

מס' המחקר	נושא המחקר
846-0301-09	בחינת הקשר בין הסטטוס החיסוני לסיכון ללקות בדלקת נמקית של הנרתיק בבקר לחלב.

שמות צוות החוקרים

מס' סדורי	שם החוקר/ת
חוקר ראשי	אלעד דניאל
1	לייטנר גבריאל
2	בלום שלמה
3	גושן תמיר

מוסד המחקר של החוקר הראשי: המכון הווטרינרי ע"ש קמרון, בית דגן
סוג הדו"ח ותקופת המחקר:

שנתי	ביניים	מסכם	התחלת המחקר	סיום המחקר
		X	2008	2009

מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח:

שם מקור המימון	קוד מקור המימון	הסכום שנתקבל עבור תקופת דיווח זה
הנהלת ענף הבקר	02-0021	84.000 ש"ח

ת ק צ י ר (אין לחרוג מגבולות המסגרת)

דלקת נמקית של נרתיק הבקר (דנ"ן) היא תסמונת אשר אובחנה לראשונה בסוף 2000 - תחילת 2001 ומהווה בעיה ייחודית לישראל. כגורם המחלה זוהה החיידק גרם שלילי, אנאארובי, בשם *Porphyromonas levii*. מבכירות הן החיות בסיכון הכי גבוה ללקות במחלה. במחקרים קודמים לובנו היבטים רבים של המחלה מבחינת הפתוגנזה, האתיולוגיה והנזקים הכלכליים להם היא גורמת. יחד עם זאת, הגורמים המסייעים (factors) (predisposing) להופעת המחלה נשארו בגדר תעלומה. המחקר הנוכחי הניח כי פגיעה במערכת החיסונית הנובעת בשינויים ועקה לקראת ההמלטה במבכירות בצירוף עם נוכחות החיידק הינה גורם סיכון מרכזי להופעת התסמונת. על מנת לבדוק את אמיתות הנחה זו נבדקו מבכירות במשק אנדמי לדנ"ן. מדדים אימונולוגיים לרבות פרופיל המטולוגי, כייל נוגדנים ייחודי לחיידק בסרום, תגובה פאגוציטארית וכושר הגבה לימפוציטארית, וכן רמות הורמון הקורטיזול בדם נבדקו במספר מועדים בין 30 יום לפני ההמלטה ועד כשבועיים אחריה. בשבוע הראשון שלאחר ההמלטה נבחנה כל מבכירה להופעת דנ"ן. נמצאו הבדלים מובהקים בחלק מהמדדים שנבחנו בין נקודות הזמן השונות, דבר המראה כי אכן חלים שינויים בבע"ח לקראת ההמלטה וכי המערכות ששימשו למחקר היו רגישות לשינויים אלו. יחד עם זאת לא נצפו הבדלים משמעותיים בין מבכירות אשר חלו לאלו אשר לא פיתחו דנ"ן אחרי ההמלטה, למעט במדדים בודדים כגון לימפוציטים CD47+. התוצאות לא מצביעות על גורם אימוני שמשפיע באופן חד משמעי על הסיכוי ללקוט בדנ"ן, אך ייתכן כי לקולטן CD47 ו-CD44 חשיבות בפתוגנזה של דנ"ן. הנתונים שנאספו ישמשו כמאגר לעבודות אימוניות עתידיות.

אישורים: חוקר ראשי:  מנהל החטיבה:  מנהל המכון: 

בחינת הקשר בין הסטאטוס החיסוני לסיכון ללקות בדלקת נמקית של הנרתיק בבקר לחלב

תכנית מחקר מס. 8451-0113-09

המועצה לענף החלב

דו"ח מסכם

דניאל אלעד – החטיבה לבקטריוLOGיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
שלמה בלום – המעבדה לאבחון בקטריאלי, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
גבריאל לייטנר – המעבדה למחלות עטין, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
אולג קריפוקס – המעבדה למחלות עטין, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
תמיר גושן – החקלאית

יולי 2010

קטעים מעבודת מחקר זו הוצגו בכנס מדעי הבקר ה-22 בירושלים:

הגדרה גנוטיפית של היידקי פורפירומונס לוי ותגובה אימונית

לדלקת נמקית של הנרתיק בבקר

ש. בלום, ג. לייטנר, א. קריפוקס, ד. דויד, ת. גשן, ד. אלעד

דלקת נמקית של נרתיק הבקר (דנ"ן) היא תסמונת אשר אובחנה לראשונה בסוף 2000 - תחילת 2001 ומהווה בעיה ייחודית לישראל. כגורם המחלה זוהה החיידק גרם שלילי, אנאארובי, בשם *Porphyromonas levii*. מבכירות הן החיות בסיכון הכי גבוה ללקות במחלה. במחקרים קודמים לובנו היבטים רבים של המחלה מבחינת הפתוגנזה, האתיולוגיה והנזקים הכלכליים להם היא גורמת. יחד עם זאת, הגורם/ים המסייעים (predisposing factors) להופעת המחלה נשארו בגדר תעלומה. המחקר הנוכחי הניח כי פגיעה במערכת החיסונית הנובעת בשינויים ועקה לקראת ההמלטה במבכירות בצירוף עם נוכחות החיידק הינה גורם סיכון מרכזי להופעת התסמונת. על מנת לבדוק את אמיתות הנחה זו נבדקו מבכירות במשק אנדמי לדנ"ן. מדדים אימונולוגיים לרבות פרופיל המטולוגי, כייל נוגדנים ייחודי לחיידק בסרום, תגובה פאגוציטארית וכושר הגבה לימפוציטארית, וכן רמות הורמון הקורטיזול בדם נבדקו במספר מועדים בין 30 יום לפני ההמלטה ועד כשבועיים אחריה. בשבוע הראשון שלאחר ההמלטה נבחנה כל מבכירה להופעת דנ"ן. נמצאו הבדלים מובהקים בחלק מהמדדים שנבחנו בין נקודות הזמן השונות, דבר המראה כי אכן חלים שינויים בבע"ח לקראת ההמלטה וכי המערכות ששימשו למחקר היו רגישות לשינויים אלו. יחד עם זאת לא נצפו הבדלים משמעותיים בין מבכירות אשר חלו לאלו אשר לא פיתחו דנ"ן אחרי ההמלטה, למעט במדדים בודדים כגון לימפוציטים CD47+. התוצאות לא מצביעות על גורם אימוני שמשפיע באופן חזק משמעי על הסיכוי ללקוט בדנ"ן, אך ייתכן כי לקולטן CD47 ו-CD44 חשיבות בפתוגנזה של דנ"ן. הנתונים שנאספו ישמשו כמאגר לעבודות אימוניות עתידיות.

Abstract

Bovine necrotic vulvovaginitis (BNVV) was first described at the end of year 2000 and the beginning of 2001. The disease is apparently unique to Israel. The gram negative anaerobic rod *Porphyromonas levii* is the pathogen associated with the disease. Primiparous cows are the animals at highest risk of developing BNVV. Previous studies clarified some of the questions regarding pathogenesis and etiology of BNVV and economical losses caused by the disease. However the predisposing factors associated with it remained unclear. In the current work we hypothesized that physiological and immunological changes and stress related to calving together with the presence of *P. levii* are predisposing factors to BNVV development. In order to study this hypothesis, primiparous cows from a BNVV endemic dairy farm were examined for various hematologic and immunologic factors four to five times in the period between 30 days before calving to two weeks afterwards. Animals were examined clinically in the first week after calving for development of BNVV. Statistically significant differences were found in some of the parameters studied between the different time points, showing that indeed immunologic changes do occur around calving time, and that the methods used could detect them. Nevertheless, no significant differences were found between healthy and sick animals, except for CD47+ lymphocytes. CD44 and CD47 seem to be important in the pathogenesis of BNVV, although their exact role still needs to be clarified. The data collected will be used in future research of the immune system of cows around the calving period.

התפרצויות של דלקת נמקית של נרתיק (דנ"ן) הבקר הוא תסמונת אשר אובחנו לראשונה בסוף 2000 ותחילת 2001 והן מהוות בעיה ייחודית לישראל אשר לא תוארה עדיין בארצות אחרות. התסמונת מאופיינת בהופעת נגעים נמקיים בנרתיק, בין הבושת לצוואר הרחם. בהמשך אובחנה המחלה כבתריסר משקי חלב נוספים ברחבי הארץ (עם נטייה מסוימת להיארעות גבוהה יותר בצפון). הרקע האפידמיולוגי והמאפיינים הקליניים לא היו אחידים בכל המשקים אך בלטה העובדה כי ההתפרצויות הופיעו לאחר הכנסת מספר גדול של פרות במסגרת הרפורמה במשק החלב או קניה. מספר משקי חלב הפכו לאנדמיים למחלה, והיא ממשיכה לפגוע במבכירות למרות שהשפעת ערבוב החיות הייתה אמורה לפוג זה מכבר. החיות בסיכון גבוה הן המבכירות. פרות נפגעו במספר נמוך יחסית. בחלק מהמקרים נפגעו הפרות שהועברו יותר מאשר הפרות המקומיות אך במקרים אחרים לא היה הבדל בין שתי האוכלוסיות. הנגעים הנמקיים מתפתחים במקומות בהן נפצעה הרקמה בזמן ההמלטה ומופיעים לכן בשבוע הראשון לאחריה. משך המחלה משתנה, אך במרבית המקרים הנגעים נעלמים תוך מספר שבועות. יחד עם זאת, עלולים להופיע סיבוכים בצורת דלקת רחם ודלקת צפק אשר עלולות להסתיים במות הפרה. שטיפות מקומיות בתכשירים אנטיספטיים כמו גם טיפולים אנטיביוטיים לא היו לכאורה יעילים. מעבר לנזקים הישירים, הסתבר כי למחלה גם השלכות כלכליות (17) והשלכות לטווח ארוך עקב ירידה בפוריות (תוספת ממוצעת של 30 ימי ריק) (1).

באשר לגורם הזיהום, הסתבר כבר במקרים הראשונים כי מדובר בחיידק גרם שלילי, אנאארובי – *Porphyromonas levii* אשר מזהם את פצעי ההמלטה וגורם לנמק. נמצא קשר הדוק לא רק בין בידוד החיידק לנגעים אלא גם קשר כמותי בין חומרתן למספר החיידקים. יחד עם זאת מדובר בחיידק הנחשב כפתוגן מזדמן (opportunistic) ולכן נעשה מאמץ לזהות גורמי סיכון אשר יאפשרו לחיידק להתרבות בפצעי ההמלטה בפרות מסוימות ולגרום לנגעים האופייניים בזמן שבפרות אחרות, פצעי ההמלטה מחלימים ללא סיבוכים נוספים. הועלתה האפשרות כי זיהום נגיפי ראשוני, בנגיפי הרפס 1 או 4, הוא הגורם המסייע לשגשוג החיידק. בהמשך הסתבר כי התסמונת הופיעה גם במשקים בהם נגיפים אלה אינם נמצאים (2) (ולפחות במקרה אחד, התופעה הפכה לאנדמית). לאור ממצאים אלה סביר להניח כי חוסר היכולת למנוע את יישוב פצעי ההמלטה ע"י *P. levii* ולסלקו לפני הופעת הנמק, קשורה בכשל התגובה החיסונית של הפרה. כשל זה יכול לנבוע משילוב של גורמי עקה הקשורה בהובלה, מאבקי היררכיה ובהמלטה ראשונה. יחד עם זאת, במקרים מסוימים בהם המחלה הפכה להיות אנדמית, אין די

בהסבר זה וייתכן כי קיימים גורמי סיכון נוספים להופעת התסמונת. היות וגורמים אלה יכולים להיות קשורים למערכת החיסונית מן הראוי לבחון את הסטאטוס החיסוני סביב ההמלטה. Burton ושות' הראו כי הירידה בתגובה החיסונית, כפי שהיא התבטאה בתפקוד תאים ניאטרופילים, חריפה יותר במבכירות מאשר בפרות ואף הוכיחו כי תופעה זו קשורה לעקת ההמלטה (3, 4). בכוונתנו לנסות לתת מענה לשאלת הקשר שבין תפקוד המערכת החיסונית להופעת דנ"ן בשיטות דומות.

בריאות ורווחת (well-being) בעלי חיים במשק האינטינסיבי מושפעת רבות מתנאים חיצוניים, בעקר תנאי ממשק ומזג אוויר וכן ממצב פרטני כגון הריון, גיל וכו'. בנוסף לגורמים אלו, בעלי החיים יכולים לסבול מנגיעות תת-קלינית בגורמים פתוגניים שונים המשפיעים על מערכת החיסון. גורמים אלו יכולים לגרום למצבי עקה (stress) בדרך ישירה או עקיפה. עקה מוגדרת כתגובת הגוף למגוון של גירויים פסיקליים ורגשיים המסכנים את המצב ההומאוסטטי (homeostasis). באופן כללי ניתן לראות שני סוגים של עקה - אקוטי וקרוני. במצבים של עקה אקוטית, תגובת בעל החיים בדרך כלל קצרה (short-term) והחזרה למצב שלפני העקה חלה עם הוצאת גורם העקה. לעומתה, עקה כרונית (long-term), היא בעלת יכולת פגיעה מתמשכת במערכות שונות בגוף כולל במערכת החיסונית. מחקרים רבים הקשורים להשפעת עקה כרונית בבני אדם, חיות מעבדה וחיות משק, הצביעו על אפקט של כשל חיסוני (immunosuppressive effects) במרכיבים רבים של המערכת החיסונית ואשר כתוצאה מכך עלה אחוז התחלואה והתמותה מגורמים אלימים כגון חיידקים ונגיפים. דרך הפעילות המדויקת של מצבי העקה על המערכות השונות כולל המערכת החיסונית אינם מוגדרים באופן מדויק. אחד המנגנונים שהוצעו קשור לעליה ביצור והפרשה של הורמון האדרינוקורטיקורופין [adrenocorticotrophic hormone (ACTH)] המשפיע על יצור והפרשה של הורמון הקורטיסול (cortisol) בעל יכולת השפעה מדכאת על המערכת החיסונית. יחד עם זאת קיים קושי רב בקביעת רמות "נורמה" ובבעלי חיים בריאים רבים נמצאו רמות גבוהות של קורטיסול ללא ההשפעה המדכאת. Moberg (11) הציע כי על מנת לקבוע אם בעל חיים סובל ממצב של עקה, יש לקבוע מדדים למצב של pre-pathological state (גורמי עקה כמונחים ביולוגים המסכנים את בריאות בעל החיים). כשל חיסוני הייתה הדוגמה למצב זה.

גורמי ממשק ותזונה יכולים גם הם להוביל לפגיעה במערכת החיסונית ולעליה במספר דלקות העטין כתוצאה מכך. לדוגמה חוסר איזון בויטמין E וסלניום פוגע בתנועתיות מושרית הכימוטקסיס ובתפקוד

נואטרופיליים (5,8,12,13). חוסר איזון תזונתי בגורמים אלו נמצא במתאם עם עליה במספר דלקות העטין (14,16). פגיעה במערכת החיסונית יכולה לנבוע כתוצאה מהדבקה ויראלית. לוקמיה של הבקר (Bovine leukemia virus - BLV), גורם לפגיעה הן במערכת ההומורלית והן בזו התאית (15). בפרות גזעות בוירוס זה נמצאה הפחתה בתאים יוצרי נוגדנים מסוג IgM, ירידה בתאי T הנושאים קולטן ל CD4 בדם הפריפרי והפחתה בתגובה לחשיפה של אנטיגנים (6). פגיעה במערכת החיסונית על מרכיביה נמצאה במתאם עם עליה בתחלואה (BLV).

מטרת המחקר הייתה להגדיר את הסטאטוס החיסוני של מבכירות סביב ההמלטה ולבחון את הקשר בין סטאטוס זה להופעת דלקת נמקית של הנרתיק, חומרתה ומשכה.

חומרים ושיטות

1. חיות ומהלך הניסוי:

המחקר כלל 38 מבכירות במשק אחד הידוע כמשק גזע אנדמית במחלה. המבכירות הוכנסו לניסוי כ-30 ימים לפני ההמלטה הצפויה בתת קבוצות של 4-7 מבכירות. דוגמאות דם נלקחו מכל מבכירה 2-4 פעמים לפני ההמלטה, מיד לאחר ההמלטה (2-4 ימים) וכן כשבועיים מאוחר יותר. בנוסף, נאסף מכל מבכירה קולוסטרום ראשוני. בשבוע הראשון לאחר ההמלטה, נבדקה הבושת והנרתיק ע"י הרופא המטפל, ונקבע הדירוג הדני"ן הקליני של המבכירה. הדירוג התבסס על חומרת והיקף הפצעים וכלל ארבע רמות: 0 – ללא נגעים, 1 – פצע עד כ-25% מהיקף הנרתיק, 2 – פצע בין כ-25% עד 50% של הנרתיק ו-3 – יותר מ-50% מהיקף הנרתיק נגוע. נלקחו גם מושי נרתיק אחרי ההמלטה עבור בדיקה בקטריולוגית בשיטות שתוארו בעבר (7).

2. המטולוגיה. אנדוקרינולוגיה ובדיקות אימונולוגיות:

הפרופיל ההמטולוגי (ספירה כללית ומבדלת, פרופיל ביוכימי וכו') של כל דוגמה נבחן במעבדה לביוכימיה במכון הווטרנרי. בדיקת קורטיזול בוצעה במעבדה לאנדוקרינולוגיה במכון הווטרנרי באמצעות ערכה מסחרית (DRG Instruments GmbH, Germany) אחרי מיצוי בקולונות.

התפלגות התאים הלבנים בדם והצגת קולטנים על התאים (עוצמת הזריחה) נבחנו באמצעות נוגדנים חד-שבטיים וקריאה ב-FACS בדם הטרי (ביקורת) ולאחר שפעול התאים באמצעות LPS, כפי שתואר בעבר (9). הקולטנים שנבדקו לפני שפעול התאים היו: CD4, CD8, CD47, CD62, CD44, CD49, CD21, CD14, G1, CD18, ואחרי השפעול: CD47, CD62, CD18, G1, CD49, CD44, CD14. קולטנים אלו נבחרו בהיותם קשורים בהצמדות תאים לאנדוטל ומעברם לאזור נגוע בפתוגן.

רמת ה-IgA ו-IgG נבחנו בקולוסטרומ. המבחן בוצע באמצעות נוגדנים חד-שבטיים במערכת ELISA מסחרית (Bethyl, Montgomery, TX, US).

פעילות כושר בליעת חיידקים (פאגוציטוזה) התאים הבלענים בדם (נאוטרופילים והמונוציטים) והרג חיידקים נבחנה באמצעות מכשיר ה-FACS וספירת CFU, בהתאמה. פעילות בלענית נבדק עם חיידקי *P. levii* מומתים וחיידקי *E. coli* חיים מסומנים ב-FITC בעזרת FACS. תאי דם שלם נשטפו פעמיים להוצאת הנסיוב. בהמשך, התאים השטופים הודגרו יחד עם אחד החיידקים הנ"ל, ביחס של כ-10 חיידקים לתא אחד, ב-37 מ"צ ואווירה מועשרת ב-CO₂. דוגמאות נלקחו בזמן "אפס" וכל 15 דקות, עד שעה הדגרה. פעילות הבלענית הופסקה לאחר הדיגום ע"י הדגרה בקרח. בופר המוליטי שמש להרס של הכדוריות האדומות, ולאחר שטיפה נוספת הדוגמאות נקראו במכשיר ה-FACS. לאחר קריאה ראשונה, נמדדה הצמדות חיצונית של חיידקים אל דופן התאים יחד עם בליעתם, הדוגמאות טופלו עם Ethidium Bromide; (חומר זה אינו חודר אל תוך תאים "המוגנים" ע"י התא כך שרק חיידקים הצמודים חיצונית על גבי התאים יפסיקו לזהור ואלה שנבלעו ממשיכים לזהור). לכן, הקריאה השנייה במכשיר ה-FACS מדדה פעילות פאגוציטרית בלבד. כושר הריגה של חיידקים נבדק ע"י הדגרה של תאי דם שלם שטופים עם חיידקי *E. coli* חיים ביחס של כחיידק אחד לכל תא. תאים וחיידקים הודגרו ב-37 מ"צ ואווירה עשירה ב-CO₂ ל-30 דקות וספירת CFU בוצע בזמן "אפס" ולאחר 30 דקות. אחוז ההרג חושב: מספר CFU בזמן "אפס" פחות מספר CFU אחרי ההדגרה עם תאי הדם.

יכולת לימפוציטים להגיב למיטוגן נבחנה באמצעות פרוליפרציה וסימון בתימידין רדיואקטיבי כפי שתואר

בעבר (12).

3. סטטיסטיקה:

מבחנים סטטיסטיים בוצעו במערכת JMP (SAS Institute, 2000) בשיטות המתוארות בנספח א'.

שלושים ושמונה המבכירות שנבחנו חולקו לשתי קבוצות: 20 מבכירות שנמצאו עם התסמונת ו - 18 ללא סימנים. 20 המבכירות עם התסמונת חולקו לשלוש קבוצות על פי רמות הפגיעה: 1- 7 מבכירות, 2- 5 מבכירות, 3- 3 מבכירות. הניתוח בוצע בין שתי הקבוצות וכן בהתייחסות לרמת הפגיעה. בהכללה נמצאה שונות גדולה ברוב המדדים שנבחנו ברמת הפרט אשר מסכה את הניתוח בין קבוצת (1 בריאות, 2 חולות) ועל כן הניתוח בהמשך בוצע ברמת קבוצה עם וללא תסמונת. טבלה 1 (נספח ב'), מסכמת שני ניתוחים של כלל המדדים שנבחנו בהתייחסות לשתי הקבוצות, חולות ובריאות וכן לימי הדיגום בקשר לתאריך ההמלטה (ניתוח 1) ובקבוצת החולות, לרמת המחלה (ניתוח 2).

טבלה 2, מסכמת את ממצאי ההמטולוגיה בשלושה פרקי זמן, שניים לפני ההמלטה (עד 20 יום, בין 8 ימים ליום) ואחד לאחריה (יום עד שבע ימים). לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות בכמות כדוריות הדם האדומות (RBC) אך יחד עם זאת המגמה לקראת המלטה ובשבוע הראשון הייתה שלילית, משמע חלה ירדה במספר הכדוריות. בשונה, חלה עליה הן בבריאות והן בחולות במספר כדוריות הלבנות (WBC) לקראת ואחרי ההמלטה. בהתפלגות התאים הלבנים לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות ובשתייהן חלה עליה באחוז ה-PMN (פולימורפונוקליארים) וירדה באחוז הלימפוציטים לקראת ההמלטה ואחריה. בנוסף חלה עליה באחוז המונוציטים לאחר ההמלטה.

טבלה 1. ממוצע וסטית התקן של ממצאי ההמטולוגיה בשלושה פרקי זמן, שנים לפני ההמלטה (עד 20 יום, 8 ימים ליום) ואחד לאחריה (יום עד שבע ימים) בנפרד לקבוצת המבכירות ללא תסמונת ואלו עם תסמונת הדני".

P [F] 1x2	2 - חולות עם תסמונת דני"			1 - בריאות ללא תסמונת			מדד
	1-7 אחרי	8-1 לפני	> 20 לפני	1-7 אחרי	8-1 לפני	> 20 לפני	
NS	6.89±0.74	7.42±0.61	7.51±0.62	6.89±0.52	7.00±0.54	7.13±0.66	RBC (10 ⁶)
NS	13.23±6.79	13.26±2.19	10.35±1.25	12.10±4.75	11.78±2.73	9.64±1.88	WBC (10 ³)
NS	40±2	46±9	29±6	42±2	41±7	30±6	PMN (%)
NS	43±2	44±8	59±6	45±1	47±8	60±6	Lymp. (%)
NS	13±0.6	7±0.2	7±0.2	10±0.3	7±0.3	7±0.2	Mo (%)

RBC, כדוריות דם אדומות; WBC, תאי דם לבנים; Lymp, לימפוציטים; Mo, מונוציטים.

ממצאי פעילות התאים הלבנים בשלושה פרקי זמן, שניים לפני ההמלטה (עד 20 יום, 8 ימים ליום) ואחד לאחריה (יום עד שבע ימים) מוצגים בטבלה 3. לא נמצאו הבדלים בין הקבוצות וכן במועדים השונים ביכולת התאים הבלעניים לבצע תהליך היצמדות, בליעה והרג של חיידקי א. קולי. יחד עם זאת בקבוצת הפרות החולות בצפתה ירידה של הצמדות ובליעת חיידקים במבחנה לאחר ההמלטה אך ירדה זו לא באה לידי ביטוי במבחן ההרג. בממוצע עמד אחוז ההרג במשך שעה על 70% ומעלה. במדד שיכפול לימפוציטים מסוג T אחרי חשיפה למיטוגן אובחנה ירדה סביב ההמלטה בשתי קבוצות המבכירות וירדה זו נמצאה חזקה יותר במבכירות החולות מאשר בבריאות.

טבלה 2. ממוצע וסטית התקן של ממצאי פעילות התאים הלבנים: הצמדות + בליעה של חיידקי א. קולי במבחנה (FACS), הרג חיידקי א. קולי במבחנה (CFU), ותגובה שיכפול של לימפוציטים למטוגן (Con A), בשלושה פרקי זמן, שנים לפני ההמלטה (עד 20 יום, 8 ימים ליום) ואחד לאחריה (יום עד שבע ימים) בנפרד לקבוצת המבכירות ללא תסמונת ואלו עם תסמונת הדני.

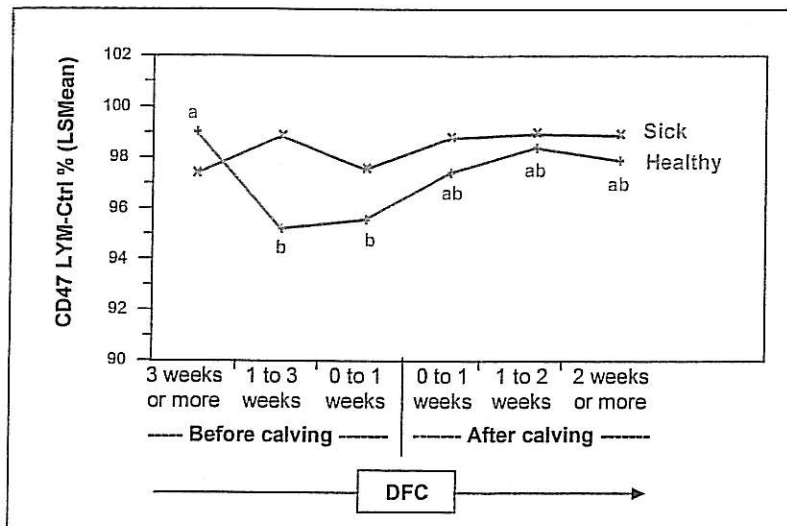
P [F] 1x2	2 - חולות עם תסמונת דני			1 - בריאות ללא תסמונת			מדד
	7-1 אחרי	1-8 לפני	>20 לפני	7-1 אחרי	1-8 לפני	>20 לפני	
NS	45.33±20	58.67±18	69.10±12	60.71±25	58.38±23	59.27±25	% הצמדות + בליעה (30 דקות)
NS	78.19±31	89.15±14	79.81±15	71.60±27	85.29±11	71.06±32	% הרג (60 דקות)
0.09	14.4±7.2	27.8±10.2	64.5±30.7	24.1±12.5	30.2±16.3	44.7±28.4	פרוליפרציה (אינדקס)

לא נמצאו הבדלים משמעותיים ברמה הקורטיזול בין נקודות הזמן השונות ובין חולות ובריאות. בממוצע הרמה הייתה 27.3 ± 6.4 ng/mL. כמו כן, לא נמצאו הבדלים משמעותיים באחוזי התאים נשאי הקולטנים שנבחנו, ללא הדגרה ולאחר שפעול עם LPS, בין מבכירות בריאות וחולות וכן בהקשר לרמת המחלה (טבלה 1, נספח א'). לאור תוצאות אלו התייחסות מעמיקה יותר לתוצאות בוצעה רק לגבי אותם המדדים אשר נמצאו מובהקים או על גבול המובהקות. תוצאות הניתוח הסטטיסטי הזה נמצאות בנספח ב'.

ניתן היה לצפות כי ברוב המדדים האימונולוגיים שנבחנו יחול שינוי, בעיקר ירדה, לקראת ההמלטה

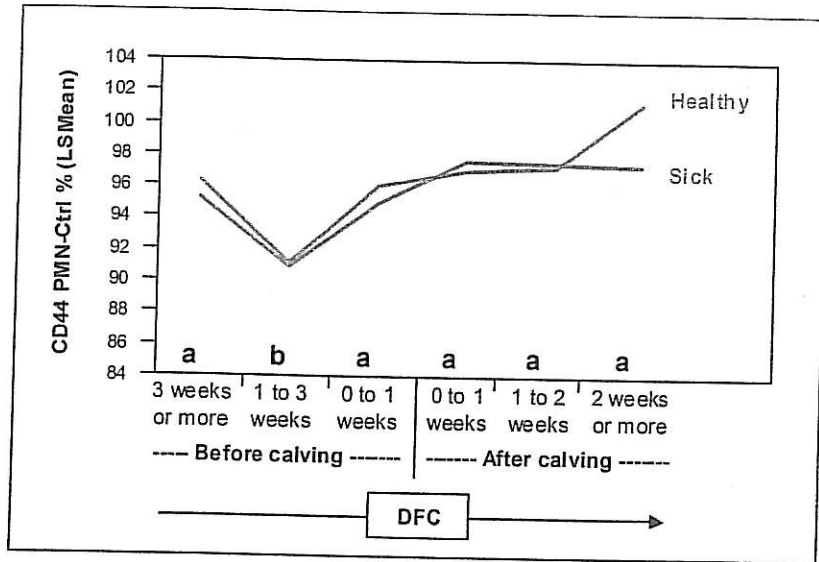
כתוצאה מכניסת בעל החיים בסוף ההיריון למצב של דיכוי חיסוני. ניתוח אחד הקולטנים, CD47 על גבי לימפוציטים (אחוז הלימפוציטים נושאי הקולטן - $CD47\ LYM\ \%$) מראה תופעה זו (גרף 1, נספח ב'). בבריאות חלה ירדה משמעותית לקראת ההמלטה וחזרה לרמה נורמאלית כשבועיים לאחר ההמלטה. לגבי קולטן זה, נמצא כי לא חלה ירדה ורמת הקולטן נשארה יציבה במבכירות החולות.

גרף 1: קשר בין disease status וימים מההמלטה ($P = 0.0095$)



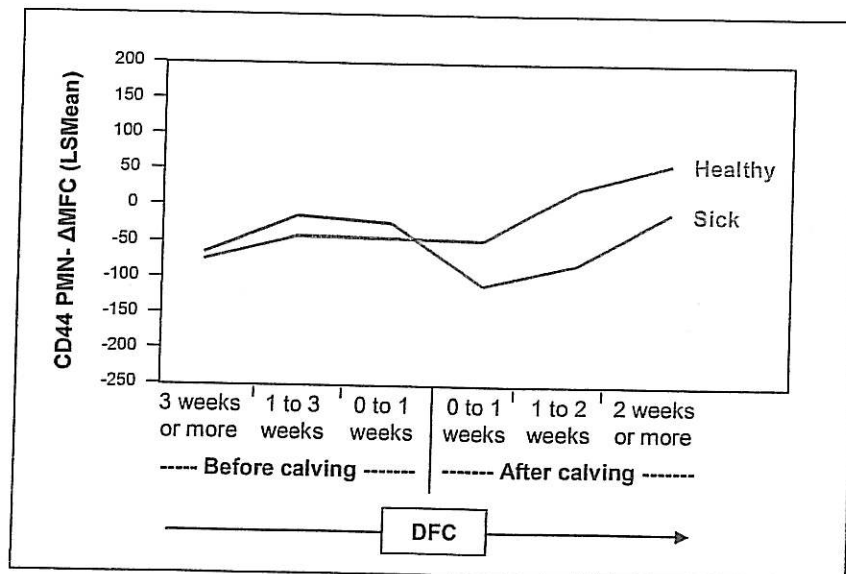
בדומה לקולטן זה ניתוח של קולטן $CD44^+$ על גבי PMN ($CD44\ PMN\ \%$) הראה כי חלה ירדה באחוז התאים נושאי הקולטן בכל המבכירות לקראת ההמלטה, וחזרה לרמה נורמאלית מיד לאחר ההמלטה (גרף 2 ונספח ב').

גרף 2: קשר בין disease status וימים מההמלטה ($P = 0.9635$)



בבחינת התגובה לשפעול $CD44^+$ על גבי PMN עם LPS (ΔMFC - $CD44$ PMN) נמצא הבדל ב- ΔMFC (מדמה מספר קולטנים/תא אשר עברו שפעול). עוצמת התגובה במבכירות חולות הייתה גבוהה מזו של הבריאות. הבדלים אלו נמצאו על גבול המובהקות ($P = 0.059$, גרף 3 ונספח ב').

גרף 3: קשר בין disease status וימים מההמלטה ($P = 0.2429$)



תוצאות עבודה זו אינן חד משמעיות לאור העובדה כי נמצא שונות גדולה בין הפרטים ללא קשר לתחלואה. בנוסף לכך, בעבודה מקבילה בהתייחסות למחלה, אשר בוצעה על ידינו, נמצא כי מבכירות רבות אשר

אינן חיוביות ואינן נושאת נוגדנים ייחודיים לחיידק לפני ההמלטה ולא הראו או אובחנו עם סמנים מיד לאחריה, חל היפוך סרולוגי והן נמצאו חיוביות כשבוע לאחר ההמלטה. תוצאות אלו מציעות כי מספר המבכירות החולות, אולי בצורה סמויה, יתכן וגבוה יותר מזה שנמצא בניסוי הנוכחי. הסבר נוסף לשונות הגבוהה נעוץ בעובדה כי לקראת ההמלטה חלים שינויים משמעותיים, הורמונאליים, פיסיוולוגיים וחיסוניים. אכן נמצאו הבדלים מובהקים סטטיסטית במדדים שונים ביחס לימים מהמלטה. דיכוי חיסוני זה מקשה על מציאת נקודת חיתוך בו בעלי החיים נמצאים בסיכון מוגבר. חוסר הבדלים משמעותיים לפני ההמלטה לגבי תחלואה זו באים לידי ביטוי בתוצאות שהתקבלו לאחר ההמלטה במדדים החיסוניים. גם בתקופה זו נמצאו הבדלים מועטים וברובם לא משמעותיים בין המבכירות החולות והבריאות. משמעות תוצאות אלו היא כי השפעת המחלה על הפרה יחסית מינורית וללא זיהום נוסף וטיפול נכון השפעת המחלה נמוכה וקצרה. גם לגבי אותם המדדים אשר הראו הבדלים מובהקים במבחן הסטטיסטי, ההבדלים בין הקבוצה שחלתה וזו שלא חלתה היו קטנים יחסית (הפרשים של אחוזים בודדים). בנוסף, במבחן הסטטיסטי שהתייחס לדרגת החומרה של המחלה, מספר הנתונים בנקודת זמן מסוימת לדרגת חומרה מסוימת קטן מאוד בחלק מהמקרים. לכן החשיבות שניתן לייחס לתוצאות המבחן הסטטיסטי מוגבלת. קושי נוסף שנמצא במודל המחקרי ששימש לעבודה זו (דיגום פעם בשבוע) מתייחס לפרקי זמני הדיגום בין הפריטים: נקודת הזמן "מיד לפני ההמלטה" מורכבת מחיות אשר נדגמו בין שבוע ויום אחד לפני ההמלטה. לצורך המבחן הסטטיסטי הנתונים האלו קובצו בנקודת זמן אחת, אך ברור כי ניתן לצפות להבדלים משמעותיים בפרק זמן של שבוע לקראת ההמלטה. כנ"ל לגבי נקודת הזמן "מיד אחרי" ההמלטה.

לאור הכתוב לעיל אמנם קשה להצביע על מרכיב אחד מבין אלו שנבדקו אשר משפיע באופן חזק משמעי על הסיכויים ללקוט בדנ"ן. אך ייתכן כי ל-CD47 על גבי לימפוציטים חשיבות בפתוגנזה של המחלה. קולטן CD47 הינו מרכיב חשוב בהיצמדות תאי מערכת החיסון אל אנדותל ובעברם מהדם אל הרקמה המודלקת. לא ניתן להסיק מה המשמעות של ההבדלים עם הנתונים הקיימים, אבל ייתכן שנוכל להשתמש בקולטן הזה כסמן לתחזית לגבי סיכוי להופעת דנ"ן בעגלה. על מנת לאמת את הממצא הזה נדרש ניסוי נוסף ממוקד ובמספר גדול יותר של פריטים. בנוסף, ייתכן כי גם לקולטן CD44 על גבי PMN חשיבות מסוימת בפתוגנזה של דנ"ן. אמנם לפני ההמלטה ניתן היה לראות ירידה במספר ה-PMN שנושאים קולטן זה בצורה דומה הן בחיות אשר חלו והן באלו אשר לא חלו, אבל אחרי ההמלטה ישנה מגמה שונה בין שתי הקבוצות באשר לשפעול קולטן זה על התאים (נמדד ע"י דלתה MFC). ההבדל הוא מגמתי בלבד ואין לו מובהקות סטטיסטית, אך ייתכן כי חיות חולות סובלות מפגיעה

במנגנון השפועול בעקבות המחלה או כי נמצאים בדם בחיות אלו תאי PMN משופעלים בכמות גדולה אשר לא הגיבו בבדיקה במעבדה.

סיכום

לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין חיות בריאות ואלו אשר חלו. הסיבה שהחייזק גורם להתפרצות דנ"ן בחלק מהמשקים ובאותם המשקים רק בחלק מבעלי החיים, וזאת למרות הימצאותו גם במשקים בהן לא אובחנה המחלה, נשארה לא ברור. יחד עם זאת, הקמת מערך בדיקות היסוניות בבעל החיים השלם מאפשר ויאפשר בעתיד לבחון מצבי עקה ו/או מחלות נוספות בהן יתכן והפגיעה במערכת החיסון.

רשימת ספרות מצוטטת ספציפית לנושא ופרסומים רלוונטיים של צוות החוקרים

1. Blum S, Mazuz M, Brenner J, Friedgut O, Koren O, Goshen T, Elad D. Effects of bovine necrotic vulvovaginitis on productivity in a dairy herd in Israel. Vet. J. Accepted.
2. Blum S, Mazuz M, Brenner J, Friedgut O, Stram Y, Koren O, Goshen T, Elad D. Sample-based assessment of the microbial etiology of Bovine Necrotic Vulvovaginitis. Theriogenology. Submitted.
3. Burton JL, Kehrl ME Jr. (1995). Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of *Staphylococcus aureus* in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. Am J Vet Res. 56:997-1006.
4. Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PS, Buckham KR, van Dorp R, Hickey MC, Earley B. (2005). Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows. Vet Immunol Immunopathol. 105:197-219.
5. Boyne, R. and Arthur, J.R. 1981. Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle. J. Comp. Path. 91:271-276.

6. Emanuelson, U., Scherling, K. and Petterson, H. 1992. Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 12:121-131.
7. Elad D, Friedgut O, Alpert N, Stram Y, Lahav D, Tiomkin D, Avramson M, Grinberg K, Bernstein M. (2004) Bovine necrotic vulvovaginitis associated with *Porphyromonas levii*. *Emerging Infectious Diseases.* 10:505-507.
8. Erskine, R.J., Ebertart, R.J., Grasso, P.J. and Scholz, R.W. 1989. Induction of *Escherichia coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diets. *Am. J. Vet. Res.* 50:2093-2100.
9. Leitner, G., Krifucks, O., Younis, A., Heller, E.D., Saran, A. 2002. Influence of *Staphylococcus aureus* exosecretions isolated from bovine mastitis on leukocyte activity *in vitro*. *J. Vet. Med. B,* 49: 354-360.
10. Madsen SA, Weber PS, Burton JL. (2002). Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 86:159-175.
11. Moberg, P.G. 1987. A model for assessing the impact of behavioral stress on domestic animals. *J. Anim. Sci.* 65:1228-1235.
12. Ndiweni, N. and Finch, J.M. 1996. Effects of *in vitro* supplementation with α -tocopherol and selenium on bovine neutrophil function: implication for resistance to mastitis. *Vet. Immun. Immunopathol.* 51:67-78.
13. Politis, I., Hidioglou, M., White, J.H., Gilmore, J.A., Williams, S.N., Scherf, H. and Frigg, M. 1996. Effects of vitamin E on mammary and blood leukocyte function, with emphasis on chemotaxis, in periparturient dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57:468-471. .
14. Smith, K.L., Harrison, J.H., Hancock, D.D., Todhunter, D.A. and Conrad, H.R. 1984. Effects of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.* 67:1293-1300.

15. Trainin Z., Brenner, J., Meirom, R. and Ungar-Waron, H. 1996. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. *Vet. Immunol. Immunopath.* 54:293-302.1
16. Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L. and Hoblet, K.H. 1990. Relationships among selenium, vitamin E, and mammary gland health in commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 73:381-390.
17. Yeruham I, Tiomkin D, Friedgut O, VanHam M, Perl S, Elad D. (2007) Bovine necrotic vulvovaginitis in dairy cattle herds. *Vet. Rec.* 160:164-166.

טבלה 1: תוצאות הניתוח הסטטיסטי המלא ברמת הופעת או היעדרות מחלה וביחס לימים ל עד או מההמלטה (ניתוח 1) וביחס לדרגת המחלה (ניתוח 2).

Variables	ניתוח 1			
	n	R2	Disease (0 or 1)	Days from calving* (DFC)
RBC	87	0.81	NS	<.0001
MCV	87	0.90	NS	0.0004
HCT	87	0.73	NS	<.0001
Hgb	87	0.76	NS	<.0001
WBC	130	0.52	NS	<.0001
Platelets	87	0.52	NS	0.0007
NEUT	130	0.53	NS	<.0001
%NEUT	130	0.62	NS	<.0001
LYM	130	0.80	NS	<.0001
%LYM	130	0.69	NS	<.0001
MON	130	0.65	NS	<.0001
%MON	130	0.63	NS	<.0001
%Killing	123	0.72	NS	0.0017
Adh 30	121	0.85	NS	NS
Pha 30	112	0.86	NS	NS
Proliferation ConA	94	0.72	NS	0.0084
Serum cortisol ng/mL	97	0.59	NS	NS
CD44 PMN %	129	0.28	NS	NS
CD44 PMN - MFC	126	0.55	NS	0.0400
CD44 PMN - Delta%	130	0.36	NS	NS
CD44 PMN - Delta MFC	130	0.33	NS	NS
CD44 LYM - %	129	0.69	NS	<.0001
CD44 LYM - MFC	129	0.61	NS	NS
CD44 LYM - Delta %	130	0.29	NS	NS
CD44 LYM - Delta MFC	130	0.36	NS	NS
CD44 MON - %	129	0.63	NS	<.0001
CD44 MON - MFC	129	0.46	NS	0.044
CD44 MON - Delta %	130	0.31	NS	NS
CD44 MON - Delta MFC	130	0.37	NS	NS
CD49 PMN - %	43	0.48	NS	NS
CD49 PMN - MFC	43	0.52	NS	NS
CD49 PMN - Delta %	43	0.43	NS	NS
CD49 PMN - Delta MFC	43	0.32	NS	NS

CD49 LYM - %	130	0.57	NS	0.0008
CD49 LYM - MFC	130	0.84	NS	NS
CD49 LYM - Delta %	130	0.37	NS	NS
CD49 LYM - Delta MFC	130	0.32	NS	NS
CD49 MON - %	130	0.49	NS	<.0001
CD49 MON - MFC	130	0.79	NS	NS
CD49 MON - Delta %	130	0.41	NS	NS
CD49 MON - Delta MFC	130	0.27	NS	NS
CD14 MON - %	130	0.71	NS	<.0001
CD14 MON - MFC	130	0.59	NS	NS
CD14 MON - Delta %	130	0.34	NS	NS
CD14 MON - Delta MFC	129	0.34	NS	NS
CD18 PMN - %	130	0.34	NS	NS
CD18 PMN - MFC	130	0.51	NS	NS
CD18 PMN - Delta %	130	0.24	NS	NS
CD18 PMN - Delta MFC	130	0.50	NS	0.0299
CD18 LYM - %	130	0.34	NS	0.0097
CD18 LYM - MFC	130	0.57	NS	NS
CD18 LYM - Delta %	130	0.20	NS	NS
CD18 LYM - Delta MFC	130	0.28	NS	NS
CD18 MON - %	130	0.41	NS	0.0436
CD18 MON - MFC	130	0.56	NS	NS
CD18 MON - Delta %	130	0.27	NS	NS
CD18 MON - Delta MFC	130	0.30	NS	NS
CD21 LYM - %	130	0.50	NS	NS
CD21 LYM - MFC	122	0.40	NS	NS
CD8 LYM - %	130	0.65	NS	0.0083
CD8 LYM - MFC	130	0.64	NS	NS
CD4 LYM - %	130	0.73	NS	0.0334
CD4 LYM - MFC	130	0.67	NS	<.0001
CD47 PMN - %	130	0.44	0.0152	0.0001
CD47 PMN - MFC	130	0.56	NS	0.0082
CD47 PMN - Delta %	130	0.45	0.0323	<.0001
CD47 PMN - Delta MFC	130	0.49	NS	0.0267
CD47 LYM - %	130	0.69	NS	NS
CD47 LYM - MFC	130	0.62	NS	0.0081
CD47 LYM - Delta %	130	0.48	NS	0.0422
CD47 LYM - Delta MFC	130	0.52	0.0309	0.0002
CD47 MON - %	130	0.36	NS	NS
CD47 MON - MFC	130	0.62	NS	<.0001
CD47 MON - Delta %	130	0.34	NS	NS
CD47 MON - Delta MFC	130	0.49	NS	0.023
CD62 PMN - %	130	0.35	NS	NS
CD62 PMN - MFC	106	0.63	NS	NS
CD62 PMN - Delta %	130	0.29	NS	NS
CD62 PMN - Delta MFC	130	0.35	NS	NS
CD62 LYM - %	130	0.53	NS	<.0001
CD62 LYM - MFC	106	0.63	NS	NS

CD62 LYM - Delta %	130	0.56	NS	<.0001
CD62 LYM - Delta MFC	130	0.25	NS	NS
CD62 MON - %	130	0.47	NS	<.0001
CD62 MON - MFC	106	0.55	NS	NS
CD62 MON - Delta %	130	0.38	NS	NS
CD62 MON - Delta MFC	130	0.29	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - %	130	0.49	NS	<.0001
CD47+CD62+ LYM - MFC	130	0.58	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - MFC	130	0.60	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - Delta %	130	0.53	NS	<.0001
CD47+CD62+ LYM Delta MFC	130	0.32	0.0073	0.0039
CD47+CD62+ LYM Delta MFC	130	0.27	NS	NS
CD47+CD62+ MON - %	130	0.54	0.0125	NS
CD47+CD62+ MON - MFC	130	0.61	NS	<.0001
CD47+CD62+ MON - MFC	130	0.64	NS	NS
CD47+CD62+ MON - Delta %	130	0.42	NS	0.0061
CD47+CD62+ MON Delta MFC	130	0.51	NS	0.0021
CD47+CD62+ MON Delta MFC	130	0.26	NS	NS
CD4+CD47+ LYM - %	130	0.76	NS	0.014
CD4+CD47+ LYM - MFC	130	0.68	NS	<.0001
CD4+CD47+ LYM - MFC	130	0.52	NS	0.0189
CD47+CD62+CD4 - %	130	0.55	NS	<.0001
CD47+CD62+CD4 - MFC	130	0.64	NS	0.0056
CD47+CD62+CD4 - MFC	130	0.66	NS	NS

	ניתוח 2			
	n	R2	Disease score (0,1,2 or 3)	Days from calving*
RBC	29	-	-	-
MCV	29	-	-	-
HCT	29	-	-	-
Hgb	29	-	-	-
WBC	49	0.87	NS	NS
Platelets	29	-	-	-
NEUT	49	0.87	NS	NS
%NEUT	49	0.82	NS	NS
LYM	49	0.86	NS	NS
%LYM	49	0.80	NS	NS
MON	49	0.93	NS	NS
%MON	49	0.93	0.0751	NS
%Killing	49	0.92	NS	NS
Adh 30	48	0.99	NS	NS
Pha 30	43	0.98	NS	NS
Proliferation ConA	35	0.78	NS	NS
CD44 PMN %	48	0.93	NS	NS

CD44 PMN - MFC	48	0.89	0.0432	NS
CD44 PMN - Delta%	49	0.68	NS	NS
CD44 PMN - Delta MFC	49	0.74	NS	NS
CD44 LYM - %	48	0.98	NS	NS
CD44 LYM - MFC	48	0.86	NS	NS
CD44 LYM - Delta %	49	0.70	NS	NS
CD44 LYM - Delta MFC	49	0.68	NS	NS
CD44 MON - %	48	0.86	NS	NS
CD44 MON - MFC	48	0.85	NS	NS
CD44 MON - Delta %	49	0.64	NS	NS
CD44 MON - Delta MFC	49	0.61	NS	NS
CD49 PMN - %	20	0.71	NS	NS
CD49 PMN - MFC	20	0.65	NS	NS
CD49 PMN - Delta %	20	0.47	NS	NS
CD49 PMN - Delta MFC	20	0.71	NS	NS
CD49 LYM - %	49	0.90	NS	NS
CD49 LYM - MFC	49	0.98	0.071	NS
CD49 LYM - Delta %	49	0.73	NS	NS
CD49 LYM - Delta MFC	49	0.75	0.0487	0.0545
CD49 MON - %	49	0.77	NS	NS
CD49 MON - MFC	49	0.97	0.0531	NS
CD49 MON - Delta %	49	0.82	NS	NS
CD49 MON - Delta MFC	49	0.91	0.0007	0.059
CD14 MON - %	49	0.90	0.073	NS
CD14 MON - MFC	49	0.92	NS	NS
CD14 MON - Delta %	49	0.80	NS	NS
CD14 MON - Delta MFC	49	0.76	NS	NS
CD18 PMN - %	49	0.91	NS	NS
CD18 PMN - MFC	49	0.83	NS	NS
CD18 PMN - Delta %	49	0.96	NS	NS
CD18 PMN - Delta MFC	49	0.90	NS	NS
CD18 LYM - %	49	0.74	NS	NS
CD18 LYM - MFC	49	0.85	NS	NS
CD18 LYM - Delta %	49	0.83	NS	NS
CD18 LYM - Delta MFC	49	0.61	NS	NS
CD18 MON - %	49	0.68	NS	NS
CD18 MON - MFC	49	0.87	NS	NS
CD18 MON - Delta %	49	0.93	NS	NS
CD18 MON - Delta MFC	49	0.65	NS	NS
CD21 LYM - %	49	0.84	NS	NS
CD21 LYM - MFC	43	0.88	NS	NS
CD8 LYM - %	49	0.88	NS	NS
CD8 LYM - MFC	49	0.90	NS	NS
CD4 LYM - %	49	0.96	0.0638	NS
CD4 LYM - MFC	49	0.96	NS	NS
CD47 PMN - %	49	0.64	NS	NS
CD47 PMN - MFC	49	0.84	NS	NS
CD47 PMN - Delta %	49	0.72	NS	NS

CD47 PMN - Delta MFC	49	0.85	NS	NS
CD47 LYM - %	49	0.99	NS	NS
CD47 LYM - MFC	49	0.92	NS	NS
CD47 LYM - Delta %	49	0.71	NS	NS
CD47 LYM - Delta MFC	49	0.74	NS	NS
CD47 MON - %	49	0.72	NS	NS
CD47 MON - MFC	49	0.93	NS	NS
CD47 MON - Delta %	49	0.69	NS	NS
CD47 MON - Delta MFC	49	0.72	NS	NS
CD62 PMN - %	49	0.79	NS	NS
CD62 PMN - MFC	35	0.74	NS	NS
CD62 PMN - Delta %	49	0.77	NS	NS
CD62 PMN - Delta MFC	49	0.72	NS	NS
CD62 LYM - %	49	0.92	NS	NS
CD62 LYM - MFC	35	0.85	NS	NS
CD62 LYM - Delta %	49	0.88	NS	NS
CD62 LYM - Delta MFC	49	0.62	NS	NS
CD62 MON - %	49	0.94	NS	NS
CD62 MON - MFC	35	0.84	NS	NS
CD62 MON - Delta %	49	0.78	0.0847	NS
CD62 MON - Delta MFC	49	0.54	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - %	49	0.94	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - MFC	49	0.91	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - MFC	49	0.89	NS	NS
CD47+CD62+ LYM - Delta %	49	0.91	NS	NS
CD47+CD62+ LYM Delta MFC	49	0.70	NS	NS
CD47+CD62+ LYM Delta MFC	49	0.60	NS	NS
CD47+CD62+ MON - %	49	0.88	NS	NS
CD47+CD62+ MON - MFC	49	0.92	NS	NS
CD47+CD62+ MON - MFC	49	0.93	NS	NS
CD47+CD62+ MON - Delta %	49	0.69	NS	NS
CD47+CD62+ MON Delta MFC	49	0.76	0.0925	NS
CD47+CD62+ MON Delta MFC	49	0.68	NS	NS
CD4+CD47+ LYM - %	49	0.98	0.0673	NS
CD4+CD47+ LYM - MFC	49	0.96	NS	0.0779
CD4+CD47+ LYM - MFC	49	0.89	NS	NS
CD47+CD62+CD4 - %	49	0.97	NS	NS
CD47+CD62+CD4 - MFC	49	0.92	NS	NS
CD47+CD62+CD4 - MFC	49	0.88	NS	NS