $\Delta PAI1$  ממשיך לשגשג גם לאחר 8 שעות (איור 8).

511

512 **3. בחינת התרבות ושגשוג החיידקים בזחל ע"י שימוש בביופוטניקה**

513 בחלק זה בוצע שימוש בזנים -P4-NR,  $\Delta PAI1$  ו- $\Delta PAI2$  אשר מבטאים חלבון לומינסנטי

514 באופן קבוע. בכל קבוצה היו 3 זחלים אשר הודבקו בחיידק ע"י הזרקה להמוצל והוכנסו

515 לפיפטה כמודגם באיור 9. כל רבע שעה בוצעה קריאת לומינסנציה (עוצמת אור נראה)

516 וחושב ממוצע ה- Total Flux (איור 9D) וה- Avg Radiance (איור 9C). בתוצאות

517 שהתקבלו מניתוח זה, ניתן לראות כי הזן P4-NR והמוטנטים שלו משגשים בזחל במשך

518 שש השעות הראשונות ( $p < 0.001$ ) כשלאחריהן ישנה התייצבות וירידה קלה בכמות

519 החיידקים. כאשר משווים בין P4-NR למוטנטים שלו, נראה כי הזחלים להם הוזרק P4-NR

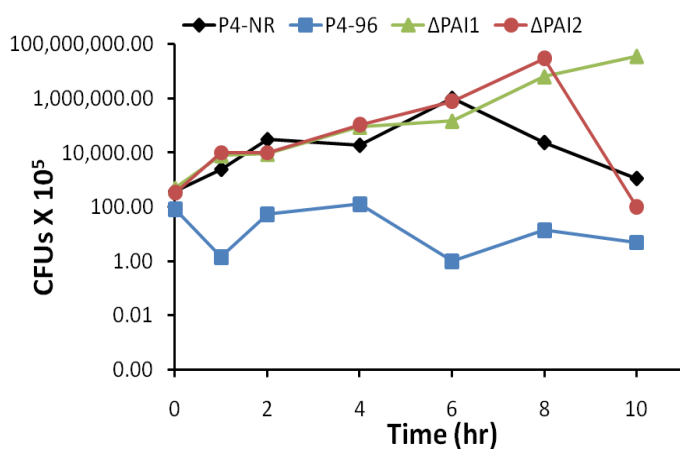
520 מבטאים רמות לומינסנציה גבוהות יותר במשך השעות הראשונות אך התוצאות אינן

521 מובהקות באופן רציף לאורך כל הבדיקה. ישנה שונות עם רמת מובהקות של  $p \leq 0.05$  בחלק

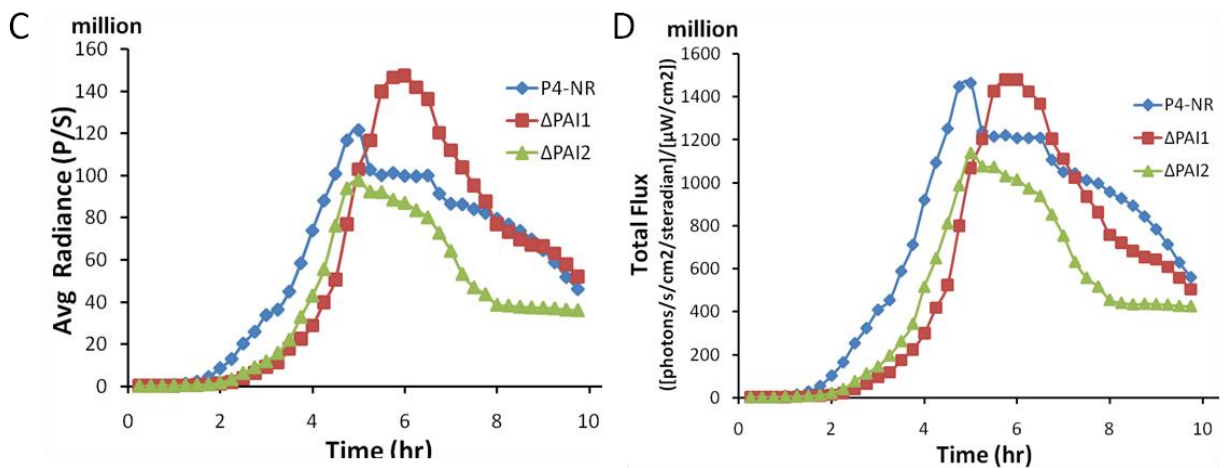
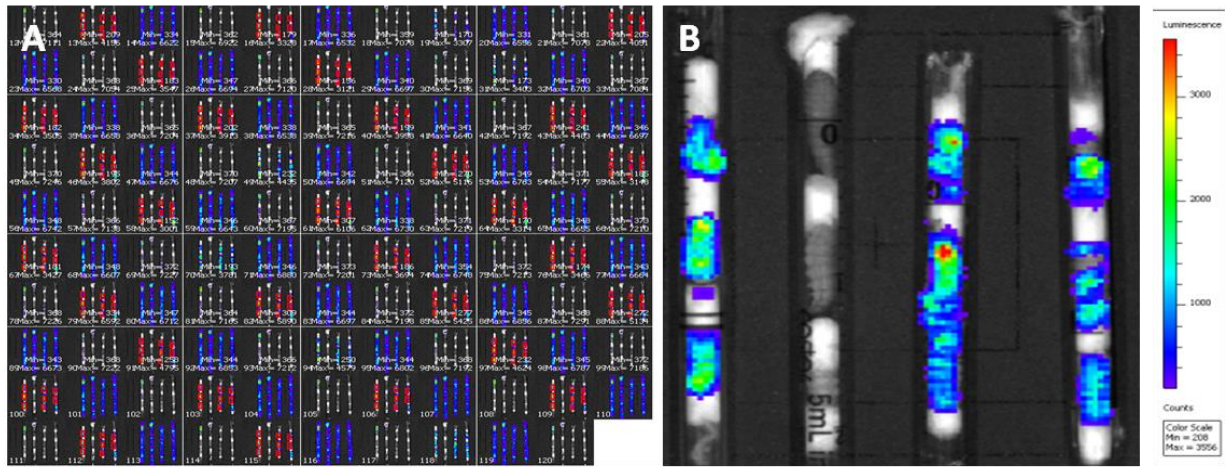
522 מהבדיקות שנעשו במשך שלושת השעות הראשונות לבדיקה אך תוצאות אלו אינן עקביות

523 ולכן אינן מובהקות מבחינה סטטיסטית. חשוב לציין ש-P4-96 מבטא חלבון mCherry ולא

524 חלבון לומינסנטי ולכן אין להתחשב בתוצאות שלו.



**איור 8: P4-NR והמוטנטים שלו משגשים ומתרבים בזחל לעומת P4-96 שאינו משגשג כלל ( $p < 0.001$ ). P4-NR והמוטנטים שלו  $\Delta PAI1/\Delta PAI2$  משגשים באופן דומה במשך שש השעות הראשונות אך לאחריהן ניתן לראות הבדל בקצב התרבות החיידקים כאשר  $\Delta PAI1$  ממשיך לשגשג גם כעבור 8 שעות בניגוד לחיידקים האחרים ( $p < 0.001$ ). לזחלים הוזרק  $CFUs \times 10^6$ , כל שעתיים 2 זחלים מכל קבוצה עברו כתישה, נזרעו ונספרו.**



**איור 9:** זן MPEC P4-NR והמוטנטים במערכת ההפרשה מטיפוס 6 ( $\Delta PAI1/\Delta PAI2$ ) מתרבים ומשגשים בזחל כפי שמודגם בעזרת מכשיר ה-IVIS. קריאת הלומינסנציה במכשיר ה-IVIS בנקודות זמן שונות (A). התמקדות בנקודת זמן אחת (B): כל קפילרה הינה קבוצה בת 3 זחלים להם הזרק (משמאל לימין) P4-NR, P4-96,  $\Delta PAI1$ ,  $\Delta PAI2$ . לא הראה לומינסנציה מכיוון שביטא גן mCherry ולכן אין להתחשב בתוצאותיו (B). P4-NR והמוטנטים שלו מתרבים ומשגשים בזחל במשך שש השעות הראשונות ולאחר מכן נראית התייצבות וירידה ברמות הלומינסנציה (P4-NR). ( $P < 0.001$ ). ביטא רמות לומינסנציה גבוהות יותר מהמוטנטים במשך השעות הראשונות אך תוצאות אלו אינן מובהקות סטטיסטית. הגרפים מציגים את רמת הלומינסנציה הממוצעת שנמדדה כל 15 דקות ע"י מכשיר ה-IVIS כמתואר בתמונה A במהלך שש השעות הראשונות. ה-Avg Radiance מוצגים בגרף שמאל (C) ה-Total Flux מוצג בגרף ימין (D).

|   |                             |     |
|---|-----------------------------|-----|
|   | <b><u>דיון ומסקנות:</u></b> | 529 |
| דלקת עטין חיידקית, הנגרמת מחיידקי א. קולי, מובילה להפסד הכלכלי הגבוה ביותר בענף                 |                             | 530 |
| חיות המשק כאשר מתייחסים למדד הבודד (4). עד היום לא תוארה מערכת אלימות                           |                             | 531 |
| המשותפת לזני MPEC שונים. במעבדתו של פרופ' שפיגל התגלו הבדלים מובהקים בין שני                    |                             | 532 |
| זני א. קולי דומים אך שונים: P4-NR המוביל לדלקת עטין מפושטת לעומת P4-96 המוביל                   |                             | 533 |
| לדלקת עטין קלה ומקומית יותר. כאשר בוצע ריצוף גנטי התברר כי P4-NR מכיל גן אלימות                 |                             | 534 |
| המבטא מערכת הפרשה מטיפוס 6. ההנחה הייתה כי מערכת זו היא אחד מהמרכיבים                           |                             | 535 |
| ההופכים את P4-NR לאלים יותר וגורמת לו ליצור דלקת מפושטת וחריפה יותר. תיאוריה זו                 |                             | 536 |
| אוששה במודל עכברי, כאשר מוטנט של P4-NR ( $\Delta PAI1$ ) אשר אינו מכיל את מערכת הפרשה           |                             | 537 |
| מטיפוס 6 הראה אלימות מופחתת לעומת P4-NR. דבר זה התבטא ביכולת שגשוג                              |                             | 538 |
| והתפשטות נמוכים יותר ברקמת העטין.   |                             | 539 |
| מטרת מחקר זה היתה לבחון את יכולתו של זחל עש הדונג לשמש כחיית מודל לחיידקי א.                    |                             | 540 |
| קולי מחוללי דלקת עטין.  |                             | 541 |
| תוצאות המחקר הראו כי P4-NR הנו אלים לזחלי עש הדונג. החיידק גורם לתמותה,                         |                             | 542 |
| מלניזציה וירידה ביצור הקורים שלהם באופן מובהק יותר מאשר P4-96 אשר כמעט ואינו                    |                             | 543 |
| מראה אלימות (מלבד פגיעה קלה בטוויית הקורים ובהתגלמות כאשר מזריקים אותו במינונים                 |                             | 544 |
| גבוהים). בנוסף לכך, P4-NR הראה יכולת שגשוג והתרבות בתוך זחלי עש הדונג בעוד P4-                  |                             | 545 |
| 96 לא הצליח לשגשג כלל. כמו כן 8 שעות לאחר הוקעה ב-P4-NR וב-P4-96. מוקדי                         |                             | 546 |
| הזריעה של הזחלים להם הוזרק P4-96 עברו מלניזציה והשחירו בעוד מוקדי הזריעה של                     |                             | 547 |
| הזחלים להם הוזרק P4-NR לא שינו את צבעם. ההערכה היא שחלה ירידה ביכולת הזחל                       |                             | 548 |
| לסנתז עוד מלנין עקב התשה של המערכת החיסונית ופגיעה במסלול פנולאוקסידאז. יתכן                    |                             | 549 |
| וזה מתרחש עקב ירידה בסובסטרט (תירוזין) או אף פגיעה/עיכוב של האנזים עצמו.                        |                             | 550 |
| בניסיון להשוות בין P4-NR למוטנטים שלו $\Delta PAI1$ ו- $\Delta PAI2$ , לא נראה קו מגמה ברור ולא |                             | 551 |
| נראו הבדלים מובהקים ועקביים בין זנים אלה לאורך כל הניסויים. במבחן התמותה ההבדל                  |                             | 552 |
| היחידי שנראה היה רק בהזרקות המינון של $10^5 CFUs$ בו $\Delta PAI1$ הראה תמותה מוגברת עם         |                             | 553 |

|     |  |
|-----|--|
| 554 | רמת מובהקות של $p=0.021$ בעוד במינוני ההזרקה האחרים לא נצפתה שונות בין P4-NR     |
| 555 | למוטנטים שלו (איור 7B). במבחן הכתישה והזריעה הבוחן את יכולת שגשוג החיידק בזחל    |
| 556 | לא נראו הבדלים בין P4-NR לבין המוטנטים שלו. במבחן הבוחן את רמות הלומינסנציה בזחל |
| 557 | אשר נמצאות בקורולציה ישירה לשגשוג החיידק בזחל, P4-NR הראה אלימות מובהקת אך       |
| 558 | לא עקבית אך ורק בשלוש השעות הראשונות של הניסוי. לאור האמור לעיל, בהשוואה בין     |
| 559 | P4-NR למוטנטים שלו לא נצפה קו מגמה ברור בשונה ממה שהתקבל במודל העכבר, בו זן      |
| 560 | הבר, P4-NR הראה אלימות הגבוהה באופן מובהק מהמוטנטים שלו.                         |
| 561 | חשוב לציין כי המדגם היה קטן למדי במבחן ההשוואה בין P4-NR למוטנטים שלו. יתכן וזו  |
| 562 | הסיבה שלא קיבלנו תוצאות מובהקות. כמו כן קיימת אפשרות כי מערכת ההפרשה מטיפוס      |
| 563 | 6 אותה נושא P4-NR מגבירה את האלימות המקומית כפי שהודגם במודל העכברי אך אינה      |
| 564 | מגבירה את האלימות הסיסטמית כפי שנבחן במודל הזחל.                                 |
| 565 | לסיכום, תוצאות מחקר זה תומכות בכך שעש הדוגג יכול לשמש כחיית מודל שיכולה לעזור    |
| 566 | רבות בבחינת חיידקי א. קולי המובילים לדלקת עטין.                                  |
| 567 | הצעות לייעול ושיפור המחקר הנוכחי:  |
| 568 | 1. יש לבצע חזרות נוספות בחלקי הניסוי בהם המדגמים היו קטנים כגון בניסוי עם מכשיר  |
| 569 | ה- IVIS.   |
| 570 | 2. שיטת ההזרקה הייתה ידנית, וההזרקה הייתה במינונים נמוכים. עובדה זו יכולה        |
| 571 | להוביל לאי דיוקים בהזרקות. עקב כך נדרשה הכנה מוקדמת ואימון בהזרקה. ניתן          |
| 572 | לשפר זאת ע"י שימוש במזרק אוטומאטי (מזעור הסיכוי לטעויות והצורך במיומנות          |
| 573 | בהזרקה).   |
| 574 | 3. בחינת המלניזציה הייתה סובייקטיבית, ניתן לבצע זאת בצורה אובייקטיבית ע"י קריאה  |
| 575 | של המוצל הזחל בשיטה פוטומטרית (13).  |
| 576 | 4. שיטה נוספת שניתן להכניס למודל היא בחינת רמות לקטאט המעידות על נזק תאי (13).   |
| 577 | 5. קריאת הלומינסנציה במכשיר ה- IVIS יכולה להשתנות עקב המלניזציה של הזחלים.       |
| 578 | מכאן שיתכן שזחל שהגיב בצורה חמורה יותר לפתוגן והגיב ברמות מלניזציה גבוהות        |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| יותר יראה רמות לומינסנציה נמוכות יותר מזחל אחר. ניתן לבדוק את השפעת   | 579                      |
| המלניזציה על הקריאה הפוטומטרית ולשקלל את השפעה זו בתוצאות הניסויים  | 580                      |
| הבאים. בכדי לבדוק את השפעת המלניזציה על הקריאה הפוטומטרית ניתן להזריק   | 581                      |
| כמות ידועה מראש של חיידקים המבטאים חלבון לומינסנטי לזחלים בשלבי מלניזציה  | 582                      |
| שונים ולבחון את השפעת המלניזציה על קריאת האור.  | 583                      |
|   | 584                      |
| <b><u>הבעת תודה:</u></b>  | 585                      |
| לפרופ' נחום שפיגל על ההכוונה והעזרה.  | 586                      |
| לחגית סלומון על העזרה והתמיכה לאורך כל הדרך   | 587                      |
| לטלי בדולח אברם על היעוץ הסטטיסטי   | 588                      |
| ולכל חברי המעבדה שנתנו ידם לעזרה בעבודה.  | 589                      |
|   | 590                      |
|   | 591                      |
| <b><u>Bibliography</u></b>  | 592                      |
| 1. <i>Mammary pathogenic Escherichia Coli</i> . <b>Shpigel YN, Elazar S, Renshine I.</b> 2008, <i>Microbiology</i> 11:60-65.  | 593<br>594               |
| 2. עבודת. <b>גרינברג נ.</b> 2011, <b>חיידקי אישריכיה קולי מחוללי דלקת עטין- דומים אבל שונים. גמר ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט</b>   | 595<br>596               |
| 3. <i>Betahydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic Escherichia coli.</i> <b>Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY.</b> 2008, <i>Infect Immun</i> 76: 2802-2807.                       | 597<br>598<br>599<br>600 |
| 4. <i>Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review.</i> <b>Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H.</b> 2011, <i>Veterinary Quarterly</i> 29(1): 18-31.  | 601<br>602<br>603        |
| 5. <i>Betahydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic Escherichia coli.</i> <b>Grinberg N, Shpigel NY.</b> 2008, Amirim project, The Robert H Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment. | 604<br>605<br>606<br>607 |

|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 6. <i>Genome Based Phylogeny and Comparative Genomic Analysis of Intra-Mammary Pathogenic Escherichia coli</i> . <b>Richards VP, Lefébure T, Pavinski Bitar PD, Dogan B, Simpson KW, Schukken YH, Stanhope MJ</b> . 2015, PLoS One 10(3): e0119799.  | 608<br>609<br>610<br>611        |
| 7. <i>Pathogenic Escherichia Coli</i> . <b>Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT</b> . 2004, Nature Reviews Microbiology 2:123-140.  | 612<br>613                      |
| 8. <i>Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: a combination of virulence with antibiotic resistance</i> . <b>JDD, Pitout</b> . 2012, Frontiers in Microbiology 3: 9.  | 614<br>615                      |
| 9. <i>Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolated in clinical bovine mastitis</i> . <b>Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi AL, Pitkala A, Pelkonen S, Pyorala S</b> . 2011, Veterinary Microbiology 147: 383-388.  | 616<br>617<br>618<br>619        |
| 10. <i>Finding genes which are involved in mammary pathogenic E.coli virulence mechanisms and genetic manipulations</i> . <b>Mastich Y</b> . 2009, A Thesis submitted to The Faculty of agriculture, Food and Environment on the name of Robert H. Smith of the Hebrew University of Jerusalem for a Master of Agriculture degree. | 620<br>621<br>622<br>623<br>624 |
| 11. <i>The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes</i> . <b>Filloux A, Hachani A, Bleves S</b> . 2008, Microbiology 154:1570-1583.  | 625<br>626<br>627               |
| 12. <i>Legionella pneumophila Pathogenesis in the Galleria mellonella Infection Model</i> . <b>Harding CR, Schroeder GN, Reynolds S, Kosta A, Collins JW, Mousnier A, Frankel G</b> . 2012, Infect Immun 80:2780-2790.   | 628<br>629<br>630               |
| 13. <i>Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic Escherichia coli in a Galleria mellonella model</i> . <b>Ciesielczuk H, Betts J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, Wareham DW</b> . 2015, Virulence 6(2): 145-151.  | 631<br>632<br>633<br>634        |
| 14. <i>Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis</i> . <b>Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E</b> . 2010, Virulence 1: 475-482.   | 635<br>636<br>637               |
| 15. <i>Susceptibility of larvae of Galleria mellonella to infection by Aspergillus fumigatus is dependent upon stage of conidial germination</i> . <b>Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K</b> . 2006, Mycopathologia 161: 377–384.  | 638<br>639<br>640               |
| 16. <i>Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing</i> . <b>Jia-Yun Tsai C, Mei San Loh J, Proft T</b> . 2016, VIRULENCE 0: 1-16.  | 641<br>642<br>643               |

|  |                          |
|--|--------------------------|
| 17. <i>Molecular pathogenesis of Listeria monocytogenes in the alternative model host Galleria mellonella.</i> <b>Joyce SA, Gahan CGM.</b> 2010, <i>Microbiology</i> 156: 3456–3468.   | 644<br>645<br>646        |
| 18. <i>Galleria mellonella as an alternative infection model for Yersiniapseudotuberculosis.</i> <b>Champion OL, Cooper LAM, James SL, Ford D, Karlyshev A, Wren BW, Duffield M, Oyston PCF, Titball RW.</b> 2009, <i>Microbiology</i> 155:1516–1522.                  | 647<br>648<br>649<br>650 |
| 19. <i>The Insect Galleria mellonella as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis.</i> <b>Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D.</b> 2012, <i>JoVE</i> 10: 3791-4392.  | 651<br>652<br>653        |
| 20. <i>Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance.</i> <b>Murdock CC, Paaijmans KP, Cox-Foster D, Read AF, Thomas MB.</b> 2012, <i>Nat Rev Microbiol</i> 10: 869-876.   | 654<br>655<br>656        |
| 21. <i>Galleria mellonella as a model host to study infection by the Francisellatularensis live vaccine strain.</i> <b>Aperis G, Fuchs BB, Anderson CA, Warner JE, Calderwood SB, Mylonakis E.</b> 2007, <i>Microbes Infect</i> 9:729-734.                             | 657<br>658<br>659        |
| 22. <i>How the insect pathogen bacteria Bacillus thuringiensis and Xenorhabdus/Photorhabdus occupy their hosts.</i> <b>Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A.</b> 2012, <i>Curr Opin Microbiol</i> 15: 220-231.                            | 660<br>661<br>662<br>663 |
| 23. <i>Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for killing both insects and mammals.</i> <b>Miyashita A, Lyoda S, Lshii K, Hamamoto H, Sekimizu K, Kaito C.</b> 2012, <i>FEMS Microbiology Letters</i> 333:59-68.       | 664<br>665<br>666<br>667 |
| 24. <i>Small molecule perimeter defense in entomopathogenic bacteria.</i> <b>Crawford JM, Portmann C, Zhang X, Roeffaers MB, Clardy J.</b> 2012, <i>PNAS</i> 109:10821-10826.  | 668<br>669<br>670        |
| 25. <i>A multilayered defense against infection: combinatorial control of insect immune genes.</i> <b>Uvell H, Engström Y.</b> 2007, <i>Trends Genet.</i> 23: 342–349.   | 671<br>672               |
| 26. <i>An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes.</i> <b>Browne N, Heelan M, Kavanagh K.</b> 2013, <i>virulence</i> 4(7): 597–603.  | 673<br>674<br>675        |
| 27. <i>Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects.</i> <b>Altincicek B, Stötzel S, Wygrecka M, Preissner KT, Vilcinskas A.</b> 2008, <i>J Immunol</i> 181:2705-2712. | 676<br>677<br>678<br>679 |

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| 28. <i>Efficacy of the fourth generation cephalosporin cefquinome for the treatment of experimentally induced Escherichia coli mastitis in cows.</i> <b>Shpigel NY, Levin D, Winkler M, Saran A, Ziv G, Bottner A.</b> 1997, J. Dairy Science 80:318-323.   | 680<br>681<br>682<br>683        |
| 29. <i>Pam3CSK4/TLR2 signaling elicits neutrophil recruitment and restricts invasion of Escherichia coli P4 into mammary gland epithelial cells in a murine mastitis model.</i> <b>Mintz M, Mintz D, Ilia-Ezra R, Shpigel NY.</b> 2012, Veterinary Immunology and Immunopathology doi:p11: S0165-2427(12)00360-1.     | 684<br>685<br>686<br>687        |
| 30. <i>Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection.</i> <b>Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H.</b> 2006, Mol Syst Biol 2: 1-11.  | 688<br>689<br>690<br>691        |
| 31. <i>Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants.</i> <b>Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D.</b> 1990, Proc Natl Acad Sci U S A 87(12): 4645–4649.  | 692<br>693<br>694               |
| 32. <i>Dynamics of the type III secretion system activity of enteropathogenic Escherichia coli.</i> <b>Mills E, Baruch K, Aviv G, Nitzan M, Rosenshine I.</b> 2013, Mbio 4: e00303–e00313.  | 695<br>696<br>697               |
| 33. <i>Strategies for enhancing bioluminescent bacterial sensor performance by promoter region manipulation.</i> <b>Yagur-Kroll S, Bilic B, Belkin S.</b> 2010, Microb Biotechnol 3: 300-310.   | 698<br>699<br>700               |
| 34. <i>Genomic island 2 of Brucella melitensis is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands.</i> <b>Rajashekara G, Covert J, Petersen E, Eskra L, Splitter G.</b> 2008, Journal of bacteriology 190: 6243-6252.   | 701<br>702<br>703               |
| 35. <i>The role of type 6 secretion system as a virulence mechanism of mammary pathogenic Escherichia coli.</i> <b>Salamon H.</b> 2016, A Thesis submitted to The Faculty of agriculture, Food and Environment on the name of Robert H. Smith of the Hebrew University of Jerusalem for a PhD in Veterinary medicine. | 704<br>705<br>706<br>707<br>708 |
|   | 709                             |