דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 845-0288-15

השפעת הדבקה פומית ב-Mycobacterium vaccae חי על המערכת החיסונית של בני בקר במטרה למנוע הדבקות בבת שחפת

The effect of the oral administration of live *Mycobacterium vaccae* on the immune system of cattle and prevention of paratuberculosis

דו"ח ממסכם מוגש להנהלת ענף הבקר ע"י*:

דניאל אלעד	המעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
גבריאל לייטנר	המעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
אולג קריפוקס	המעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
שלמה בלום	המעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
יעקב ברנר	המעבדה לאימונולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון
זינה ביידר	המעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון

* גב' קליה גרינברג אשר נכללה בין צוות המחקר המקורי הלכה לעולמה במהלך המחקר

תקציר

מטרת המחקר בשנה הראשונה הייתה בחינת הבטיחות בהוקעת פומית של עגלים יונקים, החל מהיום הראשון לחייהם, בחיידק *Mycobacterium vaccae* חי. 38 עגלות הוקעו במספר פרוטוקולים בהם החיידק ניתן לבד או בצירוף תמצית *Ulex europaeus* (קבוצה זו לא נכללה בתכנון המחקר המקורי) אשר אמור לחזק את התגובה החיסונית. התבצע מעקב בריאותי כללי (תיאבון, ערנות, חום גוף) ויישוב מערכת העיכול ע"י החיידק כפי שנה התבטא במשך הפרשת החיידק בצואה. כמכון נבחנה השפעת ההוקעה בחיידק בטווח ארוך ע"י השוואת הפוריות ותנובת החלב בפרות שהוקעו בינקותן לקבוצת הביקורת.

נבחנה התגובה הלימפוציטארית הבפריפרית נגד אנטיגן *M. vaccae*, *M. paratuberculosis* ו-*M. bovis*. כמוכן נבדקה תגובת interferon γ ו-התפלגות תאי T, באמצעות FACS. בנוסף נבדקה השפעת ההוקעה ב-*M, vaccae* על מבחן הטוברקולין.

הושוותה הפרשת החיידקים בפרות בניסוי לאומת פרות הביקורת.

תמצית התוצאות מראות שלהוקעה בחיידק אין השפעות שליליות, לא לטווח קצר ולא לטווח ארוך. ממצא זה פותח את האפשרויות להמשיך במחקר לבחינת השפעת ההוקעה ב-*M. vaccae* על הנגיעות בבת שחפת. בשנה השנייה למחקר תבחן השפעת ההוקעה על המערכת החיסונית התאית הפריפרית ועל הפרשת *M. paratuberculosis* בצואה.

נמצאה עליה בתגובה החיסונית הפריפרית נגד אנטיגן *M. vaccae* ו-*M. paratuberculosis* אך לא נגד *M. bovis*. לא הייתה תגובה במבחן הטוברקולין.

עקב הנגיעות הנמוכה במשק הניסוי, לא היה ניתן להסיק מסקנות באשר להשפעת ההוקעה ב-*M. vaccae*.

.....

הצהרת החוקר הראשי: פרופ' דניאל אלעד

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כן/~~לא~~.

חתימת החוקר _____ תאריך : 12.12.15

1. **תוכן עניינים**

2. **מבוא ותיאור הבעיה 4**

3. **מטרות המחקר:..... 5**

5. **תוצאות..... 11**

6. **דיון 21**

2. מבוא ותיאור הבעיה

Mycobacterium vaccae הוא חיידק יציב חומצה המוגדר כספרופיט סביבתי הצומח במהירות (בניגוד לחיידקים יציבי חומצה פתוגניים). במהלך השנים נעשה שימוש נרחב בחיידק בעיקר ברפואה הומאנית אך גם ברפואה וטרינרית. ניתן למצוא בספרות דיווחים על ניסויים במניע וטיפול מחלות השחפת והצרעת בבני אדם (Stanford et al., 1990; Stanford and Stanford, 1994), בשחפת בעכברים (Hernandez-Pando, et al., 2008), אלרגיות בכלבים (Gutzwiller et al., 2007), עכברים (Hunt et al., 2005) ואדם Arkwright and David, (2001). ומניעת דלקות חניכיים בחולדות (Breivik and Rook, 2003). Yang et al (2010) שבדקו במסגרת meta-analysis מאמרים שעסקו במניעת שחפת בחולים בסיכון גבוה, מדווח כי החיידק יעיל במניעת המחלה, משרה תגובה חיסונית כנגדה ובטוח.

בכל הניסויים הנ"ל נעשה שימוש בגזעי ייחוס (NCTC, ATCC וכו'), מומתים, בזריקה או דרך הפה.

מחלת הבת שחפת הנגרמת ע"י החיידק (MAP), *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* השייך לקבוצת החיידקים יציבי החומצה (acid-fast). אחד מהמאפיינים המשותפים של מחלות הנגרמות ע"י חיידקים אלה (שחפת, צרעת, בת שחפת) התבססותה של התגובה החיסונית על תגובת המערכת התאית בהתמודדות עם הזיהום. התפתחות תגובה חסינות הומוראלית, תהליך שקורה במקביל לדעיכת התגובה התאית, ירדה בעמידות ואיתה גם הפרוגנוזה. גם במצבים אלרגיים, חלק מהתופעות קשורות בתגובה הומוראלית לא תקינה לאנטיגנים סביבתיים. נמצא כי חיידקי *M. vaccae* מגבירים את התגובה התאית ובכך את עמידות הפונדקאי (Skinner et al., 1997). חשוב לציין כי על מנת לקבל פעילות זו יש להשתמש בחיידקים הצומחים במושבות מחוספסות (rough) בזמן שאותו חיידק הצומח במושבות חלקות (smooth) גורם לתופעה הפוכה: גירוי תגובה הומוראלית על חשבון התגובה התאית (Rodrıguez-Guell et al., 2006).

מחלת הבת שחפת היא בראש וראשונה מחלה של מעלי גרה אך היא תוארה במקרים נדירים גם בחיות אחרות (Beard et al., 2001). המחלה מיוחדת בכך שאוכלוסיית החיות בסיכון היא בעיקר עגלים עד גיל 6 חודשים (Larsen et al., 1975) אך סימנים קליניים מופיעים רק בחיות בוגרות (בכ-10% מהן), בתדירות העולה עם הגיל (Olsen et al., 2002). דרך ההדבקה העיקרית היא oro-fecal כאשר חיות בוגרות המפרישות את החיידק הן מקור הזיהום. דרכי הדבקה נוספות הן דרך חלב/קולוסטרום מזוהם מהסביבה או עקב הפרשת החיידק דרך העטין

או הדבקה תוך רחמית. אפשרות ההעברה באמצעות זרמה לא ברור (Olsen et al., 2002). החיידק מיישב את מערכת העיכול, בעיקר את הרקמה הלימפתית (Payer's patches) (Siguroadottir et. al., 2001) ויוצר מוקדים אשר בחלקם מתנקים מהחיידק ובחלקם הוא מתרבה ויוצר מוקדים חדשים (Cocito et al., 1994). הנגעים מאופיינים בתגובה גרנולומטותית אשר, בניגוד לאלו הנגרמות ע"י חיידקים יציבי חומצה אחרים כגון שחפת, איננה מגבילה את התפשטות החיידק (Lei et al., 2008). תגובה זו גורמת להתעבות דופן המעי ובכך לירידה בתפקודי ספיגת הנוזלים והמזון אשר מובילים לשלשולים והרזיה.

הנזקים הכלכליים להם גורמת המחלה כוללים (Pillars et al., 2009) הם ישירים עקב הצורך להוציא מהרפת חיות חולות ועקיפים, אותם לעתים קשה לזהות, הנובעים מירידה בעמידות הכללית של החיות הנגועות בפני זיהומים אחרים, ירידה בפוריות וירידה בתנובת החלב כבר בשלבים התת-קליניים. עקב אחוז הוצאת הפרות הגבוה בישראל (כ-30% שנתית), ייתכן ופרות שסובלות מפגיעות חבויות אלה מורחקות מהרפת מבלי לדעת על השפעת הזיהום ב-MAP על החלטה זו. בכל מקרה יש בכך בכדי למנוע את מימוש הפוטנציאל הגנטי של החיות, על הנזקים הכלכליים הנובעים מכך.

היעדר אפשרות טיפול או חיסון משאיר רק אופציה של שיפורים ממשקיים והוצאת פרות מפרישות להורדת הנגיעות. דרך זו היא ממושכת, יקרה ונתקלת בהסתייגות של המגדלים, בעיקר כאשר מחיר החלב גבוה. חקירת דרך חלופית ו/או משלימה למניעת/צמצום ההדבקה היא לכן כדאית

נכון להיום לא קיימים דיווחים על ניסויים במניעת הדבקה במחלת הבת שחפת באמצעות *M. vaccae*.

המחקר הורחב לעומת התוכנית המקורית ע"י הוספת קבוצה של עגלות שהוקעו ב-*M. vaccae* בתוספת תמצית Ulex.

3. **מטרות המחקר**:

3.1.לבחון האם חשיפה ל-*M. vaccae* בטוחה, בהתחשב שמדובר במתן חיידק חי לעגלים עם מערכת עיכול.

נבחנו:

3.1.1. השפעות כלליות לאחר ההוקעה (תיאבון, ערנות, חום, שלשול)

3.1.2. יישוב מערכת העיכול ע"י החיידק במעקב אחרי משך הפרשתו

3.1.3. השפעות על פוריות ותנובת חלב בפרות שהוקעו כעגלות בתחלובה ראשונה

3.1.4. השפעות על המערכת החיסונית

3.1.5. השפעה על הפרשת MAP ע"י פרות מבוגרות

4. שיטות וחומרים

4.1. חיידקים

לניסויים נעשה שימוש בחיידקי *Mycobacterium vaccae* שנרכשו מאוסף גזעים (NCTC 10916). לאחר תרבות החיידקים נבחרו מושבות מתאימות אשר תורבתו שוב ומהם הוכנו מנות של 10^{10} colony forming units (CFU) לסמ"ק, אשר יובשו. כמות החיידקים נקבעה על פי העכירות של מנת ההוקעה (HI93703 Turbidity Meter, Hanna Instruments, Portugal) לאחר כיול המערכת. מנות ההוקעה נשמרו ב-20°C-. לפני השימוש שוחזרו המנות ע"י 1 סמ"ק מים מזוקקים סטריליים.

4.2. *Ulex europaeus*

לתמצית הצמח *Ulex europaeus* יכולת לרכז אנטיגן שניתן באופן פומי לרקמה הלימפתית של מערכת העיכול (Chionh et al., 2009). היות והנחת העבודה היא שמניעת יישוב מערכת העיכול של העגלים ע"י תתבצע, חלקית לפחות, ע"י רקמה זו, המהווה יעד לחיידק, נבדקה יכולת התמצית להגביר את התגובה החיסונית, כפי שהיא מתבטאת בדם פריפרי.

4.3. בעלי חיים והוקעתם

הניסויים התבצעו בשני מועדים שונים:

קבוצה א': השפעת ההוקעה והפרשת החיידק ע"י עגלים יונקים בטווח הקצר וההשפעה ארוכת טווח על פרות בוגרות (פוריות ותנובה), בחינת השפעת ההוקעה על הפרשת חיידקי בת שחפת בגיל שנתיים.

20 עגלות הוקעו בין נובמבר 2011 למאי 2012. השיבוץ לקבוצה נעשה על פי סדר ההמלטה. העגלות קבלו 10^{10} CFU ב-gavage תוך 24 שעות מההמלטה ומנה דומה נוספת כשבועיים לאחר מכן. החיידקים ניתנו מיד לאחר שחזורם מליופיליזציה. 20 עגלות נוספות שמשו כביקורת ללא הוקעה.

4.4. קבוצה ב':

בניסוי, שהתנהל בין אוקטובר 2012 לינואר 2013, שמשו 3 קבוצות של 6 עגלות כל אחת. השיבוץ לקבוצה נעשה על פי סדר ההמלטה. שתי קבוצות הוקעו ב-10^{10} CFU חיידקים ב-gavage תוך 24 שעות לאחר המלטתם ופעם נוספת כשבועיים לאחר מכן. ההוקעה הראשונה בוצעה בחיידקים לאחר שחזורם מליופיליזציה וההוקעה השנייה בחיידקים ששוחזרו מליופיליזציה אך גדלו בתרבית 5-6 ימים. אחת הקבוצות קבלה את החיידקים בתוספת µG100 תמצית *Ulex europaeus* (Sigma-Aldrich, US). קבוצות אלה שמשו לבדיקת השפעת ההוקעה על יונקים, הפרשת החיידק והתגובה החיסונית. קבוצה שלישית שמשה כביקורת ללא הוקעה.

ששה עגלים נוספות קבלו *M. vaccae* מתרבית בהוקעה הראשונה (תוך 24 שעות מההמלטה), על מנת לבדוק האם הוקעה בתצורה זו אלימה יותר מהמתן ישר לאחר השחזור מליופילזציה.

4.5. מעקב:

העגלות נבדקו מדי יום משך השבוע הראשון ופעמיים לשבוע לאחר מכן. נבחנו מצב כללי (תיאבון, ערנות), חום ושלשול. שתי דגימות צואה יומיות נלקחו מהעגלות, עד לקבלת שתי בדיקות שליליות לנוכחות *M. vaccae*, למעקב לאחר הפרשת החיידק כסימן ליישוב מערכת העיכול. משטחים נצבעו בשיטת Ziel-Neelsen ליציבי

חומצה ונבדקו מיקרוסקופית. כמוכן נזרעו הצואות על מצע אגר עם 5% דם כבש. התרביות הודגרו משך 96 שעות ב-37ºC.

4.6. תגובה חיסונית פריפרית

מכל אחת מהעגלות בקבוצה ב׳ נלקחו דמים חודש לאחר כל הוקעה לבדיקות אימונולוגיות. התגובה נגד *M. vaccae* נבדקה בשתי הדגימות, זו נגד אנטיגנים של *M. avium* subsp. *avium* ו-*M. bovis* נבדקה בדגימה השנייה בלבד.

4.7. הפקת אנטיגן *M. vaccae*

החיידק נזרע בפיזור אחיד באמצעות מטושים על מצע אגר עם 5% דם כבש אשר הודגרו משך 3 ימים ב-37ºC. הצמיחה מ- 6 צלחות פטרי נקצר והרחף, בקרח, ב-30 סמ״ק PBS. לתרחיף הוספו 7 גר׳ כדורי זכוכית (Sigma-Aldrich, USA) והוא טולטל ב- Braun Cell Homogenizer (Brown Melsungen AG, Germany), מקורר CO_2, משך 5 דקות. לאחר הטלטול הורחקו כדור הזכוכית והחיידקים השלמים שנותרו הופרדו בצנטריפוגציה ב- 2800g למשך 15 דקות. הנוזל העליון סונן במסנן µ0.2M. תכולת החלבון נקבעה באמצעות ערכת Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Germany), ודוגמאות האנטיגן הוקפאו ב--20ºC.

4.8. תגובה לימפוציטארית

התגובה הלימפוציטרית נבדקה כנד אנטיגן *M. vaccae* ו- purified protein derivate (PPD) מסחרי של *M. avium* subsp. *avium* (Avituber PPD, Symbiotics, France) (PPDA), הקרוב ל- *M. avium* subsp. *paratuberculosis* הגורם לבת שחפת, ושל *M. bovis* (Bovituber PPD, Symbiotics, France) (PPDB) הגורם לשחפת בבקר.

תאים מונונוקלארים בודדו מדם פריפרי (תמד״פ) מלא שנדגם במבחנות עם הפרין (Vacutainer, Becton Dickinson, USA) ע״י צנטריפוגציה ב-650g משך 30 דקות בטמפרטורת חדר על Ficoll-Paque™ Plus (d=1.077, GE Healthcare, Upsala, Sweden). התאים נשטפו והורחפו בריכוז סופי של 10^6 תאים/סמ״ק ב-RPMI-1640 בתוספת 2mM L-glutamine, 5% fetal calf serum ו-100 U/mL פניצילין-סטרפטומיצים ואמפוטריצין (תעשיות ביולוגיות, ישראל). 100 µL של תרחיף תדמ״פ הוכנס לכל באר במיקרופלטה של 96 בארות תחתית שטוחה לתרביות תאים (Nunc, Denmark). אנטיגן *M. vaccae* בריכוזים סופיים של 5, 10, 25 ו-50 µg/mL חלבון או PPDA או PPDB בריכוזים של 5, 10 ו-20 µg/mL חלבון הוספו לכל באר, ב-3 חזרות. בארות עם Concanavalin A 10 µg/mL (Sigma, USA) שמשו כביקורת חיובית. תאים לא מטופלים שמשו כביקורת רקע שלילי.

הפלטות הודגרו משך 3 ימים ב-37ºC באטמוספרה מועשרת ב-5% CO_2. בהמשך הוספו 20µL AlamarBlue® (Serotec, UK) לכל באר למשך 4 שעות. התוצאות נקראו באמצעות קורא פלורסצנטי GENios Plus (Tecan, Austria) עם פילטר emission באורך גל של 590nm ופילטר excitation באורך גל של 535nm.

חישוב המקדמים בוצע בהתאם לנוסחה:

$$Index = \frac{Fluorescence\ test - Fluorescence\ medium}{Fluorescence\ untreated\ cells - Fluorescence\ medium} - 1$$

4.9. <u>תגובה ל-Interferon γ</u>

1mL דם בהפרין (Vacutainer, Becton Dickinson, USA) הוכנס למיקרופלטות של 24 בארות (NUNC, Danemark). 50µL אנטיגן *M. vaccae* הוסף לכל באר. בארות עם ConA 10 µg/mL ודם לא מטופל שמשו כביקורת חיובית ושלילית, בהתאמה. הפלטות הודגרו ב-37 ºC באטמוספרה מועשרת ב-5% CO_2 משך 24 שעות. בהמשך הוכנס הדם למבחנות Eppendorf אשר סורכזו ב-1500g משך 20 דקות. הנוזל

העליון נאסף ונשמר ב-20°C-. רמת ה-INF-γ נמדדה בערכה מסחרית (Serotec Inc., UK) בהתאם להנחיות היצרן.

4.10. FACS

נבדקו 2 עגלות מבחן ו-2 עגלות ביקורת מקבוצה א'. הכנת תאים מונונוקלארים נעשתה באותה שיטה טכניקה בה נעשה שימוש בתגובה הלמפוציטארית. 1 מ"ל של תרחיף תדמ"פ הוכנס לבאר במיקרופלטה של 24 בארות עם תחתית שטוחה לתרביות תאים (Nunc, Denmark). אנטיגן *M. vaccae* בריכוזים סופיים של 50 µg/mL חלבון הוספו לכל באר, ב-3 חזרות. בארות עם 10 µg/mL Con A שמשו כביקורת חיובית. תאים לא מטופלים שמשו כביקורת רקע שלילית. הפלטות הודגרו משך 3 ימים ב- 37 ºC באטמוספרה מועשרת ב-5% CO2. אחרי סיום ההדגרה, התאים העבירו למבחנות לצנטריפוגציה (5 דקות 450 g) ושטיפה ב- PBS . אחורי שטיפה התאים הורחפו לריכוז סופי בערך של $2x10^7$ תאים/מ"ל בנפח 0.3 מ'ל. התאים סומנו עם נוגדנים חד שבטיים בצביעה כפולה בזוגות:

ל 50 µl של תאים הוספו 50 µl של שני נוגדנים כל אחד במהול 1: 100 (US , Pulman ,VMRD). במבחנה ראשונה הוספנו נוגדן CD25 (IgG1) clone CACT116A (סמן של תאים מאוקטבים) ביחד עם CD4 (IgM) (סמן ל T-לימפוציטים- helpers), במבחנה שניה הוספו נוגדן CD25(IgG3 clone LCTB2) ביחד עם נוגדן CD8(IgG1) (סמן ל T-למפוציטים –ציטוטוקסי) ובמבחנה שלישית הוספו נוגדן CD25(IgG1) clone CACT116A ביחד עם נוגדן CD21(IgM) clone BAQ15 (סמן של לימפוציטים-B). מבחנות עם הנוגדנים הראשונים הודגרו 30 דקות ב 4, ºC אחרי שטיפת עם PBS הוספנו לתאים נוגדנים שניונים רלוונטיים (כנגד השרשרת הכבדה של הנוגדן הראשון) הקשורים עם חומר פלוראורסטנתי: IgM-FITC, anti-mouse goat IgG3-FITC, anti-mouse goat (Jackson, US) anti-mouse goat IgG1Tri-Color (Invitrogen, Frederick, US). המבחנות הדגרו 30 דקות ב 4 ºC ואחרי שטיפת עם PBS הוספנו 0.5 מ'ל PBS לקריאה. התאים המסומנים נקריא ב מכשיר Fowcytometer (FACS-Calibur,BD, US)

4.11. בדיקת טוברקולין

הבדיקה (Bovituber PPD, Symbiotics, France) בוצעה לפרות מקבוצה א' בספטמבר 2014 (שנתיים לאחר ההוקעה).

4.12. הפרשת חיידקי *M. paratuberculosis*

צואות של הפרות מניסוי א' נבדקו בשיטת qPCR לנוכחות חיידקי MAP בנובמבר 2015 (בגיל 3.5-4 שנים).

4.13. סטטיסטיקה

ההשוואות בים קבוצות נעשו באמצעות תבחין T בתוכנת Statistix גרסה 7 (Analytical Sotware, US).

תבחין Mantel-Haenszell חושב באתר http://statpages.org/ctab2x2.html.

5. תוצאות

5.1. השפעה על עגלות:

לא נצפתה השפעה שלילית (חום, חוסר ערנות, חוסר תיאבון וכו') בעקבות מתן החיידק החי בכל עגלות הניסוי.

שלשול הופיע במידה שווה, בסביבות גיל 10 ימים, בעגלות המבחן ועגלות הביקורת, כנראה עקב נגיעות ב-*Cryptosporidium*.

5.2. הפרשת החיידק:

לא נמצאו חיידקים בקבוצה שהוקעה בשתי מנות אחרי שחזור, קבוצת העגלות בניסוי א.

כן נמצאו חיידקיים בכל העגלות בקבוצה שהוקעה במנה ראשונה אחרי שחזור ומנה שנייה מתרבית. קבוצת העגלות בניסוי ב.

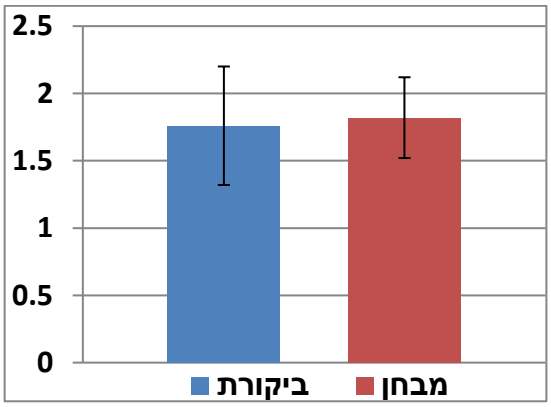
5.3. השפעה ארוכת טווח

5.3.1. פוריות

34 עגלות מקבוצה א' (17 מבחן ו-17 ביקורת) נשארו בעדר בזמן בדיקת הכניסה להריון הראשון.

	ביקורת	מבחן
ממוצע	1.76	1.82
שגיאת תקן	0.44	0.30

מספר הזרעות ממוצע ושגיאת תקן עד התעברות ראשונה



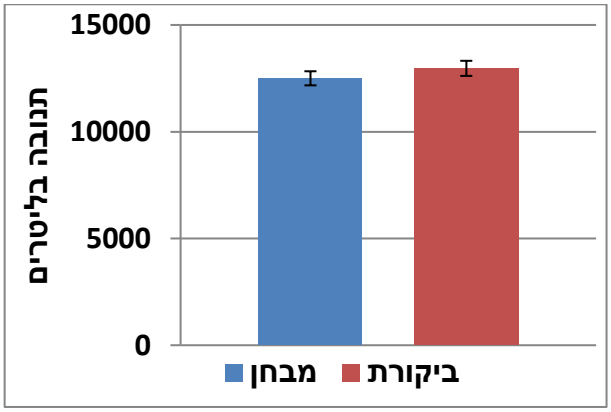
הבדלים ללא משמעות סטטיסטית

5.3.2. תנובת חלב

30 מבכירות מקבוצה א' (16 מבחן ו-14 ביקורת) נשארו בעדר בזמן בדיקת תנובת החלב בסוף תחלובה ראשונה.

	ביקורת	מבחן
ממוצע	12968	12502
שגיאת תקן	353.7	329.6

ממוצע ושגיאת תקן תנובת חלב בליטרים, המתוקנת ל-305 ימים.



לא נמצא הבדל סטטיסטי בין תנובת החלב של שתי הקבוצות.

5.3.3. <u>דלקות עטין</u>

14 מבכירות סבלו מדלקות עטין במהלך הניסוי. בתבחין Mantel-Haenszel נמצא הבדל משמעותי (p=0.015) בין קבוצת המבחן שפתחו בדרך כלל דלקות כרוניות לבין קבוצת הביקורת שפתחה בעיקר דלקות חריפות.

	ביקורת	מבחן	סה"כ
קליני	5	2	7
כרוני	1	6	7
סה"כ	6	8	14

5.3.4. <u>הוצאות מהעדר</u>

במהלך הניסוי הוצאו מהעדר 10 פרות (6 ביקורת ו-4 ניסוי) מהסיבות שלהן:

סיבה	**מבחן**	**ביקורת**
בירור	2	1
עקרות		3
ד. עטין	1	2
ד. ריאות	1	

5.4. <u>תגובה חיסונית</u>

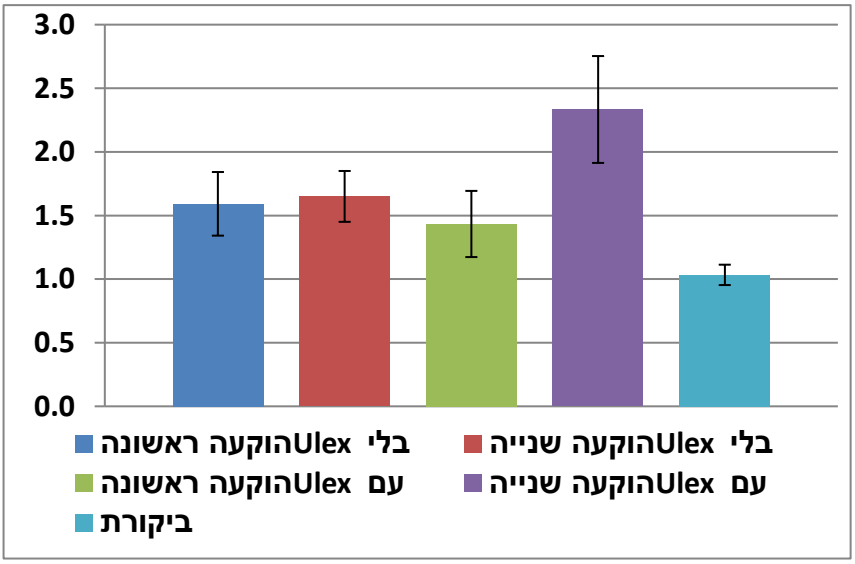
5.4.1. סטימולציה ע"י *Mycobacterium vaccae*

טבלה 5 : תוצאות מבחן סטימולציית לימפוציטים עם אנטיגן *M. vaccae*

	בלי Ulex		**עם Ulex**		ביקורת*
	הוקעה אחת	שתי הוקעות	הוקעה אחת	שתי הוקעות	
ממוצע	1.59	1.65	1.43	2.33	1.09
שגיאת תקן	0.25	0.20	0.26	0.42	0.06

* עקב הדבקותם ב-*M. vaccae*, לא נבדקו 3 עגלות ביקורת בבדיקה השנייה

תרשים 3 : ממוצע תוצאות מבחן סטימולציית לימפוציטים כנגד אנטיגן *M. vaccae* : ממוצע הקבוצות עם שגיאת התקן.



מבחן T :

נבדקו כל הקבוצות זו מול זו. הבדלים עם משמעות סטטיסטית נמצאו בין הביקורות ועגלות המבחן לאחר הוקעה שנייה: p=0.0308 לקבוצה שקבלה Ulex ו-p=0.0343 לקבוצה שלא קבלה את התוסף.

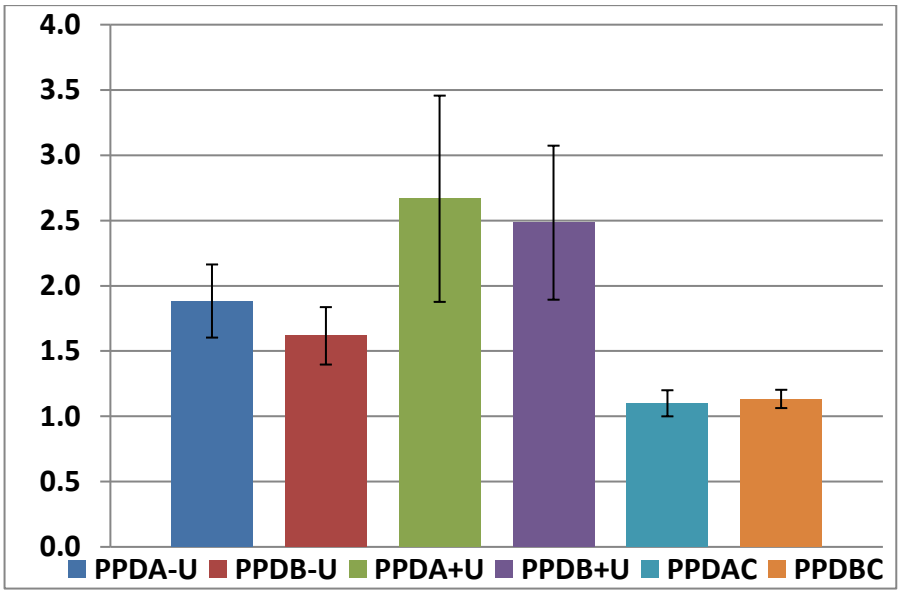
ללא משמעות סטטיסטית: יתר הקבוצות

טבלה 6: סטימולציה עם טוברקולין *Mycobacterium avium* (PPDA) וטוברקולין *Mycobacterium bovis* (PPDB) עם ובלי Ulex (+/-U)

	PPDA-U	**PPDB-U**	**PPDA+U**	**PPDB+U**	**PPDAC**	**PPDBC**
ממוצע	1.88	1.62	2.67	2.48	1.10	1.13
שגיאת תקן	0.28	0.22	0.79	0.59	0.1	0.07

ממוצע תוצאות מבחן סטימולציית לימפוציטים כנגד אנטיגן *Mycobacterium avium* (PPDA) ו-*Mycobacterium bovis* (PPDB) עם שגיאת התקן. בקבוצות הביקורת נכללו 5 עגלות היות ועגלה אחת הייתה מודבקת ב-*M. vaccae* בזמן הדיגום.

תרשים 4: ממוצע תוצאות מבחן סטימולציית לימפוציטים כנגד אנטיגן *M. avium* subsp. *avium* ו-*M. bovis*: ממוצע הקבוצות עם שגיאת התקן.



PPDA : טוברקולין *M. avium* subsp. *Avium*, PPDB : טוברקולין *M. bovis*, PPDAC : טוברקולין *M.* *avium* subsp. *avium* ביקורת, PPDBC : טוברקולין *M. bovis* ביקורת, +/-U : עם או בלי תמצית Ulex

במבחן T :

עם משמעות : ביקורת מול סטימולציה עם טוברקולין *Mycobacterium avium* (PPDA) (p=0.0403)

עם משמעות גבולית : ביקורת מול סטימולציה עם טוברקולין *Mycobacterium bovis* (PPDB) (p=0.0781)

ללא משמעות סטטיסטית : יתר הקבוצות. למרות שהממוצעים של העגלים שהוקעו ב-*M. vaccae* בתוספת Ulex גבוהים יותר מאלה שלא קבלו את התוסף, השונות הגבוהה שלהם גרמה לכך שהם לא נבדלים באופן משמעותי מהביקורות.

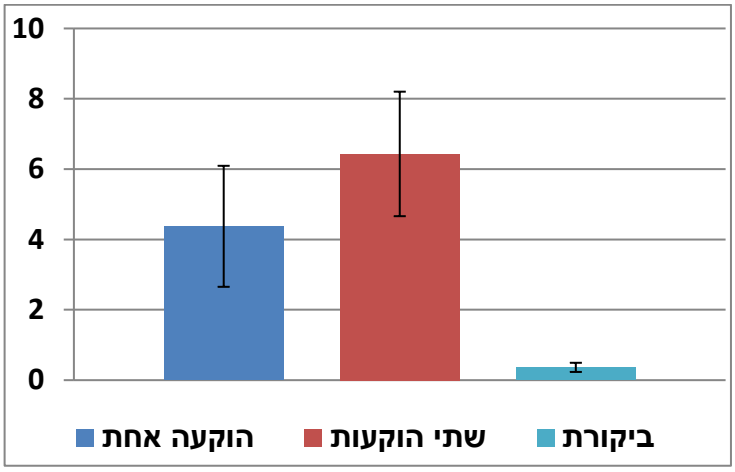
5.4.2. Interferon γ

נבחנו תוצאות של 5 עגלות מבחן ו-3 עגלות ביקורת (שלא הפרישו *M. vaccae*). העגלות שהוקעו ב- *M. vaccae* בתוספת תמצית Ulex לא הגיבו ולכן הן לא מוצגות.

טבלה 7: תוצאות המבחן לתגובת Interferon γ

	הוקעה אחת	שתי הוקעות	ביקורת
ממוצע	4.37	6.43	0.36
שגיאת תקן	1.72	1.77	0.13

תרשים 5: תוצאות המבחן לתגובת Interferon γ עם שגיאת התקן



5.4.3. במבחן T:

עם משמעות: ביקורת מול שתי הוקעות (p=0.0476)

עם משמעות גבולית: ביקורת מול הוקעה אחת (p=0.0711)

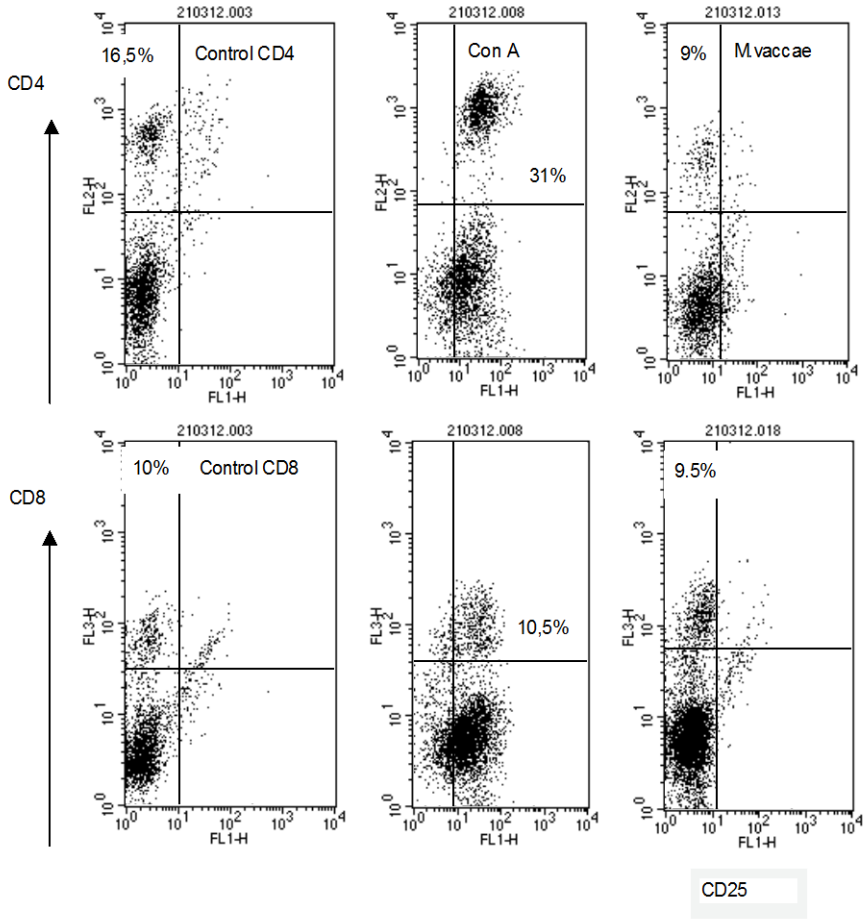
בקבוצה שקבלה חיידקים עם תוסף Ulex לא הייתה תגובה.

5.4.4. FACS

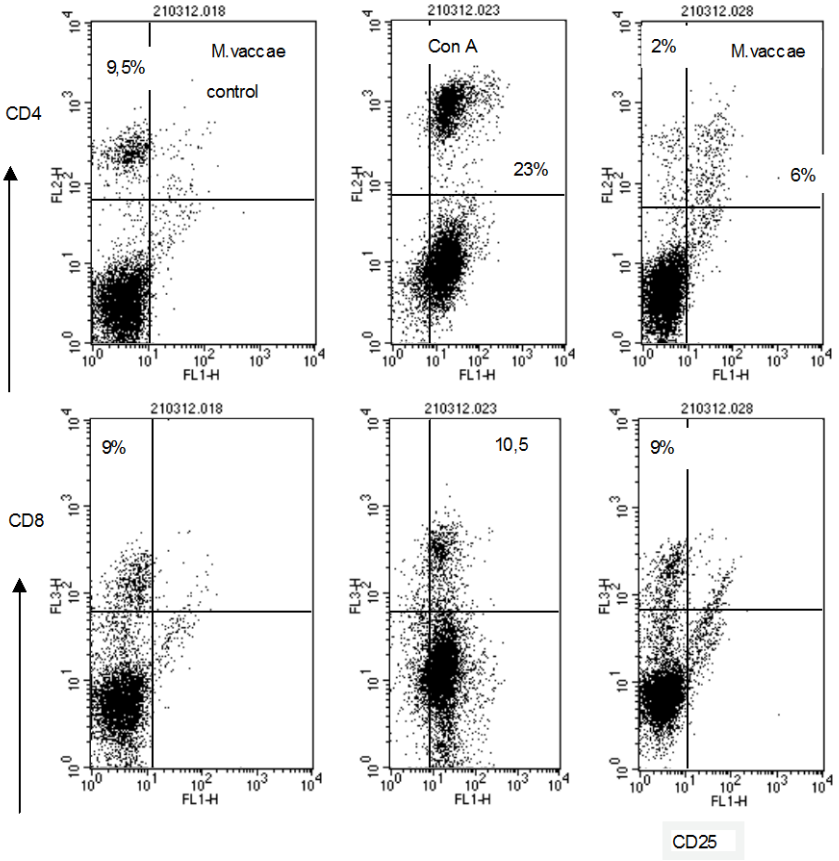
בזמן שלסטימולציה עם ConA הגיבו הן תאי CD4 והן תאי CD8, לסטימולציה עם *Mycobacterium vaccae* הגיבו רק תאי CD4.

<u>איור 1:</u> פרוליפרציה של לימפוציטים של עגלים מחוסנים (A) וביקורת (B) שנחשפו לאנטיגן *M. vaccae* (20µg/mL) ו-ConA (10µg/mL)

<u>A</u>



B



5.4.5. טוברקולין

כל הפרות שנבדקו (קבוצה א') היו שליליות.

5.4.6. הפרשת MAP

חיידקים נמצאו בשתי צואות, אחת מקבוצת המבחן ואחת מקבוצת הביקורת.

6. דיון

מתוצאות הניסויים עולה שלהוקעת עגלות יונקות, פומית עם *M. vaccae* חי, החל מיום חייהן הראשון, אין השפעות שליליות מידיות או לטווח ארוך (ייצור ופוריות). כמוכן נראה שההוקעה בחיידק משרה תגובה חיסונית נגד *M. vaccae* ו-MAP אך לא נגד *M. bovis* כך שאם יעשה שימוש בחיידק למניעת בת שחפת, לא צפויה הפרעה לבדיקת הטוברקולין.

עקב רמת הנגיעות הנמוכה ברפת בה נעשו הניסויים, לא ניתן להסיק מסקנות באשר ליכולת ההוקעה ב- *M. vaccae* למנוע בת שחפת.

ממצאים אלה פותחים את האפשרות לבצע בדיקה נרחבת של לבחינת השפעת הוקעה פומית של *M. vaccae* חי לעגלות יונקות על הידבקותן בבת שחפת. לשם כך יש צורך לבצע ניסוי נרחב ברפת עם נגיעות גבוהה יותר.

7. מקורות

Arkwright PD, David TJ. 2001. Intradermal administration of a killed *Mycobacterium vaccae* suspension (SRL 172) is associated with improvement in atopic dermatitis in children with moderate-to-severe disease. J Allergy Clin Immunol. 107:531-4.

Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM. 2001. Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. J Clin Microbiol. 39:1517-21.

Breivik T, Rook GA. 2003. Oral treatment with SRP299 (killed *Mycobacterium vaccae*) inhibits experimental periodontal disease in Wistar rats. J Clin Periodontol. 30:931-6.

Cocito C, Gilot P, Coene M, de Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. 1994. Paratuberculosis. Clin Microbiol Rev. 7:328-45.

Hernández-Pando R, Aguilar D, Orozco H, Cortez Y, Brunet LR, Rook GA. 2008. Orally administered *Mycobacterium vaccae* modulates expression of immunoregulatory

molecules in BALB/c mice with pulmonary tuberculosis. Clinical and Vaccine Immunology. 15:1730-6.

Hunt JR, Martinelli R, Adams VC, Rook GA, Brunet LR. 2005. Intragastric administration of Mycobacterium vaccae inhibits severe pulmonary allergic inflammation in a mouse model. Clin Exp Allergy. 35:685-90.

Larsen AB, Merkal RS, Cutlip RC.1975. Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res. 36:255-7.

Lei L, Plattner BL, Hostetter JM. 2008. Live *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and a killed-bacterium vaccine induce distinct subcutaneous granulomas, with unique cellular and cytokine profiles. Clin Vaccine Immunol. 15:783-93.

Olsen I, Sigurğardóttir G, Djønne B. 2002. Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. Vet Q. 24:12-28.

Pillars RB, Grooms DL, Wolf CA, Kaneene JB. 2009. Economic evaluation of Johne's disease control programs implemented on six Michigan dairy farms. Prev Vet Med. 90:223-32.

Ricklin Gutzwiller ME, Reist M, Peel JE, Seewald W, Brunet LR, Roosje PJ. 2007. Intradermal injection of heat-killed *Mycobacterium vaccae* in dogs with atopic dermatitis: a multicentre pilot study. Vet Dermatol. 18:87-93.

Rodríguez-Güell E, Agustí G, Corominas M, Cardona PJ, Casals I, Parella T, Sempere MA, Luquin M, Julián E. 2006. The production of a new extracellular putative long-chain saturated polyester by smooth variants of Mycobacterium vaccae interferes with Th1-cytokine production. Antonie Van Leeuwenhoek. 90:93-108.

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

Skinner MA, Yuan S, Prestidge R, Chuk D, Watson JD, Tan PL. 1997. Immunization with heat-killed Mycobacterium vaccae stimulates CD8+ cytotoxic T cells specific for macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun. 65:4525-30.

Stanford JL, Rook GA, Bahr GM, Dowlati Y, Ganapati R, Ghazi Saidi K, Lucas S, Ramu G, Torres P, Minh Ly H, Anstay N. 1990. *Mycobacterium vaccae* in immunoprophylaxis and immunotherapy of leprosy and tuberculosis. Vaccine. 8:525-30. Review.

Stanford JL, Stanford CA. 1994. Immunotherapy of tuberculosis with *Mycobacterium vaccae* NCTC 11659. Immunobiology. 91:555-63.

Yang XY, Chen QF, Cui XH, Yu Y, Li YP. 2010. *Mycobacterium vaccae* vaccine to prevent tuberculosis in high risk people: a meta-analysis. J Infect. 60:320-30.

Chionh YT, Wee JLK, Every AL, Ng GZ, Sutton P. 2009. M-Cell Targeting of whole killed bacteria induces protective immunity against gastrointestinal pathogens. Infection and Immunity. 77:2962–70.