משרד החקלאות –דף שער לדו"ח מדעי לתוכניות מחקר
לקרן המדען הראשי

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
752 - 0062 - 14	סקר נוכחות חיידק השחפת (Mycobacterium bovis) בעדרי הבקר בישראל ואפיונו ברמה הגנטית

ב. צוות החוקרים

	שם משפחה	שם פרטי
חוקר ראשי	כחילה בר-גל	גילה
חוקרים משניים		
1	אלעד	דניאל
2	עוזרי	רוני
3		
4		
5		
6		
7		

ג. כללי

מוסד מחקר של החוקר הראשי

האוניברסיטה העברית בירושלים

סוג הדו"ח	תאריכים				
	תקופת המחקר עבורה מוגש הדו"ח				תאריך משלוח הדו"ח למקורות המימון
	התחלה		סיום		
מסכם	שנה / 16	חודש 01	שנה / 16	חודש 12	שנה / 17 חודש 04

ד. מקורות מימון עבורם מיועד הדו"ח

שם מקור המימון	קוד מקור מימון	סכום שאושר למחקר בשנת תיקצוב הדו"ח בשקלים
הנהלת ענף הבקר ומספוא	176	60000
משרד החקלאות		

ה. אישורים

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

חוקר ראשי	מנהל המחלקה	מנהל המכון (פקולטה)	אמרכלות (רשות המחקר)	רשות המחקר	תאריך (שנה) (חודש) (יום)
גילה כחילה בר-גל	גד דגן				24/5/17

דו"ח סופי לתכנית מחקר מספר 752-0062-14

נושא: בדיקת נוכחות חיידק שחפת הבקר (*Mycobacterium bovis*) בעדרי הבקר בישראל ואפיונו ברמה הגנטית

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף החלב

ע"י

דר' כחילה בר-גל — ביה"ס לרפואה וטרינרית, הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית בירושלים. E-mail: gila.kahila@mail.huji.ac.il

פרופ' אלעד — מעבדה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית, המכון הוטרינרי ע"ש קמרון, בית דגן. E-mail: daniel.elad@gmail.com

דר' עוזרי — אמריטוס, המכון הוטרינרי ע"ש קמרון, בית דגן.

תקציר

שחפת היא מחלה זיהומית קטלנית הגובה את חייהם של מיליוני בני אדם ובעלי חיים בשנה והיא מוגדרת כמגיפה כלל עולמית. באדם המחלה יכולה להיגרם על ידי מספר חיידקים ביניהם החיידק *Mycobacterium bovis* מחולל מחלת שחפת הבקר. מכאן, שחפת הבקר מהווה זואונוזה חמורה. מאחר ושחפת הבקר פוגעת באדם ובחיות משק למחלה השלכות לבריאות ציבור, לבריאות בעלי החיים, לחקלאות ולכלכלה. משנת 1999, ישראל מוכרת כמדינה נקייה ממחלת שחפת הבקר, הודות למאמצים ותכניות מיגור יעילות של השירותים הווטרינריים. עם זאת, ידוע כי המחלה קיימת באזורים הסובבים את ישראל, כולל ברשות הפלשתינאית, וכי המחלה יכולה להתפשט על ידי מסחר (חוקי ולא חוקי) בחיות נגועות וגם על ידי חיות בר שונות, היכולות להוות מאגר של המחלה.

מטרת המחקר הייתה לקבוע את מידת הנגיעות של עדרי הבקר לבשר ולחלב בישראל במחלת שחפת הבקר. לשם כך נדגמו פרטים מעדרים שונים, שהגיעו לשני בתי מטבחיים בחיפה (346 פרטים) ובבית שאן (151 פרטים). מכל פרט נדגמו 3-2 קשרי לימפה (קשר לימפה של בלוטת החלב, קשר לימפה מדיאסטילאליים וקשר לימפה מזנטריאליים). בנוסף נלמדו דגימות חלב מבקר (200 דגימות), שהגיעו כדגימות בודדות למעבדת מאל"ה במועצת החלב, נאספו ונלמדו כמו גם דגימות של חלב נאקות (20 דגימות). דנ"א הופק מכל הדגימות והוגבר בעזרת מינימום שלשה תחלים: תחל אוניברסאלי להגברת מקטע מהגנום המיטוכונדריאלי של הבקר (ביקורת חיובית לתהליך הפקת הדנ"א) תחל ספציפי לסוג *Mycobacterium* (IS6110) ושלשה תחלים ספציפיים לאורך גנום החיידק *M. bovis* (IS1081, oxyR ו- narGHJI). תוצאות המחקר מלמדות שבמידה וקיים החיידק *M. bovis* בעדרי הבקר לחלב ולבשר בישראל הוא נמצא בשכיחות מאוד נמוכה שקיים קושי לאתרו. כדי לוודא שישראל נשארת נקייה מהמחלה יש חשיבות בהמשך הניטור כדי למנוע הדבקה בעתיד של חיות המשק כתוצאה ממסחר או הברחה של בעלי חיים ממדינות שכנות הנגועות במחלה.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי

1. דר' שלמה באום
2. פרופ' גבי לייטנר
3. פרופ' הילל ברקובייר

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

***במידה וכן, על החוקר להמציא פרטים על הגוף שבאמצעותו מופץ הידע (כמו: שה"ם)**

חתימת החוקר גילה פחלה סדר-ן **תאריך:** 24.5.17

האוניברסיטה העברית בירושלים
THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM

24 במאי 2017

דו"ח סופי לתכנית מחקר מספר 752-0062-14

נושא: בדיקת נוכחות חיידק שחפת הבקר (*Mycobacterium bovis*) בעדרי הבקר בישראל ואפיונו ברמה הגנטית

דר' כחילה בר-גל, דר' עוזרי ופרופ' אלעד

תקציר

שחפת היא מחלה זיהומית קטלנית הגובה את חייהם של מיליוני בני אדם ובעלי חיים בשנה והיא מוגדרת כמגיפה כלל עולמית. באדם המחלה יכולה להיגרם על ידי מספר חיידקים ביניהם החיידק *Mycobacterium bovis* מחולל מחלת שחפת הבקר. מכאן, שחפת הבקר מהווה זואונוזה חמורה. מאחר ושחפת הבקר פוגעת באדם ובחיות משק למחלה השלכות לבריאות ציבור, לבריאות בעלי החיים, לחקלאות ולכלכלה. משנת 1999, ישראל מוכרת כמדינה נקייה ממחלת שחפת הבקר, הודות למאמצים ותכניות מיגור יעילות של השירותים הווטרינריים. עם זאת, ידוע כי המחלה קיימת באזורים הסובבים את ישראל, כולל ברשות הפלשתינאית, וכי המחלה יכולה להתפשט על ידי מסחר (חוקי ולא חוקי) בחיות נגועות וגם על ידי חיות בר שונות, היכולות להוות מאגר של המחלה.

מטרת המחקר הייתה לקבוע את מידת הנגיעות של עדרי הבקר לבשר ולחלב בישראל במחלת שחפת הבקר. לשם כך נדגמו פרטים מעדרים שונים, שהגיעו לשני בתי מטבחיים בחיפה (346 פרטים) ובבית שאן (151 פרטים). מכל פרט נדגמו 3-2 קשרי לימפה (קשר לימפה של בלוטת החלב, קשר לימפה מדיאסטילאליים וקשר לימפה מזנטריאליים). בנוסף נלמדו דגימות חלב מבקר (200 דגימות), שהגיעו כדגימות בודדות למעבדת מאל"ה במועצת החלב, נאספו ונלמדו כמו גם דגימות של חלב נאקות (20 דגימות). דנ"א הופק מכל הדגימות והוגבר בעזרת מינימום שלשה תחלים: תחל אוניברסאלי להגברת מקטע מהגנום המיטוכונדריאלי של הבקר (ביקורת חיובית לתהליך הפקת הדנ"א) תחל ספציפי לסוג *Mycobacterium* (IS6110) ושלשה תחלים ספציפיים לאורך גנום החיידק *M. bovis* (IS1081, oxyR ו- narGHJI). תוצאות המחקר מלמדות שבמידה וקיים החיידק *M. bovis* בעדרי הבקר לחלב ולבשר בישראל הוא נמצא בשכיחות מאוד נמוכה שקיים קושי לאתרו. כדי לוודא שישראל נשארת נקייה מהמחלה יש חשיבות בהמשך הניטור כדי למנוע הדבקה בעתיד של חיות המשק כתוצאה ממסחר או הברחה של בעלי חיים ממדינות שכנות הנגועות במחלה.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

מבוא

שחפת הבקר (*Bovine tuberculosis*; bTB) הנגרמת על ידי חיידק *Mycobacterium bovis* המשתייך לקומפלקס של Mycobacterium tuberculosis complex (MTC) הינה זואונוזה חמורה העלולה לסכן אוכלוסייה רחבה של בעלי חיים (חיות המשק, חיות מחמד וחיות הבר) כולל האדם. ארגון הבריאות העולמי (WHO) הגדיר את המחלה כאחת משבעת המחלות הזואונוטיות המתהוות (Zoonotic Neglected Diseases) שהסבו נטל בריאותי גדול בעיקר על האוכלוסייה הענייה בעולם[1,2,3]. באפריקה שכיחות המחלה גבוהה יחסית כ-264/100,000 אנשים בשנה (כ- 2.8% מקרים בשנה) בעוד שבמדינות מחוץ לאפריקה השכיחות באדם נמוכה יחסית, פחות מ- 71/100,000 אנשים בשנה (כ- 1.4% מקרים בשנה). בסה"כ השכיחות של שחפת באדם הנגרמת על ידי שחפת הבקר מוערכת בכ- 3.1% מכלל מקרי השחפת בעולם[4,5]. מכאן, בנוסף לחשיבות המחלה מבחינה חקלאית, פגיעה בחיות המשק והשפעה כלכלית למגדלים, יש חשיבות לבריאות הציבור.

החיידק הגורם לשחפת הבקר (*M. bovis*) מצוי בשכיחות משתנה בקרב בעלי החיים בהתאם למין בעל החיים והאזור הגיאוגרפי[6,7]. דרך ההדבקה הנפוצה ביותר היא במגע ישיר והפרשות של מערכת הנשימה העליונה בעיקר בקרב פרטים נגועים בעדרי חיות המשק החולקים את אותו שטח מרעה ומחסה ו/או בין חיות המשק למינים אחרים, חיות הבר והאדם, המגיעים עימם במגע[8,9]. בקרב חיות המשק, הבקר והצאן מהווים את מקור המזון העיקרי לתוצרת בשר וחלב. ככאלה הינם בעלי חשיבות כלכלית וחברתית בעולם כולו ובעיקר במדינות המתפתחות[10]. באותן מדינות, שכיחות החיידק בקרב חיות המשק גבוהה בשל העדר ביקורת וטרינרית. השימוש בתוצרי חלב שאינו מפוסטר ו/או בשר נגוע שאינו מבושל דיו מעלה את אחוזי ההדבקה של האוכלוסייה האנושית בחיידק והתפרצות מחלת השחפת[11]. ניטור מחלת שחפת הבקר בקרב עדרי הבקר והצאן מתבצע בעיקר על ידי חיסון העדרים ב Bacillus Calmette Guerin (BCG) החיסון הנפוץ בכל העולם[12]. למרות החיסון, ישנן מדינות (בעיקר בריטניה, אירלנד וספרד) שבהן שחפת הבקר נפוצה בשכיחות גבוהה בשל הקושי בניטור המחלה, הנובע מקיומה של המחלה בחיות הבר דוגמת הגירית המצויה (*Meles meles*) ומפריסי הפרסה המשמשים כמאגר של המחלה[13,14,15]. בנגריה ואתיופיה שחפת הבקר זוהתה בשכיחות גבוהה גם בקרב עיזים (4.5% ו 4.2% בהתאמה)[8,9]. במדינות השכנות לישראל, מצרים ירדן ולבנון, ידוע ששחפת הבקר קיימת בקרב הבקר וצאן אולם שכיחות המחלה אינה מדווחת למעט במצרים[16]. במצרים בשנות השמונים והתשעים שכיחות המחלה הייתה גבוהה (6.9-26.2% ו- 2.6% בהתאמה) אולם בשל פעילויות ניטור שכיחות המחלה כיום נמוכה (0.05%)[17]. בישראל דווח על מקרה שחפת הבקר בשנת 1990, כאשר הפתוגן זוהה בחוות בקר לחלב ברמת הגולן. פעילות נמרצת של הרשויות שכללה בדיקה ושחיטה של הפרטים הנגועים מיגרה את המחלה בארץ[18]. מאז 1990 ישראל מוגדרת כמדינה חופשיה מהמחלה ולכן אין חיסון של הבקר והצאן. במטרה למנוע את הופעת ו/או התפשטות המחלה בארץ השירותים הווטרינריים נוקטים באמצעים שונים במעברי הגבול למנוע הכנסה של בקר וצאן מובר‌ח, עורכים מבחנים אבחוניים בעדרים בכל חלקי הארץ באופן סדיר. כמו כן קיים פיקוח כללי - השגחה כללית של

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

רופאים ווטרינרים בשדה ופיקוח ממוקד - ביצוע פיקוח ובדיקות באוכלוסייה מוגדרת, למשל פרים. פעולות אחרות לבלימת חדירת המחלה או התפשטותה הם מעקב באמצעות מבחני טוברקולין [Intradermal tuberculin test (ITT)] לכל עדר הבקר והשמדת חיות שנמצאו חיוביות. במקרה של עדר נגוע, הוא מושמד[19]. לאחרונה נמצא שלמבחן הטוברקולין המזהה את שחפת הבקר על סמך תגובה חיובית לחלקיקי החיידק יש מספר מגבלות שגורמות לחוסר זיהוי של פרטים נגועים[20]. יש לציין שמבחן זה אינו רגיש דיו ואינו מבחין בין המחלה הנגרמת על ידי החיידק *M. bovis* ובין החיסון (BCG) הניתן על ידי המגדלים[20,21]. אבחון מולקולארי, על סמך ראקציית הגברה של מקטעי דנ"א של החיידק, מוגדר כשיטה יעילה ומהימנה יותר לקביעת נוכחות של הפתוגן בדגימה[22]. לצורך האבחון המולקולארי נבחרו גנים שונים המשמשים כמטרה לזיהוי והגדרה של חיידק השחפת מהזן *M. bovis*[23]

ככל הידוע לנו, מקרי שחפת הבקר בבעלי חיים (חיות משק ובר) לא דווחו בישראל מאז שנת 1990 וישראל מוגדרת כמדינה חופשית משחפת זו בקרב חיות המשק[18]. במחקר שהתבצע בגדה המערבית בהנחיתה של ד"ר כחילה בר-גל, בין השנים 2009-2012 ושמטרתו הייתה סקר השחפת בקרב הבקר והצאן בגדה המערבית, נבדקו דגימות רקמה ודגימות חלב לנגיעות בחיידק *M. bovis*. במסגרת המחקר נדגמו 104 חיות (60 עגלים ו-44 עיזים) בבית מטבחיים ביריחו, כשמכל חיה נדגמו שני קשרי לימפה בנוסף, נאספו דגימות חלב משלושה עדרי עיזים (120 דגימות) ומעדר בקר (30 דגימות), כולם בגדה המערבית. בבדיקות היסטולוגיות ומולקולאריות נמצאה נוכחות של פתוגן השחפת בשמונה דגימות (3.1%): שתי דגימות חלב שמקורן בעיזים נמצאו חיוביות לשחפת, וכל דגימות החלב מהבקר נמצאו שליליות לנוכחות הפתוגן. שש דגימות חיוביות לשחפת מקורן בקשרי הלימפה שנדגמו. הדוגמאות מייצגות ארבעה פרטים, עז אחת ושלושה עגלים. כל המקרים שנמצאו חיוביים לשחפת אופיינו גנטית ונקבע שהינם נגועים בזן *M. bovis*. ממידע שנמסר על ידי בית המטבחיים עולה שהעגלים שנמצאו חיוביים ל *M. bovis* נקנו ממגדלים ישראלים אולם, לא ניתן לקבל מידע מדויק על המגדלים[24].

זיהוי החיידק *M. bovis* בדגימות חלב ובקשרי לימפה בגדה המערבית מחזקת את העובדה שחיות המשק יכולות להוות מאגר של מחלת שחפת הבקר. השכנות של מדינת ישראל עם הגדה המערבית מחדדת את החשיבות בנקיטת כל אמצעי הניטור למנוע את העברת המחלה בין חיות המשק מהגדה המערבית לאוכלוסיית חיות המשק וחיות הבר בישראל. יש להגביר את מודעות הציבור בחשיבות השימוש בחלב מפוסטר ובשר מבושל ובמקביל לערוך סקר מקיף להבנת מידת שכיחות המחלה בקרב הבקר לחלב והבקר לבשר בישראל ולאשר את המעמד של ישראל כמדינה חופשית משחפת הבקר בחיות המשק.

מטרת המחקר: קביעת מידת הנגיעות של עדרי הבקר בישראל, בקר לחלב ובקר לבשר, בחיידק ה- *M. bovis* המחולל את מחלת שחפת הבקר על סמך מבחנים מולקולריים וביצוע ניתוח אפידמיולוגי באשר לנפיצותו באזורים גיאוגרפיים.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

שיטות וחומרים

איסוף דגימות: שני סוגי דגימות נבדקו לנוכחות חיידק השחפת בקרב בני בקר דגימות חלב לא מפוסטר ודגימות רקמה. דגימות הרקמה כללו שלשה סוג קשרי לימפה: מדיאסטילאליים (ריאות), בלוטת החלב ומזנטריאליים (מערכת העיכול).

דגימות חלב לא מפוסטר: במהלך המחקר נאספו 200 דגימות חלב לא מפוסטר ונבדקו לנוכחות שחפת הבקר. הדגימות נאספו ממעבדות מועצת החלב במרכז התעשייה שבקיסריה, אליהן מגיעות דגימות חלב מכל רפתות החלב בישראל לצורך בדיקות שגרתיות. כל הדגימות הובלו בקירור ונשמרו במעבדה בהקפאה -20 ^{o}C עד להמשך הליכים ובדיקות. במהלך האיסוף תועד מידע עבור כל דגימה אודות המיקום הגיאוגרפי ממנו הגיעה הפרה (איור 1) ומספר התחלובה בו היא נמצאת, כאשר נאספו רק דגימות של פרות מתחלובה חמישית ומעלה. חשוב לציין שהאיסוף היה של דגימות בודדות, כלומר כל דגימה הגיעה מפרה בודדת ולא נלקחו דגימות מהמכלים הכלליים של הרפתות, כיוון שאם החיידק קיים בפרה מסוימת מיהולו במיכל יקטין מאוד את הסיכוי לאתרו וגם כדי שבמקרה שימצא החיידק ניתן יהיה לדעת מי היא הפרה הספציפית שנדגמה.

דגימות חלב נאקות לא מפוסטר (20 דגימות) נדגמו מעדר אחד בדרום הארץ. יש לציין ששיתוף הפעולה בעדרים אחרים נכשל ולכן נדגם רק עדר אחד.

דגימות קשרי לימפה: דגימות קשרי לימפה נאספו משני בתי מטבחיים: בחיפה ובבית שאן, אליהם נשלחים בני בקר מכל הארץ, וזו במטרה להגדיל את המדגם, יותר חוות גידול מאזורים גאוגרפיים שונים. הדגימות כללו בני בקר לחלב ובני בקר לבשר. חשוב לציין שהדגימות נאספו במהלך בדיקה שגרתית של ווטרינר בית המטבחיים, במהלכה יש בדיקה ויזואלית לאיתור פתולוגיות בטבחה עצמה ובאיברים הפנימיים כולל הריאות, הכבד והלב. באף אחת מהחיות לא עלה חשד לשחפת על ידי הווטרינר. גיל החיות שנשחטו נע משנה אחת ועד 11 שנים, תועד גם המיקום הגיאוגרפי ממנו הגיעו (איור 2). כל הדגימות הובלו בקירור ונשמרו במעבדה בהקפאה. סה"כ נדגמו במהלך המחקר רקמות מ 497 בני בקר:

בני בקר לחלב - מבית המטבחיים בחיפה 267 (100 זכרים ו- 167 נקבות)

בני בקר לבשר – סה"כ 230 פרטים מבית המטבחיים בחיפה (79 פרטים, 63 זכרים ו- 16 נקבות) ומבית המטבחיים בבית שאן (151 פרטים זויג לא תועד).

איור 1: אזורים גיאוגרפים מהם נלקחו דגימות חלב

איור 2: אזורים גיאוגרפים מהם נלקחו דגימות בשר

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

בדיקה מולקולרית לקביעת נוכחות הפתוגן בדגימה:

הפקת הדנ"א הותאמה לסוג הדגימה במטרה לקבל דנ"א באיכות טובה וללא מעכבים:

הפקת דנ"א מדגימות הרקמה – בשלב הראשון שומן ורקמת חיבור הופרדו מרקמת קשר הלימפה בצורה מכאנית. מכל קשר לימפה נדגמה חתיכה קטנה, בערך 25mg שנחתכה לחתיכות קטנות כדי להגדיל את שטח הפנים של הרקמה בתהליך העיכול. ההפקה בוצעה בפרוטוקול של גואנדין (Guanidine thiocyanate followed by a silica-based (GuSCN) purification)[25,26]

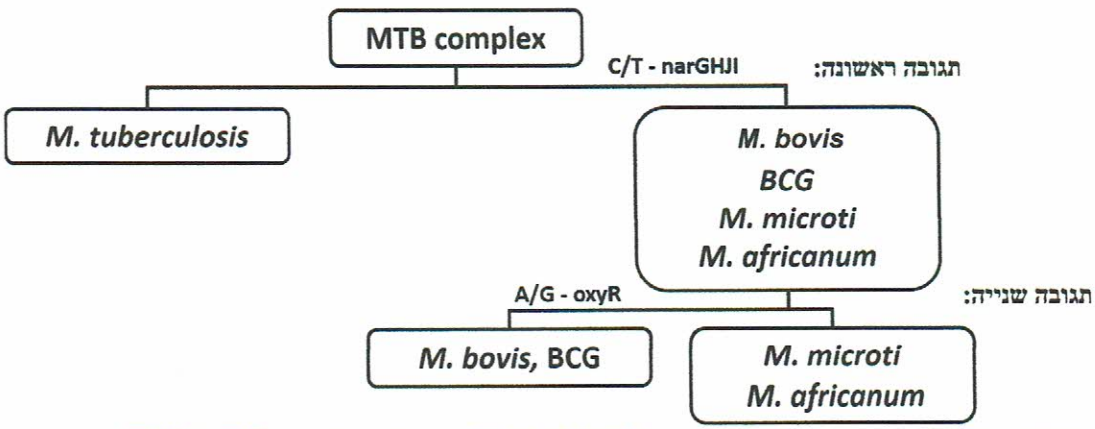
הפקת DNA מדגימות החלב - בשלב הראשון היה צורך להפריד את השומן מהחלב. לשם כך הדגימות עברו סרכוז ב- 13,000rpm למשך רבע שעה ובעזרת מקלון צמר גפן סטרילי הוצאה שכבת השומן. לאחר הוצאת השומן הוצא התרחיף ובמבחנה הושאר המשקע בלבד. המשקע הורחף ב-100µl מים מזוקקים פעמיים והועבר למבחנת אפנדורף. התרחיף (משקע תאים +מים) כלל את התאים ששימשו כמקור להפקת דנ"א מהחלב. הפקת הדנ"א התבצעה בעזרת קיטים מסחריים Accuprep Genomic DNA Extraction (Bioneer,Korea) ו GENElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kits (SIGMA) ובשיטת גואנדין [25,26]

הגברת הדנ"א התבצעה בשני שלבים:

שלב א: הגברה בעזרת תחל המגביר מקטע מגן מיטוכנדריאלי של הגן 12s[27] לקביעת נוכחות דנ"א של בן בקר בדגימה. ההגברה שימשה כביקורת חיובית לתהליך ההפקה של הדנ"א מהדגימה.

שלב ב: הגברה בעזרת תחלים לקביעת נוכחות של חיידק ה *Mycobacterium* בדגימה. לקביעת נוכחות החיידק והבחנה לגבי מין החיידק נעשה שימוש בארבעה תחלים המגבירים אזורים שונים של ארבעה גנים שונים IS6110, IS1081, oxyR ו- narGHJI[28] (איור 3).

איור 3: סכימה המתארת את השלבים בקביעת נוכחות החיידק חיידק ה *Mycobacterium* בדגימה וקביעת מינו לפי Ereqat וחובריו[33]



תגובה 1: הבחנה בין *M. Tuberculosis* לשאר החיידקים ב- MTC על סמך מוטציית SNP בגן *narGHJI*.
תגובה 2: הבחנה בין *M. bovis* ו- BCG ל- *M. microti* ו- *M. africanum* על סמך מוטציית SNP בגן *oxyR*

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

תוצרי ראקציות ה RCR נבדקו וכל ההגברות החיוביות נשלחו לקביעת מעקובות הדנ״א כדי לקבוע נוכחות ומין הפתוגן. תוצרי ההגברות החיוביות נוקו בשיטה אנזימתית ע״י Exonuclease I - shrimp alkaline phosphatase (HDV pharmacia, UK) ונשלחו למרכז הלאומי לטכנולוגיות גנומיות בקמפוס גבעת רם של האוניברסיטה העברית לקביעת מעקובות הדנ״א. מעקובות הדנ״א נקבעו תוך שימוש במכשיר ABIPRISM 3730xlDNAAnalyzer (AppliedBiosystems, USA).

<u>בדיקה מיקרוסקופית לקביעת נוכחות הפתוגן בדגימה:</u>

הרקמות שנמצאו חשודות לנוכחות החיידק *M. bovis* בעקבות תוצאות הגברה חיוביות באחד מהגנים הספציפיים נשלחו לבדיקה הסטולוגית בחטיבה לבקטריולוגיה ומיקולוגיה קלינית של השירותים הווטרינריים בבית דגן לקביעת נוכחות הפתוגן בדגימה. הבדיקות כללו בדיקה מיקרוסקופית שהתבססה על 2 גר׳ של רקמה על גבי זכוכית נושאת שנצבעה ב- Ziehl Neelsen (ZN). בשיטת צביעה זו נקבעה זו נוכחות/אי נוכחות של חיידקים יציבי חומצה, כגון חיידקים מהסוג *Mycobacteria* על ידי צביעתם באדום, בעוד שיתר החיידקים נצבעים בצבע כחול.

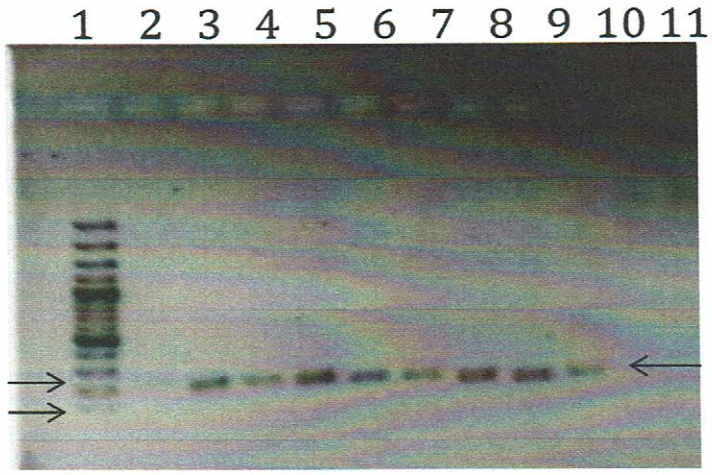
תוצאות

לאור העובדה שישראל נחשבת נקייה מאז שנת 1990 ההשערה היא שרב הדגימות ימצאו שליליות ובמידה והחיידק קיים הוא בשכיחות נמוכה מאד. במטרה להגדיל את סיכויי ההצלחה באבחון נוכחות החיידק בדגימה כל דגימה הופקה פעמיים באופן בלתי תלוי, בד״כ בעזרת שתי שיטות הפקה שונות. בסה״כ הופק דנ״א מקשרי לימפה של 497 פרטים (1000 דגימות) ומ 220 דגימות חלב. כל דגימה שהופקה הוגברה באופן בלתי תלוי ע״י מינימום שלשה תחלים שונים (תחל מיטוכונדריאלי לקביעת נוכחות דנ״א בדגימה, ושני תחלים לזיהוי הפתוגן).

<u>נוכחות דנ״א בדגימה:</u> כל הדגימות שהופקו (1220 דגימות) הוגברו בעזרת תחלים מיטוכונדריאלי שהעידו שהדנ״א בדגימה זהה לדנ״א של בן בקר (איור 4). כל הדגימות נמצאו חיוביות בהגברה של הגן המיטוכונדריאלי, דהיינו קיום דנ״א של בן בקר בכל הדגימות. כדי לאשר שאכן הדנ״א בדגימה הינו של בן בקר נבחרו דגימות אקראיות שעבורן נקבעו מעקובות הדנ״א. מעקובות הדנ״א נבדקו בעזרת התוכנה Sequencher ומין בע״ח נקבע ע״ס השוואה למסד הנתונים העולמי GeneBank בעזרת האלגוריתם BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). תוצאות השוואה זו אישרו את הנוכחות של דנ״א ממקור של בן בקר (*Bos taurus*).

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

איור 4: דוגמא לבדיקת נוכחות דנ"א בדגימה



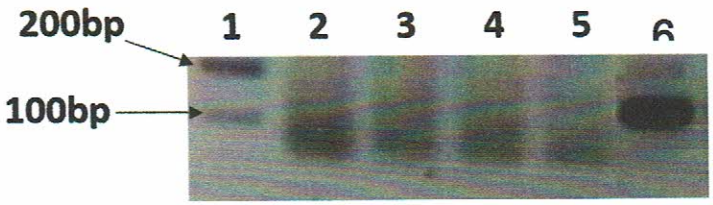
תוצרי הגברה למקטע מיטוכונדריאלי של הגן 12s באורך של 167 בסיסים מדנ"א שהופק מן הדגימות. עמודה 1 היינה סמן גודל, עמודות 2-10 הגברות חיוביות של דגימות קשרי לימפה, עמודה 11 ביקורת שלילית.

נוכחות החיידק *M. bovis* בדגימה על סמך בדיקה גנטית: מקטעים מהאזור של הגן IS6110 הוגברו עבור כל הדגימות כדי לקבוע נוכחות של חיידק מהסוג *Mycobacterium* בדגימות. כל דגימות החלב נמצאו שליליות בהגברה של מקטע זה. לעומת זאת בהגברה של אותו מקטע עבור דגימות הדנ"א שמקורן בקשרי הלימפה נמצא חשד להגברה חיובית של דנ"א חיידקי עבור ארבע דגימות.

למרות שכל דגימות החלב נמצאו שליליות לנוכחות חיידק מהסוג *Mycobacterium* הוחלט לבדוק באופן אקראי מחצית מדגימות החלב של בני בקר וכל דגימות חלב הנאקות לנוכחות ספציפית של החיידק *M. bovis* ע"ס הגברה של מקטע מהגן oxyR (תגובה 2, איור 3). כל ההגברות נמצאו שליליות.

ארבע דגימות קשרי הלימפה, שנמצאו חשודות לנוכחות חיידק מהסוג *Mycobacterium* ע"ס ההגברה של מקטע מהגן IS6110, הוגברו עם שלשה תחלים נוספים להגברת מקטעים מהאזור IS1081 ומהגנים oxyR ו- narGHJI כדי לאשש את התוצאות ולזהות את מין החיידק. עבור ארבעת הדגימות החשודות כחיוביות התקבלו הגברות חיוביות עבור IS1081 ו- oxyR (איורים 5 ו 6). תוצרי ההגברה החיוביים נשלחו לקביעת מעקובות דנ"א.

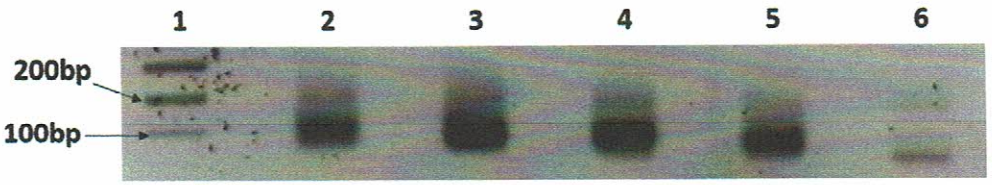
איור 5: הגברה חיובית של החיידק *M. bovis* בדגימות קשרי לימפה של בני בקר



א. תוצרי הגברה למקטע מהאזור IS*1081* באורך של כ- 135 בסיסים מדגימות הרקמה החשודות. 1: סמן גודל DNA, 2-5: הגברות חיוביות, 6: ביקורת חיובית.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

איור 6: תוצרי הגברה למקטע מהגן ***oxyR*** באורך של כ- 200 בסיסים מדגימות הרקמה החשודות.



1 : סמן גודל DNA, 2-5 : הגברות חיוביות, 6 : ביקורת חיובית.

לאור העובדה שאיכות מעקובות הדנ״א היתה ירודה נעשה ניסיון לנקות את תוצרי ההגברה החיוביים מג׳ל האגרוז. תוצרי ההגברה של מקטע IS1081 ו- oxyR נוקו בעזרת קיטQIAquick Gel Ext מג׳ל האגרוז ונשלחו לקביעת מעקובות הדנ״א כדי לאשר את קיום החיידק בדגימה. למרות כל הניסיונות שנעשו איכות מעקובות הדנ״א הייתה ירודה ולא אפשרה קביעת נוכחות החיידק וזיהוי מינו.

<u>נוכחות החיידק *M. bovis* בדגימה על סמך בדיקה מיקרוסקופית</u>: בבדיקה המיקרוסקופית של ארבעת הדגימות לא נמצאו ממצאים של חיידקים יציבי חומצה כדי לחזק את התוצאה, נעשתה בדיקה נוספת ובלתי תלויה, בדיקת Bacilli Fast Acid (AFB) במעבדה לפתולוגיה של השירותים הווטרינרים בבית דגן. גם הבדיקה השנייה נמצאה שלילית עבור חיידקים יציבי חומצה,

דיון

הסקר שבוצע לקביעת שכיחות הנגיעות של עדרי הבקר בישראל לחיידק *M. bovis* מצא שההנחה הרווחת של השרותים הוטרינריים שישראל נקיה ממחלה שחפת הבקר נכונה. במטרה להגדיל את הרגישות והספציפיות של הסקר נעשה שימוש בתחלים שונים המגבירים באופן כללי חיידקים מהסוג *Mycobacterium* ובתחלים המגבירים באופן ספציפי את החיידק *M. bovis* המהווה גורם למחלת שחפת הבקר. במחקר נעשו ניסיונות להגביר את החיידק מדנ״א שהופק מדגימות בהן הסיכוי למציאת החיידק הוא גבוה גם אם הוא מצוי בשכיחות נמוכה, כגון קשרי לימפה. כמו כן, החלב שנדגם היה מפרות בתחלובה חמישית ואילך. גיל זה נחשב יחסית מבוגר בפרות חולבות ועל כן, לא מבוטל להניח כי הסיכוי של פרות אלו להיחשף במהלך חייהן לחיידק עולה.

הדגימות שנסקרו במחקר זה כוללות מספר נרחב של רפתות הפרוס בכל חלקי הארץ כולל רפתות הנמצאות בסמוך לגבולות ישראל. הנחת המחקר הייתה שהחשיפה של עדרי הבקר בישראל לחיידק *M. bovis* יכולה להיות מהאזורים הגיאוגרפיים הסובבים את ישראל ומפרטים מיובאים מחו״ל, בעיקר ממדינות בהן ידוע על קיום מחלת שחפת הבקר. יש לציין, שידוע שבמדינות השכנות לישראל מחלת שחפת הבקר קיימת ושהדיווחים על שכיחותה אינם בנמצא [16]. מכאן, הדיגום משני בתי מטבחיים המקבלים את הדגימות מרפתות שונות בארץ הגדיל את ההסתברות לדגום מגוון גדול יותר של רפתות שיכולות להחשף לחיידק.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

למרות שרב הבדיקות נמצאו שליליות, ארבע בדיקות נמצאו חשודות לנוכחות החיידק *M. bovis* ע"ס ההגברות החיוביות אולם לאור איכות ירודה של מעקובות הדנ"א לא ניתן היה לאשר ממצא זה. העובדה שממצא זה לא נתמך גם ע" הבדיקה המיקרוסקופית אינה פוסלת את התכנות קיום החיידק בדגימה כיוון שהבדיקות המיקרוסקופיות לחיפוש חיידקים עמידי חומצה אינן רגישות דיין כאשר ריכוז החיידקים נמוך. ויש להניח שכמות החיידק בדגימה הייתה נמוכה. מכאן, תשובה שלילית בבדיקה מיקרוסקופית, איננה מהווה תשובה וודאית. החשש כי ארבע הדגימות בהן התקבל סיגנל חיובי אכן נגועות בחיידק ה- *M. bovis* מתחזק לאור העובדה כי מקור ארבעת הדגימות החשודות הוא משלוש פרות חולבות בנות 5-6 שנים, כאמור, סיכוי גבוה יותר שנחשפו לחיידק לאורך חייהן. בנוסף לכך, מקור שלושת הפרות הוא משתי רפתות המצויות בקרבה גיאוגרפית, כך שייתכן כי המקום מהווה מוקד נגיעות של החיידק אשר מקורו יכול להיות מאגר חיות בר מקומי או עבור שתי הפרות מאותה הרפת, ייתכן והייתה הדבקה ביניהן. עבור כל אחת מהפרות הוגברה הדגימה שנלקחה מקשר הלימפה המדיאסטינאלי (ריאתי), ועבור אחת מהן הוגברה גם הדגימה שנלקחה מקשר הלימפה של בלוטת החלב. העובדה כי באחת הפרות נמצא סיגנל חיובי בשני קשרי הלימפה, מהווה מעין חזרה ולכן מחזק את החשד כי אכן מדובר בתוצאת אמת. בהנחה שאכן שלש פרות היו נגועות בחיידק, הן מהוות פחות מאחוז אחד (0.6%) מכלל הפרטים שנדגמו מהם קשרי לימפה ואחוז נמוך יותר מכלל הדגימות (0.43%) במחקר.

התוצאה השלילית בהגברת החיידק בקרב רב הדגימות, בעיקר הגברה של הגן IS6110 המשמש סמן לנוכחות של חיידקים מהסוג *Mycobacterium* יכולה להיות מוסברת כ False negative ולא ניתן להסתמך על תוצאה זו כדי לשלול נגיעות. ולכן, כל הדגימות הוגברו ע"י תחלים בעלי ספציפיות לחיידק *M. bovis* הגורם למחלת שחפת הבקר במטרה להעלות את הסיכויים לקבלת תשובה מדויקת יותר לנוכחות החיידק.

נכון להיום, הסקירה שבוצעה במחקר זה מצאה שהנוכחות של החיידק *M. bovis* בעדרי הבקר לחלב ולבשר בישראל שואפת לאפס. כדי לוודא שישראל נשארת נקייה מהמחלה יש חשיבות בהמשך הניטור כדי למנוע הדבקה בעתיד של חיות המשק יש לוודא שאכן אין הדבקת חיות משק על ידי יבוא עגלים ממדינות מזרח אירופה בהם המחלה נפוצה ו/או על ידי מסחר/הברחות של בעלי חיים מהמדינות השכנות הגובלות עם ישראל בהם דווח על המחלה כמו שקרה באנגליה[29]. ניטור מחלת שחפת הבקר הוא בעל חשיבות רבה לאור ההשלכות הוטרינריות, חקלאיות כלכליות ובריאות הציבור.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il

8. מקורות

1. WHO. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2014. Geneva: The Organization; 2014.
2. Hiko A, Agga GE. 2011. First-time detection of mycobacterium species from goats in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 43(1):133–139.
3. Gowtage-Sequeira S, Paterson A, Lyashchenko KP, Lesellier S, Chambers M A. 2009. Evaluation of the CervidTB STAT-PAK for the detection of Mycobacterium bovis infection in wild deer in Great Britain. *Clin Vaccine Immunol.* 16(10):1449–1452.
4. Cadmus SI, Adesokan HK, Jenkins AO, Soolingen V. 2009. Mycobacterium bovis and M. tuberculosis in goats, Nigeria. *Emerg Infect Dis.* 15(12):2064–2066.
5. De La Rua-Domenech R. 2006. Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 86(2):77–109.
6. Renwick AR, White PCL, Bengis RG. 2007. Bovine tuberculosis in southern African wildlife: a multi-species host–pathogen system. *Epidemiol. Infect.* 135, 529–540.
7. Gilbert M., Mitchell A, Bourn D, Mawdsley J, Clifton-Hadley R, Wint W. 2005. Cattle movements and bovine tuberculosis in Great Britain. *Nature.* 435 (7041): 491-6.
8. Pinsky BA, Banaei N. 2008. Multiplex real-time PCR assay for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex members to the species level. *J Clin Microbiol.* 46(7):2241–2246.
9. Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8(8):924–937.
10. Mor Z, Pinsker G, Cedar N, Lidji M, Grotto I. 2012. Adult tuberculosis in Israel and migration: Trends and challenges between 1999 and 2010. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(12):1613–1618.
11. Zinsstag J, S.E., Roth F, Kazwala R. 2006. Economics of Bovine Tuberculosis, second Edition. *Blackwell,* Boston.
12. Medeiros L, Marassi CD, Duarte RS, da Silva MG, Lilenbaum W. 2012. Comparison of decontamination methods for primary isolation of Mycobacterium bovis in paucibacillary bovine tissues. *Lett Appl Microbiol.* 54(3):182–186.
13. Etter E, Donado P, Jori F, Caron A, Goutard F, Roger F. 2006. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1081:61–73.
14. Smith RM, Drobniewski F, Gibson A, Montague JD, Logan MN, Hunt D, Hewinson G, Salmon RL, O'Neill B. 2004. Mycobacterium bovis infection, United Kingdom. *Emerg Infect Dis.* 10(3):539–541.
15. Bakshi CS, Shah DH, Verma R, Singh RK, Malik M. 2005. Rapid differentiation of Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet Microbiol.* 109(4):211–216.
16. Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. 2005. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis and Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC). *Vet Res.* 36:411–436.
17. Buddle BM, Keen D, Thomson a, Jowett G, McCarthy a R, Heslop J. 1995. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or

subcutaneous route, but not by vaccination with killed Mycobacterium vaccae. *Res Vet Sci.* 59(1):10–16.

18. Aznar I, Frankena K, More SJ, Whelan C, Martin W, Gormley E, Corner L.A.L, Murphy D, De Jong MCM. 2014. Optimising and evaluating the characteristics of a multiple antigen ELISA for detection of Mycobacterium bovis infection in a badger vaccine field trial. *PLoS One*. 9(7), e100139.
19. WHO, 1994. Zoonotic tuberculosis (Mycobacterium bovis): memorandum from a WHO meeting (with the participation of FAO). *Bull World Health Organ* 72, 851-857.
20. OIE. Doha (Qatar), 26-29 October 2009. 10th Conference of the OIE Regional Commission for the Middle East.
21. Shimshony A, 1992. Veterinary public health in Israel. *Rev Sci Tech* 11, 77-98.
22. Ereqat S, Nasereddin A, Levine H, Azmi K, Al-Jawabreh A, Greenblatt CL, Abdeen Z, Bar-Gal GK. 2013. First-time detection of Mycobacterium bovis in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(9):e2417.
23. Daley P, Michael JS, Kalaiselvan S, Latha A, Mathai D, John KR, Pai M. 2009. A pilot study of short-duration sputum pretreatment procedures for optimizing smear microscopy for tuberculosis. *PLoS One*. 4(5), e5626.
24. Srisuwanvilai LO, Monkongdee P, Podewils LJ, Ngamlert K, Pobkeeree V, Puripokai P, Kanjamongkolsiri P, Subhachaturas W, Akasewi P, Wells CD, Tappero JW, Varma JK. 2008. Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of Mycobacterium in Bangkok, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 61(4):402–407.
25. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, et al. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28: 495-503.
26. Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* 21: 3913-3914.
27. Roca AL, Bar-Gal GK, Eizirik E, Helgen KM, Maria R, et al. (2004) Mesozoic origin for West Indian insectivores. *Nature* 429: 649-651
28. Ereqat S, Bar-Gal GK, Nasereddin A, Azmi K, Qaddomi SE, Greenblatt CL, Spigeiman M, Abdeen Z. 2010. Rapid differentiation of Mycobacterium tuberculosis and M. bovis by high-resolution melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 48(11):4269–4272.
29. Bonsu O a., Laing E, Akanmori BD. 2000. Prevalence of tuberculosis in cattle in the Dangme-West district of Ghana, public health implications. *Acta Trop*. 76(1):9–14.

בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, רחובות 76100
טל': 08-9489888 | פקס: 08-9467940 | gila.kahila@mail.huji.ac.il