

## השפעת נוכחות מיקרוקוקים בעטין על המערכת החיסונית והקשרה למנגונוי ההגנה של הפרה כלפי מחלות עטין קליניות ותת-קליניות

### I. מעקב לאורך התחלובה הראשונה: מ-100 יום לאחר ההמלטה ועד לייבוש

שפר מ., ג. לייטנר, א. קריפוקס, א. עזרא\*, א. גליקמן, מ. וינקלר, ל. ויסבלט, ו.א. שרן המח' למחלות עטין, המכון הווטרנרי ע"ש קמרון, בית דגן; \*התאחדות מגדלי בקר

של חידקים אלה בישראל בשנת 1995 היתה ברמה של 9.85% (Saran et al, 1995) (טבלה 2). מחלות עטין תת-קליניות אלה מאופיינות בהרס רקמות בלוטת העטין, ירידה בתנובת החלב ועליה ברת"ס. חלק מהמחלות התת-קליניות וכרוניות של העטין מסוגלות להפוך במהלך כל תחלובה להתלקחויות אקוטיות (דלקת-עטין קלינית) של מספר ימים ובהמשך המחלה עוברת למצב תת-קליני עד להתלקחות קלינית נוספת. בדרך כלל מדובר במקרה אחד בתחלובה. לקבוצת חידקי הסטפילוקוקים אשר אינם מייצרים קואגולו (CNS) לא מיוחסת כל חשיבות וההתייחסות העכשווית לקבוצת חידקים זאת היא כאל חידקים משניים בלתי אלימים עם אזכורים במקרים מסויימים של סימונים תת-קליניים ועליה ברת"ס (1988) Hodges et al. (Trinidad). בעבודתם של (1985) Hodges et al. הוגדרו 7.8% מהחידקים אשר בודדו ממקרי

#### מבוא

קבוצת חידקי Micrococcaceae כוללת את המזהמים העיקריים של בלוטת העטין בפרות. משפחה זאת של חידקי cocci (גרם וקאטלו חיוביים) מכילה 4 סוגים (genera), מתוכם Staphylococcus (S.) ו-Micrococcus (Mic.), המאכלסות ברמות שונות את בלוטות העטין (טבלה 1). סוגי Mic. varians, Mic. roseus בעלי תכונה של אייזירת קואגולו בפלסמה של ארנבת אובחנו על עור בעלי-חיים, מים ובחלב פרות. חידק זה אינו גורם לסימונים קליניים או תת-קליניים בעטין הפרה אך במקרים בודדים נוכחות החידק לוותה בעליה ברמת תאים סומטיים (רת"ס) (Saran, 1986; Gilmour & Rowe, 1990). סוגי הסטפילוקוקים מכילים 23 מינים (species), אשר מתוכם בודדו 14 מבלוטת עטין של פרות (Watts, 1987). סוג זה מתחלק לשתי קבוצות עיקריות על פי היכולת ליצירת קואגולו בפלסמה של ארנבת. קבוצת החידקים המייצרים קואגולו S. (coagulase-positive) aureus ו-S. intermedius ומינים בודדים אחרים של S. hyicus גורמים למחלות עטין תת-קליניות, כאשר העיקרי ביניהם הוא סטפ' אוראוס (S. aureus) (1995) (Vecht).

טבלה 1. סיווג של מיקרוקוקים Family Micrococcaceae.

משפחה	סוג	מין	
Micrococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus aureus, S. intermedius S. hyicus	Coagulase +
		Staphylococcus chromogenes, S. haemolyticus, S. hominis, S. hyicus, S. simulans, Other	Coagulase -
	Micrococcus	M. roseus M. varians	
	Planococcus Stomatococcus		

al. (1991) מראים, כי נוכחות CNS בבלוטת העטין מעלה את סיכוי ההדבקות בחידיקי *Streptococcus agalactiae* וחוקרים אחרים דיווחו על שינויים בסיכויי ההדבקה בין רבעי עטין גועים ב-CNS ורבעי עטין ללא ממצא חידיקי. שונות רבה זאת בדיווחים מקורה כנראה בהתייחסות הכוללת לקבוצה הטרוגנית של חידיקים מסוג Mic ו-CNS ומכאן החשיבות למחקר פרטני יותר, אשר יגדיר את החידיקים השונים מקבוצת חידיקי ה-CNS המזהמים את בלוטת העטין ויבדוק את הקשר בין התגובה החיסונית לחידיק יחודי וכן את סיכוי בלוטת עטין מזהמת להידבק בגורם פתוגני אחר.

מחקר רטרוספקטיבי שבוצע בפינלנד (Myllys et al., 1994) על גורמי מחלות העטין התת-קליניות העיקריות בין השנים 1939–1990 מצביעה על עליה בשכיחות של חידיקי ה-CNS. בשנות ה-40 וה-50 החידיק העיקרי היה *Streptococcus agalactiae*. בעקבות המעבר לחליבה מכנית ושימוש מוגבר באנטיביוטיקה בשנות ה-60 חלה ירידה בהימצאות חידיקים אלה ועליה בחידיקי *S. aureus*. ממשק חליבה נכון והוצאת פרות עם תאים סומטיים גבוהים הקטין את נוכחותו של *S. aureus* כגורם עיקרי ובמקביל עלתה חשיבותם של חידיקי ה-CNS כגורמים מזהמים בעדר החלב.

מטרת המחקר היתה להגדיר מיני חידיקים CNS ו-Mic המזהמים את בלוטת העטין בפרות חולבות, ללמוד את השינויים החלים בבלוטה בעקבות הזיהום ולבחון את סיכויי הפרה/הבלוטה המזהמת להידבק בחידיק פתוגני אחר/נוסף.

### חומרים ושיטות

#### בעלי חיים

עשרים וארבע מבכירות משני משקים נכללו בניסוי. הפרות נבחרו ע"פ נוכחות או אי-נוכחות מזהם חידיקי מקבוצת ה-Mic ו-CNS. המזהם בבלוטת העטין בכל רבע עטין נקבע ע"פ שלוש בדיקות עוקבות (שבוע בין בדיקות עוקבות) בסביבות 100 יום לאחר ההמלטה. ממשק החזנה והחליבה, כולל מעבר המבכירות מקבוצה

טבלה 2. נוכות מיקרוקוקים בישראל ב-1995 על פי בדיקות המעבדות האזוריות לחלב.

מחולל	שכיחות (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.85
Coagulase negative staphylococci	14.84
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.92
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1.56
<i>Streptococcus uberis</i>	1.41
Coliform bacteria	7.40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.14
<i>Actinomyces pyogenes</i>	1.06
Other pathogens	3.25
סה"כ שכיחות	40.43

דלקת קלינית ותת-קלינית (רת"ס  $< 500 \times 10^3$ ) כחידיקים מקבוצת ה-CNS. תצפיות נוספות ביניהם של Calzolari et al (1995) דיווחו על 43.9% מסה"כ הבידודים מעטיני פרות "בריאות" כשייכים לקבוצת חידיקים זו. במחקרים אחרים נבדקו השפעתם של חידיקים מקבוצה זאת בעטין על סיכויי הדבקה באותו הרבע ע"י חידיקים פתוגניים ונמצא, כי בלוטות עטין אלה פחות רגישות להדבקה בחידיקי *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* ו-*S. aureus* (Poutrel & Lerondelle, 1980; Bramley, 1978; Linde et al. 1975, 1980). Nickerson & Boddie (1994), מסכמים מחקרים רבים בכך, כי נוכחות CNS בתוך בלוטת העטין מגנה מהדבקות בגורם חידיקי נוסף, יתכן כתוצאה אפשרית מעליה ברת"ס ו/או נוכחות גורמים אנטיביוטיאליים. יחד עם זאת, אותם חוקרים ואחרים כמו Matthews et

לרת"ס) נבדקה ע"י סימון התאים השונים בנוגדנים חד-שבטיים ואנליזה ע"י מכשיר Flow Cytometer (FACS). תאי מערכת החיסון שהוגדרו היו: נוטרופיליים, מקרופאגים, לימפוציטים מסוג T<sup>+</sup> B ונושאי קולטנים CD<sup>4+</sup> או CD<sup>8+</sup>. דרך הדיגום, הנוגדנים החד-שבטיים והשימוש במכשיר FACS לזיהוי התאים הלבנים בחלב מסוכם במאמר שנשלח לפרסום ב־ (Leitner et al) J. Dairy Sci.

**מהלך הניסוי**

פרה הוכנסה לניסוי בין 100–120 יום לאחר ההמלטה הראשונה. על מנת לקבוע את המצב ההתחלתי של העטין נבחנה כל פרה, ברמה של רבע עטין, שלוש פעמים עם כניסתה לניסוי (שבוע בין בדיקה לבדיקה). עם כניסת הפרות לניסוי נלקח חלב מכל רבע עבור בדיקה בקטרילוגית והבדיקות הנלוות. בהמשך, כל 60 יום נלקחו דוגמאות עבור בדיקות בקטרילוגיות (שלוש בדיקות עוקבות, יום אחרי יום) והבדיקות הנלוות עד כניסת הפרות ליובש לקראת ההמלטה השנייה. בנוסף לבדיקות יזומות אלה התבצע מעקב יומי/שבועי של חריגת הפרות בניסוי ע"י החולבים ו/או ע"י זיהוי חריגות באמצעות מערכת "אפמיילק". כל פרה שחרגה (פרט לחריגות כתוצאה מדרישה) נבדקה בזמן החריגה.

**מבחנים סטטיסטיים**

הנתונים נותחו באמצעות GLM, SAS (general linear model procedure). הגורמים הבלתי-תלויים היו: רבע, יום הדיגום, המצב הבקטרילוגי על פי סוג והשפעות הגומלין ביניהם. הגורמים התלויים היו: רת"ס (ערך לוגריטמי CMT, L<sub>n</sub>), NAGase, מספר מוחלט והתפלגות באחוזים של תאי מערכת החיסון.

**תוצאות**

לא נמצאו הבדלים מובהקים בין שני המשקים בכל המדדים ולכן התוצאות מובאות עבור כל אוכלוסית המבכירות ביחד. מתוך 96 רבעים (24 מבכירות) 62 רבעים הוגדרו בלי

לקבוצה, בוצע בכל משק ללא קשר לניסוי.

**איבחון בקטרילוגי**

איבחון בקטרילוגי נעשה לפי Brown et al (1981) ע"י המעבדה למחלות עטין – בית דגן. מכל דוגמה 0.01 מ"ל חלב נזרע על צלחת אגר המכילה 5% דם רחוף של כבש והצלחת הודגרה ב־37 מ"צ במשך 24 שעות. הגדרת החידקים הבסיסית בוצעה על פי מופע המושבה, צבע, תכונות המוליטיות וכו'. מושבות שהוגדרו כחידקי cocci גרם-חיוביים נבחנו לתגובת קטלאז על מנת להפריד בין סטפילוקוקים וסטטרפטוקוקים. מושבות החידקים אשר הובחנו חיובית עם מבחן הקטלאז נבחנו בהמשך ליצירת קואגולז בפלסמה ארנבת. חידקי הקואגולז השלילי הוגדרו על פי שיטתו של Giger et al. (1984) ע"י מערכת API staph-system (Bio Merieux) (S.A. Lyon, France).

**דיגום**

כל בדיקות החלב נלקחו מכל רבע בנפרד. הדוגמאות נלקחו בזמן חליבת הבוקר. כל פטמה נוקתה וחוטאה, שלושה צלפים של חלב הוצאו מכל רבע והפטמה חוטאה שנית. צלף (3–5 מ"ל) חלב נחלב למבחנה סטרילית והועבר לקרח. עבור הבדיקות הבקטרילוגיות בהמשך נחלבו 50 מ"ל נוספים וחלב זה שימש עבור ערכת בדיקות בחלב שכללה רת"ס, CMT, NAGase, וספירה מبدלת.

**ערכת בדיקות פיסילוגיות וחיסוניות**

כל דוגמת חלב חולקה לאחר ערבוב עדין למספר בדיקות שכללו: רת"ס, (נקבע גם באמצעות Coulter Electronics) Coulter Counter (Limited, Luton, England) רמת אנזים N acetyl-bD glucosaminidase (NAGase) נבחנה באמצעות ערכה (ADC) לפי שיטתו של (1981) Kitchen ושינויים של Mattila (1985). מבחן California Mastitis Test (CMT) בוצע ע"פ שיטתם של Schalm and Noorlander, (1957). תאי מערכת החיסון בחלב (ספירה מبدלת

מזדמנים. בניסוי כל פרה נבחנה 3–4 פעמים לאורך התחלובה. החזרתיות ברמה של רבע מבחינת הזיהום החידיקי נמצאה מובהקת ( $P < 0.001$ ). רבע אשר הוגדר בבדיקה הראשונה כ-במב או מזוהם באחד המינים של CNS נשאר באותה ההגדרה במשך השנה בבדיקות עוקבות. תוצאה זאת נכונה ברמה של מין החידיק. אחוז הרבועים

ממצאים בקטריולוגיים (במב). החידיקים אשר נמצאו כמוזמהים העיקריים ברבעים הנגועים (34) היו *S. haemolyticus*, *S. intermedius* ו-*S. chromogenes*. בשלושה רבעים נמצאו חידיקי *S. aureus* וכן בשלושה נוספים מוזמהים אשר אינם שייכים לקבוצת המיקרוקוקים. חידיקים אלה נמצאו רק באחת הבדיקות ולכן נחשבו למוזמהים

טבלה 3. ממוצע וסטית התקן של רת"ס, NAGase ו-CMT של רבעי עטין נגועים בחידיקי סטפילוקוקים קואגולז-שליליים (CNS) לפי מין החידיק או ב-*Staph. aureus*.

	SCC (x 1.000)	Log 2 SCC	NAGase	C.M.T
<i>S. aureus</i>	182.66±183.99	6.90±1.40	9.68±8.85	0.66±0.86
<i>S. intermedius</i>	201.70±199.05	7.17±1.17	6.47±5.19	0.80±0.95
<i>S. haemolyt.</i>	122.38±133.83	6.39±1.18	4.38±3.41	0.15±0.37
<i>S. chromog.</i>	199.43±229.82	6.93±1.42	5.82±7.21	0.48±0.61

טבלה 4. ממוצע (Log 2) וסטית התקן של לימפוציטים, CD4, CD8, PMN, נוטרופילים ומונוציטים של רבעי עטין נגועים בחידיקי סטפילוקוקים קואגולז-שליליים (CNS) לפי מין החידיק או *S. aureus*.

	Lymph.	CD4	CD8	Mono.	PMN	Neut.
<i>S. aur.</i>	3.88±1.38	2.00±1.51	2.96±1.61	3.85±1.90	5.94±1.88	5.50±2.13
<i>S. int.</i>	3.16±1.36	1.66±1.62	2.44±1.81	3.80±1.85	6.52±1.51	5.96±1.97
<i>S. haem.</i>	2.23±1.45	0.57±1.53	1.17±1.46	2.53±1.51	5.62±1.55	5.08±1.55
<i>S. chrom.</i>	3.42±1.44	1.19±1.79	2.14±1.60	3.75±1.79	6.30±1.71	5.61±1.73

טבלה 5. ממוצע וסטית התקן של רת"ס, NAGase, ו-CMT של רבעי עטין בלי ממצאים בקטריאליים (ב.מ.ב.) או נגועים בחידיקי סטפילוקוקים קואגולז-שליליים (CNS).

	SCC (x 1.000)	Log 2 SCC	NAGase	C.M.T
ב.מ.ב.	69.22±124.00	5.58±0.98	4.81±7.55	
C.N.S	189.87±192.00	7.01±1.26	6.76±6.97	0.60±0.7

טבלה 6. ממוצע וסטית התקן של לימפוציטים, CD4, CD8 ו-CD8 של רבעי עטין בלי ממצאים בקטריאליים (ב.מ.ב.) או נגועים בחידיקי סטפילוקוקים קואגולז-שליליים (CNS).

	Lymph. (%)	Log 2 Lym	CD4 (%)	Log 2 CD4	CD8 (%)	Log 2 CD8
ב.מ.ב.	23.37±10.19	3.32±1.10	5.42±4.50	1.06±1.34	11.73±6.90	2.21±1.20
C.N.S	12.19±9.23	3.47±1.50	3.32±4.69	1.37±1.66	5.87±5.24	2.27±1.75

טבלה 7. ממוצע וסטית התקן של PMN, נוטרופילים ומונוציטים של רבעי עטין בלי ממצאים בקטריאליים (ב.מ.ב.) או נגועים בחידיקי סטפילוקוקים קואגולז-שליליים (CNS).

	Mon. (%)	Log 2 Mon.	PMN Gate (%)	Log 2 PMN	Neut. (%)	Log 2 Neu.
ב.מ.ב.	10.51±7.52	1.96±1.46	45.95±16.81	4.36±1.14	24.25±17.41	3.31±1.61
C.N.S	12.22±7.27	3.66±1.81	65.82±17.97	6.34±1.55	47.46±21.54	5.73±1.82

**דיון וסיכום**

תוצאות אלה מצביעות על זיהום כרוני, תת-קליני של בלוטת העטין ע"י חידקי CNS. כמעט כל הרבעים אשר נמצאו מזוהמים באחד ממיני החידק בבדיקה הראשונה היו מזוהמים באותו חידק 100 יום לאחר ההמלטה. לאורך כל התחלובה הראשונה, בכל המדדים אשר נבחנו, לא נמצאו הבדלים מובהקים בין רבעי עטין מזוהמים באחד מחידקי CNS ואלה אשר נמצאו מזוהמים בחידקי S. aureus, תוצאה המצביעה על השפעה דומה של החידקים לפחות עד לייבוש וכניסה להמלטה שניה. חידקי CNS גרמו לעליה מובהקת ברת"ס, כאשר המרכיב העיקרי בעליה זאת נבע מעליה בתאי PMN, בעיקר נויטרופילים. תוצאות אלה מעלות מחשבה מחודשת לגבי חלקם של חידקי ה-CNS בדלקות עטין תת-קליניות וקליניות. 40% מסה"כ המבכירות הנבחנות היו חיוביות ל-S. aureus.

בשלב זה של הניסוי הפרות נמצאות בשלבי יובש שונים לקראת ההמלטה השניה. הקשר בין הימצאות מזהם חידקי ברבע עטין ובין המצב לאחר ההמלטה ייבחנו בהמשך הניסוי. לאור תוצאות אלה לא היה ניתן לבחון קשר בין מזהם ברבע מסויים ובין שינוי בסטטוס – ניקוי או זיהום בחידק אחר/נוסף, 94% מהרבעים לא שינו את הסטטוס הזיהומי לאורך התחלובה.

**ספרות**

מטעמים טכניים לא מובאת כאן רשימת הספרות המקיפה והענפה, יותר מעשרים איזכורים. הקורא המתעניין יוכל לקבלה אצל המחברים.



אשר "התנקו" (נמצא חידק בבדיקה אחת ולא בבדיקה עוקבת) עמד על 3%. אחוז הרבעים אשר הזדהמו במשך הניסוי (רבע נגוע בחידק בבדיקה שלפניה לא נמצא מזהם) עומד על 3%. 94% מכלל הרבעים המזוהמים או במב לא שינו את הגדרתם.

לא נמצאו הבדלים מובהקים בכל המדדים בין המינים השונים של המיקרוקוקים שנמצאו בעטין (טבלאות 3-4) פרט לאנזים NAGase. נמצא דמיון ברת"ס CMT, ובספירה מבדלת בין כל החידקים, בעוד שברמת אנזים NAGase בחלב מהרבעים המזוהמים ב-S. aureus נמצאה רמה גבוהה יותר בגבול המובהקות. על פי תוצאות אלה הניתוח בוצע בין רבעים המוגדרים כ-במב ובין רבעים המוגדרים כמזוהמים בחידקי CNS (לא כולל את הרבעים אשר נמצאו מזוהמים בחידקי S. aureus).

נמצאו הבדלים מובקים (P<0.05) ברת"ס, CMT ו-NAGase בין רבעים המוגדרים כ-במב ובין הרבעים המוגדרים כ-CNS (טבלה 5). כל המדדים האלה נמצאו גבוהים יותר בחלב מהרבעים הנגועים במזהם החידקי.

ניתוח תוצאות הספירה המבדלת מובאים הן באחוז התאים (יחס) והן במספר המוחלט (אחוז התאים מתוך הרת"ס). אחוז הלימפוציטים הכללי והלימפוציטים מסוג T נושא הקולטן CD4+ או CD8+ היה גבוה ברבעים המוגדרים כ-במב אך מובהק (p<0.05) רק לגבי כלל הלימפוציטים ולימפוציטים מסוג T נושא קולטן ל-CD8+ (טבלה 6). לא נמצאו הבדלים במספר הלימפוציטים הכללי ונושאי קולטנים ל-CD4+ או CD8+. מספרם היה דומה בשתי הקבוצות. לא נמצא הבדל באחוזי המונוציטים אך נמצא הבדל מובהק במספרם (P<0.05) (טבלה 7).