

קוד זיהוי	א. נושא המחקר (בעברית)
847 - 0341 - 11	הערכת המעורבות של הדבקה ב- <i>Mycoplasma bovis</i> וגורמים וירליים ובקטריאליים אחרים בתחלואה נשימתית וקביעת הקשר לפסילת כשרות בעגלי פיתום

ב. צוות החוקרים					
קוד המחלקה	שם המוסד	שם המחלקה	שם פרטי	שם משפחה	ראשי
847	המכון הווטרינרי	מחלות עופות	אינה	ליסניסקי	
חוקרים משניים					
847	המכון הווטרינרי	מחלות עופות	אירנה	גרשמן	1
	המכון הווטרינרי	חטיבה לבקטריולוגיה	שלומו	בלום	2
	המכון הווטרינרי	חטיבה לפתולוגיה	שמואל	פרל	3
	המכון הווטרינרי	חטיבה לוירולוגיה	אורלי	פרידגוט	4
	חקלאית, קיסריה		בני	שריר	5
705	האוניברסיטה העברית	ביה"ס לרפואה וטרינרית	אייל	קלימנט	6

ד. אתרי הניסוי הקפד לרשום את המקום במדויק עפ"י המילון המצורף להנחיות	
קוד מקום	שם המקום
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	

ג. עלות המחקר פרוט תקציב המחקר			
סוג ההוצאה	סכום באלפי ש"ח	סכום במט"ח	סוג מט"ח
עובדי תקן*	180		
עובדים ארעיים*			
נסיעות ואשל בארץ*	5		
חומרים וציוד מתכלה*	60.8		
ציוד קבוע*			
שירותי חוות*			
נסיעות ואשל בחו"ל*			
שונות*			
תפעול ותחזוקה של מתקני מחקר חקלאי			
תקורה 20%	13.2		999
סה"כ	259		

ה. מקורות מימון מהם מבוקש תקציב המחקר				
קוד מקור מימון	סוג מט"ח	סכום במט"ח	סכום באלפי שקלים	שם מקור המימון
02-0042			180	מוסד המחקר המבצע (סך התקציב שיועד למחקר שלא ממקורות מימון מבוקשים)
02-0021			79	הנהלת ענף הבקר
			259	סה"כ

ו. כללי						
סוג התוכנית מחקר	סטטוס התוכנית חדשה	תחלת המחקר שנה חודש	תאריכים סיום משוער של המחקר שנה חודש	ניסויים בבט"ח לא	ניסויי שדה בצמחים מהונדסים לא	בפתוגניים מסוכנים לא
מחקר	חדשה	02 / 2009	12 / 2011	לא	לא	לא

לשימוש היחידה לתוכנית עבודה ותקציב

שנת שיפור מדעי

תאריך קבלה

קוד זיהוי קודם

**במידה ופרוט התקציב ניתן בשקלים ציין את שווה-ערך הדולר על-פיו נערך התחשיב: שקל = \$1

קוד זיהוי	
12	847 - 0341

ז. פרטי החוקר הראשי		מס' תעודת זהות	שם החוקר באנגלית
מין	תואר		
אקדמי	אם כתובתך הקבועה באחת מחוות המחקר הבאות סמן X		
זכר	PhD	305924284	פרטי FIRST NAME משפחה SURNAME
	<input type="checkbox"/> נווה יער <input type="checkbox"/> גילת		LYSNYANSKY INNA

ח. נושא המחקר באנגלית RESEARCH TITLE

Evaluation of the role of *Mycoplasma bovis* and other viral and bacterial pathogens in bovine respiratory diseases and kashrut condemnation of feedlot cattle

ט. מילות מפתח השלם עפ"י הצורך את מילות המפתח המתאימות לנושא המחקר * (הערה למטה)

י. תקציר שים לב - על התקציר לכלול את מטרת המחקר, חשיבותו, שיטותיו, תכנית העבודה, ותוצאות קודמות (באם קיימות)

חיידק *Mycoplasma bovis* (MB) מוכר היום כאחד הגורמים העיקריים לפגיעה כלכלית בתחום משקי הבקר. בישראל, המופע העיקרי המשווה ל-MB הינו דלקת ריאות או מחלת נשימה (Bovine respiratory disease; BRD) בעגלים צעירים הנמצאים במפטמות. בנוסף לכך, בשנים האחרונות אובחנו מספר התפרצויות של BRD במשלוחים של עגלים שיובאו לישראל והוחזקו בהסגר עם אבחון של MB. ידוע כי גורמי עקה שונים עשויים לגרום לביטוי של זיהומים לטנטיים. יתר על כן, קנייה והכנסת בעלי חיים חדשים לעדר קיים עלולים לגרום למעבר של MB לאוכלוסייה נאיבית של בקר או לחשוף אותם לזן אלים יותר. מכיוון שמדינת ישראל מייבאת עגלים בכמות גדולה ממספר מדינות מאירופה ומאוסטרליה, חשוב להבין מה היא דינאמיקת ההדבקה והתפשטות של החיידק MB במפטמה.

מטרות המחקר הנוכחי היו לעקוב אחר דינאמיקת ההדבקה ב-MB במפטמה ולהעריך את המעורבות של החיידק MB ב-BRD בישראל. תוצאות שהתקבלו מדיגום עגלים בשתי מפטמות (B ו-S) לאורך זמן, הראו בבירור שבקר מיובא אכן יכול לשמש כמקור להדבקה של הבקר המקומי. במחקר הנוכחי לא נצפה קשר בין היפוך סרולוגי לבין ירידה במשקל או המצב הבריאותי של העגלים. בנוסף, לא נמצא קשר מובהק בין תוצאות בדיקת הכשרות לבין נוכחות של MB (או מיקופלסמות אחרות), סטטוס סרולוגי או תוצאה פתולוגית. סיווג מולקולרי שבוצע על בידודי MB באמצעות שיטת ה-Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) הראה נוכחות של גנוטיפים שונים של החיידק MB בשני המשקים. בנוסף, במשק B נתגלו לפחות שתי אוכלוסיות שונות של חיידקים: אחת "מקומית" ואחד "מיובאת" שלא התערבבו ביניהן, לפחות בעגלים שנבדקו. לעומת זאת, תוצאות הסיווג במשק S הצביעו על הדבקה של הבקר המקומי על ידי חשיפה לחיידקי MB "שהגיעו" עם הבקר המיובא. יחד עם זאת, בבקר מקומי במשק S התגלה גם חיידק MB עם גינטיפ שונה מאלו שנמצאו בבקר הליטאי, דבר שמצביע על מספר מקורות הדבקה של הבקר הישראלי במשק S. מעורבות של MB ב-BRD נבדקה בדגימות שהגיעו מארבעה משקים (סה"כ 41 עגלים). החיידק MB זוהה ב-18/41 עגלים (3/4 מפטמות), כאשר בשתי מפטמות (מס' 2 ו-4) שכיחות החיידק הייתה גבוהה (80% (8/10) ו-90% (9/10) אילו במפטמה מס' 1 רק עגל אחד היה חיובי ל-MB. אחוז העגלים עם כייל נוגדנים כנגד MB נע בין 0-80. בדגימות TTA שנלקחו במפטמות מס' 1, 2 ו-4 נתגלה זיהום מעורב ב-MB ו-*Mycoplasma dispar* (MD) התגלתה ב-1/11 (9%), ב-6/10 (60%) ו-50% (5/10) דגימות, בהתאמה, כאשר במפטמה מס' 3 אובחנה רק MD ב-7/10 דגימות TTA. בנוסף, 50% ו-30% מדגימות במפטמות 2 ו-4, בהתאמה היו חיוביות ל-*Pasteurella multocida*, תוצאה שמצביעה על מעורבות רב גורמית ב-BRD במפטמות האלו. יש לציין שמכיוון שמשקי המשקים עם סימני BRD שנבדקו היה קטן (4), אין להגיע למסקנה כוללת על מעורבות של MB במחלה הזאת בישראל.

חתימת החוקר הראשי מאשרת שהוא וודא את הסכמת כל החוקרים הרשומים להצעת המחקר ולהשתתפותם בה.

תאריך	ת"ע ותקציב
תאריך	יו"ר בשיפוט

תאריך	חוקר ראשי
תאריך	מנהל המחלקה
תאריך	מנהל המכון (הפקולטה)
תאריך	אמרכלות (רשות המחקר)

תקציר

חיידק *Mycoplasma bovis* (MB) מוכר היום כאחד הגורמים העיקריים לפגיעה כלכלית בתחום משקי הבקר. בישראל, המופע העיקרי המשווה ל-MB הינו דלקת ריאות או מחלת נשימה (Bovine respiratory disease; BRD) בעגלים צעירים הנמצאים במפטמות. בנוסף לכך, בשנים האחרונות אובחנו מספר התפרצויות של BRD במשלוחים של עגלים שיובאו לישראל והוחזקו בהסגר עם אבחון של MB. ידוע כי גורמי עקה שונים עשויים לגרום לביטוי של זיהומים לטנטיים. יתר על כן, קנייה והכנסת בעלי חיים חדשים לעדר קיים עלולים לגרום למעבר של MB לאוכלוסייה נאיבית של בקר או לחשוף אותם לזן אלים יותר. מכיוון שמדינת ישראל מייבאת עגלים בכמות גדולה ממספר מדינות מאירופה ומאוסטרליה, חשוב להבין מה היא דינאמיקת ההדבקה והתפשטות של החיידק MB במפטמה.

מטרות המחקר הנוכחי היו לעקוב אחר דינאמיקת ההדבקה ב-MB במפטמה ולהעריך את המעורבות של החיידק MB ב-BRD בישראל.

תוצאות שהתקבלו מדיגום עגלים בשתי מפטמות (B ו-S) לאורך זמן, הראו בבירור שבקר מיובא אכן יכול לשמש כמקור להדבקה של הבקר המקומי. במחקר הנוכחי לא נצפה קשר בין היפוך סרולוגי לבין ירידה במשקל או המצב הבריאותי של העגלים. בנוסף, לא נמצא קשר מובהק בין תוצאות בדיקת הכשרות לבין נוכחות של MB (או מיקופלסמות אחרות), סטטוס סרולוגי או תוצאה פתולוגית.

סיווג מולקולרי שבוצע על בידודי MB באמצעות שיטת ה-Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) הראה נוכחות של גנוטיפים שונים של החיידק MB בשני המשקים. בנוסף, במשק B נתגלו לפחות שתי אוכלוסיות שונות של חיידקים: אחת "מקומית" ואחד "מיובאת" שלא התערבבו ביניהן, לפחות בעגלים שנבדקו. לעומת זאת, תוצאות הסיווג במשק S הצביעו על הדבקה של הבקר המקומי על ידי חשיפה לחיידקי MB "שהגיעו" עם הבקר המיובא. יחד עם זאת, בבקר מקומי במשק S התגלה גם חיידק MB עם גינוטיפ שונה מאלו שנמצאו בבקר הליטאי, דבר שמצביע על מספר מקורות הדבקה של הבקר הישראלי במשק S. מעורבות של MB ב-BRD נבדקה בדגימות שהגיעו מארבעה משקים (סה"כ 41 עגלים). החיידק MB זוהה ב-18/41 עגלים (3/4 מפטמות), כאשר בשתי מפטמות (מס' 2 ו-4) שכיחות החיידק הייתה גבוהה (80% (8/10) ו-90% (9/10)) אילו במפטמה מס' 1 רק עגל אחד היה חיובי ל-MB. אחוז העגלים עם כייל נוגדנים כנגד MB נע בין 0-80. בדגימות TTA שנלקחו במפטמות מס' 1, 2 ו-4 נתגלה זיהום מעורב ב-MB ו-*Mycoplasma dispar* (MD) התגלתה ב-1/11 (9%), ב-6/10 (60%) ו-5/10 (50%) דגימות, בהתאמה, כאשר במפטמה מס' 3 אובחנה רק MD ב-7/10 דגימות TTA. בנוסף, 50% ו-30% מדגימות במפטמות 2 ו-4, בהתאמה היו חיוביות ל-*Pasteurella multocida*, תוצאה שמצביעה על מעורבות רב גורמית ב-

BRD במפטמות האלו. יש לציין שמכיוון שמש' המשקים עם סימני BRD שנבדק היה קטן (4), אין להגיע למסקנה כוללת על מעורבות של MB במחלה הזאת בישראל.

מבוא

חיידק *Mycoplasma bovis* (MB) מוכר היום כאחד הגורמים העיקריים לפגיעה כלכלית בתחום משקי הבקר, כתוצאה ממוות של בני בקר, מפגיעה במשקלם או מפגיעה במשק החלב. אומדנים הצביעו על נזק של כ-150 מיליון אירו (ביבשת אירופה) ומעל 100 מיליון דולרים בארה"ב, בכל שנה (Nicholas and Ayling, 2003). *M. bovis* גורמת למגוון מחלות בבקר כגון דלקת ריאות, דלקות עטין, דלקות פרקים ורקמות חיבור, דלקות עיניים (keratoconjunctivitis), דלקות אוזניים ופגיעות במערכת המין (הזכרית והנקבית) (Nicholas and Ayling, 2003; Caswell and Archambault, 2007). בנוסף, מספר מחקרים מאשרים ש-MB הינו אחד החיידקים הנפוצים שמבודדים ממקרי ה- chronic unresponsive pneumonia (BRD) Bovine Respiratory disease complex ומ- fatal bronchopneumonia (Shahriar et al., 2006; Gagea et al., 2008; Arcangioli et al., 2002).

למרות הנאמר מעלה, לעיתים קרובות מוצאים את הפתוגן בדרכי הנשימה העליונות ובלוע של עגלים בריאים, שמפיצים את הפתוגן לסביבה, על אף העדרם של סימפטומים ברורים (Maunsell and Donovan, 2009). הפצת החיידקים (Shedding) מתבצעת בעיקר דרך דרכי הנשימה ודרך העטין (הנקה), גם מחיות שלא מראות סימנים קליניים. סימנים קליניים ראשוניים מופיעים לרוב כארבעה ימים לאחר ההדבקה. הסימנים לדלקת ריאות ולמחלות בדרכי הנשימה אינם ספציפיים (התנהלות איטית או הכבדה בפעולות שגרתיות כגון אכילה, תנועה וכו' (לטרגיות), היעדר תאבון, חום, נשימת יתר ו/או מצוקה נשימתית, ואובדן משקל) וקשה לקבוע כי מדובר בזיהום של MB. במידה ונצפית דלקת פרקים, זיהום שאינו מגיב לאנטיביוטיקה (או מגיב חלקית וממשיך כמחלה כרונית) גובר החשד לכך שמדובר בזיהום ב-MB (Caswell and Archambault, 2007).

הדבקה ב-MB מתרחשת הן באופן אנכי (מאם לצאצא, דרך מערכת המין או Colostrum) והן בין בני בקר נגועים (העברה אופקית). עגל יכול להיות נשא של הפתוגן ולא להראות כלל סימני תחלואה, וכך, כאשר מציגים עגל נגוע לעדר בריא, הוא מפיץ את הפתוגן, בתהליך המוביל להידבקות פרטים נוספים בעדר. לרוב, עגל יפיץ את הפתוגן במשך חודשים ספורים, אולם נמצאו עדויות לכך שתקופת ההדבקה (עם סימנים קליניים מועטים) יכולה אף להימשך שנים (Nicholas and Ayling, 2003). כמות החיידקים שמופצים ע"י המאכסן משתנה, ותלויה בעוצמת המחלה (מחלה אקוטית = הפצה מוגברת) ובתנאי הסביבה, עקה, העברה ממקום למקום, וכדומה יובילו גם הם להגברת ההפצה (Maunsell and Donovan, 2009). התפשטות הפתוגן בעדר naïve דרך הצגת עגל נשא יכולה להיות מהירה מאוד.

במספר מחקרים שנעשו בארצות שונות באירופה, נמצא כי MB הינו פתוגן שכיח מאוד בקרב בקר הנגוע בדלקות ריאות. לרוב, ב-30%-20% מהעדרים בהם היו התפרצויות בודד פתוגן זה ולעיתים המספר עלה עד לכ-50% (בעוד שפתוגנים אחרים הידועים כגורמים לסימפטומים דומים בודדו במקרים פחותים בהרבה, כ-10% ומטה לזנים בודדים). באיטליה, במחקר שנעשה בחוות פיטום, נמצא כי 100% מהעגלים וכ-75% מהבקר הבוגר (המיועד לשחיטה) נחשפו לפתוגן, מצב הגרם לפגיעה חמורה בעלייה במשקל של בעלי החיים הנגועים ולמותם [reviewed in (Nicholas, 2011)]. במחקר נוסף בו נבדקו מעל 400 עגלים שהועברו לחוות פיטום, נמצא כי כ-50% מהעגלים פיתחו מחלה נשימתית המשויכת ל-MB. בנוסף, ב-55% מהעגלים נמצאו נוגדנים כנגד MB בסרום במהלך שבעה שבועות לאחר חשיפתם לעדר. בעגלים אלו קצב העלייה במשקל היה נמוך ב-8% משל העגלים שלא הראו נוגדנים כנגד הפתוגן, למרות קבלת כמויות כפולות של אנטיביוטיקה כטיפול מונע (Tschopp et al., 2001).

יתרה מכך, ההערכות גוברות כי למעשה הנגיעות ב-MB אינה מוערכת מספיק ומדובר בפתוגן שכיח ביותר בבקר, אשר מלבד היותו גורם ישיר למחלה הוא גם יכול להגביר את הנגיעות בפתוגנים אחרים ע"י החלשת המערכת החיסונית (Poumarat et al., 2001). על רקע הדבקה ב-MB, מחוללי מחלה אחרים, כמו *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* ו-*Histophilus somni* יכולים לגרום למחלה קשה יותר, מתמידה ולעתים כרונית. זיהומים משותפים אלו אינם נצפים אך ורק בין MB וחידקים, אלא גם עם נגיפים שונים, כגון (BVD) Bovine Viral Diarrhoea, אשר מהווה רקע להדבקה ב-MB ומגביר את עוצמת המחלה והתסמינים הפתולוגיים (Shahriar et al., 2002), או הנגיף Infectious Bovine Rhinotracheitis, המזוהה בתדירות הגבוהה ביותר כנלווה לזיהומים מיקופלסמטיים בבקר (Nicholas et al., 2009). במחקר נוסף, נמצא כי הדבקה מוקדמת ב-B-1 Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) מובילה לתסמינים חריפים יותר בעקבות הדבקה מאוחרת ב-MB – אבדן משקל משמעותי, מחלת חום קשה יותר ואחוזי תמותה גבוהים יותר (כ-25% אחוז שרידות לעומת 100%) (Prysljak et al., 2012).

בישראל, המופע העיקרי המשויך ל-MB הינו דלקת ריאות (מבודד בשיעור של 26% עד 65% בין השנים 2004-2008) ומחלת ה-BRD בעגלים צעירים הנמצאים במפטמות ובעגלי יבוא. אולם, בשנים האחרונות אנו עדים "לפלישה" של MB לרפתות חלב, דבר שגרם להתפרצות דלקות עטין בשנת 2008 ולמספר התפרצויות של מחלה נשימתית קשה בפרות בוגרות (Lysnyansky et al., unpublished results). על פי נתונים של השירותים הווטרינרים בישראל, בנוסף ל-100,000 עגלים מקומיים המיועדים לפיטום, ייבאו בין השנים 2010-2011 כ-96,565 ו-108,72 עגלים, בהתאמה ממספר מדינות מאירופה ומאוסטרליה (ראה

http://www.moag.gov.il/agri/files/report_2010.pdf ו-

http://www.moag.gov.il/agri/files/report_2011.pdf).

הכנסה של עגלים מיובאים לרפתות, כמו כן הימצאות של מפטמות קרוב לרפתות עלולות לגרום למעבר של MB לאוכלוסיה נאיבית של בקר או לחשוף אותם לזן אלים יותר.

סיווג מולקולרי של חיידקים פתוגניים הפך בשנים האחרונות לחלק בלתי נפרד מתחקירים אפידמיולוגיים וממערך הניטור של המחלות. עקרונית, שיטות סיווג מולקולרי של MB נחלקות לשתי קבוצות: (א) שיטות הבוחנות את הגנום השלם, כגון: random amplified polymorphic DNA (RAPD), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), ו-amplified fragment length polymorphism (AFLP) (ב) שיטה מכוונת רצף-מטרה (target sequencing; TS), לדוגמא: Pinho et al., 2012;) (MLVA) Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (Spergser et al., 2013). בשונה משיטות הבוחנות את הגנום השלם, ניתן ליישם את שיטות ה-TS ישירות על דוגמאות קליניות וללא צורך בבידוד בתרבית נקייה, משימה אשר גובלת בבלתי אפשרי במצבים קליניים רבים. ה-MLVA היא שיטה לסיווג מולקולרי שמבוסס על הגברת רצפים שחוזרים על עצמם (VNTR- variable number tandem repeat) מספר פעמים בגנום של החיידק. שיטת ה-MLVA שימשה לסיווג מולקולרי של בידודי MB שדה שבודדו מבקר מיובא ומפרות ישראליות עם דלקות עטין (Amram et al., 2013). התוצאות שהתקבלו הראו כי שיטת MLVA עשויה לשמש כלי חיוני לאפיון גנטי של זני MB במטרה להבין תנועה ותפוצת הזנים בתוך ומחוץ לגבולות בין לאומיים, וכמו כן לעקוב אחר מקור התפרצות.

מטרות המחקר

הייתה להעריך את המעורבות של *Mycoplasma bovis* בתחלואה נשימתית בעגלי פיטום בישראל ולקבוע קשר בין הדבקה בחיידק MB ובין פסילת כשרות.

מטרות ספציפיות:

1. מעקב אחר דינאמיקת ההדבקה ב-MB במפטמה.
2. הערכת המעורבות של *M. bovis* ב-BRD.

חומרים ושיטות

1. תיאור המשקים ששימשו לחקר דינאמיקת ההדבקה ב-MB.

המחקר התבצע ב-2 משקים, המכונים B ו-S.

משק B:

נמצא בעמק יזרעאל. במשק כ-500 עגלי פיטום מגמולים ועד לפני שחיטה. מקור העגלים

לגידול במשק הן מרפתות חלב ישראליות (קיבוץ R ו-G; בקר פריזי) והן מיבוא (כ-50 עגלים נרכשים מליטא או מהונגריה מספר פעמים בשנה; מעורבי גזע סימנטל או פריזי). המשק צמוד לרפת חלב פעילה. מבני הפיטום ישנים ולא יעודים, הגגות נמוכים. קיימת הכבדה עקב צפיפות ואוורור לקוי. סיום הפיטום מתבצע על טפחות שתחיתה נאגר כל הזבל. העגלים מפוטמים עד למשקל של כ-350 ק"ג. המשק ידוע כסובל מתחלואה נשימתית גבוהה (עפ"י התרשמות המפטם והרופא המטפל). העגלים נמכרים בעיקר ללקוחות ברש"פ. לעגלים אין נתוני שחיטה וכשרות. העגלים מחוסנים בחיסוני חובה בלבד.

משק S:

ממוקם על גבול לבנון. משק בקר לבשר עם הספקה עצמית של עגלים לפיטום. במשק כ-1200 אמהות המספקות כ-500 עגלים מפרים מגזע שרולה וסימנטל. בנוסף, המשק מפטם כ-100 עגלים פריזיים בשנה, שמקורם מקיבוץ D סמוך. העגלים מגיעים למשק בגיל שבוע. הגמילה של אותם עגלים מבוצעת במשק. כמו כן, במהלך השנה נרכשות קבוצות של כ-50 עגלים מחו"ל. ארצות היבוא הן ליטא והונגריה. גזעי היבוא – פריזי, מעורבי אנגוס שחור, מעורבי סימנטל. העגלים מפוטמים למשקל של כ-350 עד 500 ק"ג. העגלים מחוסנים בחיסוני חובה בלבד. הרפתן מטפל פעם בחודש בכלורטטראציקלין כטיפול מניעתי בכל המפטמה למשך 4 ימים. עגלים נשחטים בבית מטבחים.

2. מהלך הדיגום.

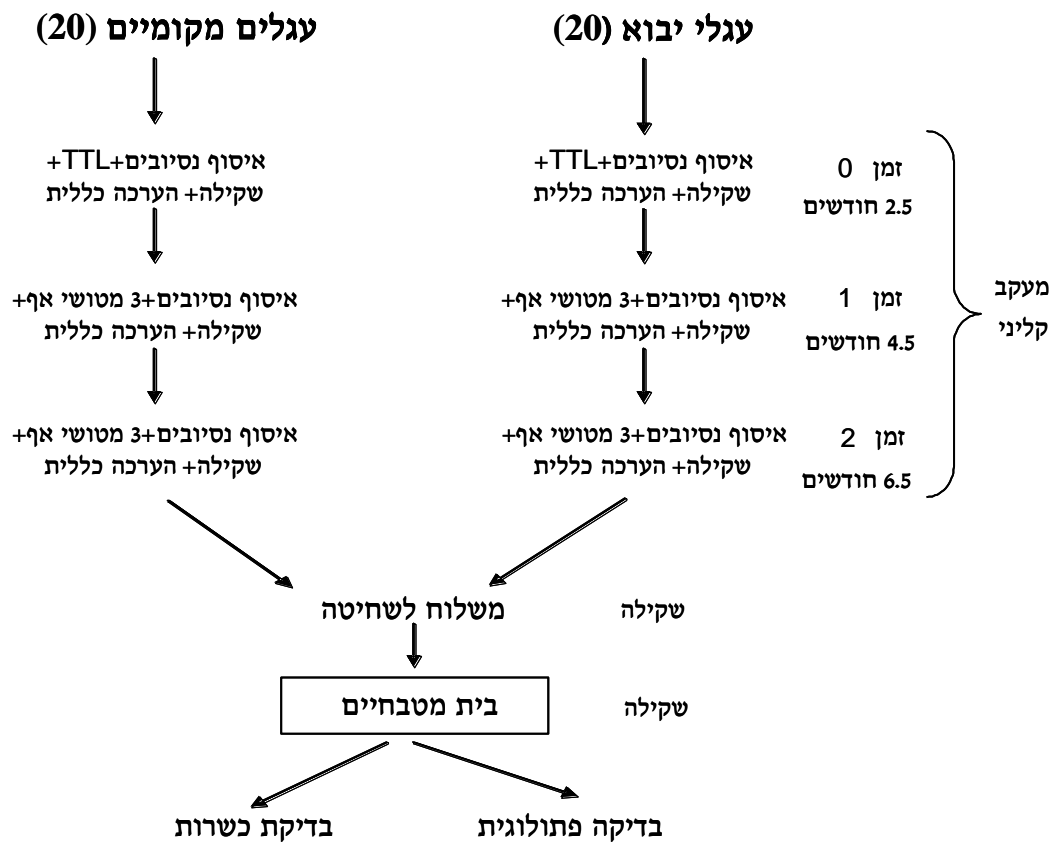
אוכלוסיות היעד של המחקר היו שתי קבוצות עגלי פיטום בכל אחד מהמשקים: קבוצה של 20 עגלים מקומיים וקבוצה של 20 עגלי יבוא. איסוף הדגימות (מטושי אף ודמים) נעשה בשלוש נקודות זמן: כניסה של עגלי יבוא למשק (זמן 0), חודשיים אחרי הדיגום הראשון (זמן 1) וארבעה חודשים אחרי הדיגום הראשון (זמן 2) (טבלה מס' 1, תיאור מס' 1). עשרה עגלי יבוא ו-10 עגלים מקומיים נדגמו באמצעות שטיפות קנה הנשימה (TTA) בדיגום הראשון. בנוסף, מכל 40 עגלים (20 עגלי יבוא ו-20 עגלים מקומיים) נלקחו דם ושלושה מטושים מהאף (מטוש אחד לבידוד המיקופלסמה, מטוש שני ל-PCR להגדרת מין המיקופלסמה ולזיהוי הדנ"א של MB ומטוש שלישי לבקטריולוגיה כללית). דגימות ריאה נאספו לאחר שחיטה לבדיקת מיקופלסמה, בקטריולוגיה כללית, וירולוגיה ופתולוגיה.

טבלה מס' 1. תאריכי דיגום ומספר עגלים מקומיים ומיובאים שנדגמו בכול דיגום במשקים B ו-S.

שם של המשק	מס' דיגום	תאריך הדיגום	מס' עגלים מקומיים	מס' עגלים מיובאים
S	1	18.11.09	19	18
S	2	20.1.10	17	18
S	3	11.4.10	18	18
S	בית מטבחים	12.8.10	8	17

20	20	21.2.10	1	B
19	20	12.4.10	2	B
19	18	21.6.10	3	B

תיאור מס' 1: מהלך הדיגום



עיבוד דוגמאות שדה.

מבחן ELISA. הנסיובים נבדקו בשיטת ELISA לנוכחות נוגדנים ל-MB, IBR, BVD, BRSV ו-Bio K162 תוך שימוש בערכות מסחריות (MB, Svanova –PI3V, BVRD, BRSV, IBR) ו-Bio K162 (Bio-X Diagnostics, Belgium).

בידוד והגדרה של חיידקי המיקופלסמה בידוד של חיידקי מיקופלסמה מ-TTL, ממטושי אף ומריאה נעשה על פלטות FF לפי המלצתם של (Nicholas and Baker, 1998). הגדרת מין המיקופלסמה נקבעת על ידי הגבת מושבות עם נוגדנים ספציפיים בשיטת אימונופלורסנציה (IMF).

תרביית בקטריוולוגית כללית. מטושי אף, TTL ודגימות ריאה נבדקו לנוכחות של חיידקים פתוגניים למערכת הנשימה בבקר. מטושים נזרעו על אגר נוטריינט 7.2, אגר מקונקי ואגר נוטריינט מועשר עם 5% דם כבשים (אגר דם). התרביות הודגרו בטמפרטורה של 37 מ"צ למשך 48 שעות בתנאים אירוביים ומיקרוארופיליים במקביל. חיידקים פתוגניים למערכת הנשימה בבקר בודדו וזוהו בעזרת מבחנים קונבנציונאליים: מורפולוגיה, משטח גרם, מבחן אוקסידז, קטלז, אינדול ומבחנים ביוכימיים נוספים לפי הצורך. לבדיקת הריאות השטח החיצוני של האבר נשרף, דגימה של כ-2 סמ"ק נחתכה בתנאים אספטיים והצד הפנימי של הדגימה נזרע על מצעי הגידול כני"ל. תרביות עם צמיחה מעורבת של חיידקים מזהמים ללא סוג אחד של חיידק בולט הוגדרו כ- 'תרביית מעורבת'.

הפקת דנ"א כללי. דנ"א גנומי של מיקופלסמה הופק בשתי שיטות: (א) בעזרת הערכה המסחרית של MaxwellTM 16 DNA Purification kit, Promega-ה ושימוש במכשיר להפקת דנ"א MaxwellTM (ב) באמצעות הרתחה כפי שפורסם על ידי Ben Shabat et al., (2010) Ben Shabat et al. ריכוז הדנ"א נקבע בספקטרוטומטר של (Termo Scientific) NanoDrop ND-1000.

PCR. התחלים JGMR-1F/1R ו-SM5-1/2 (ראה טבלה מס' 2) המזהים רצפי דנ"א המקדדים לגנים 16S-23S rRNA ו-oligopeptide ABC transporter, בהתאמה שימשו לזיהוי מין המיקופלסמה ו-MB. ריאקציות PCR נערכו בנפח סופי של 50 µl והכילו את החומרים הבאים כדלקמן: דנ"א 10 ng, בופר ל-PCR (5 µl) x 10, 25 mM MgCl₂ (3 µl), dNTPs (10mM) 1 µl, 1.25 U של האנזים Taq DNA polymerase AB (Thermo Scientific), תחלים (30 picomoles) 0.5/0.5 µl. הגברות של PCR נעשו במכשיר מדגם BioRad C1000 Touch thermal cycler. תנאי הריאקציה מפורטים בטבלה מס' 2.

טבלה מס' 2: תחלים ותנאי הריאקציה.

שמות ורצף התחלים	ספציפי	תנאים ריאקציה
JGMR-1R 5' CCTCATCGATTTTCAGACCCAAGGCAT 3'	למין מיקופלסמה	1. 94°C-30" 2. 55°C-2' 3. 72°C-2'
JGMR-1F 5' ACACCATGGGAGCTGGTAAT 3'	למין מיקופלסמה	4. Go to 1 X 39 5. 72°C-5' 6. 4°C-30' 7. 12°C-forever
SM5-1 5' CCAGCTCACCTTATACATGAGCGC 3'	ל-MB	1. 96°C-1' 2. 96°C-15" 3. 54°C-1'
SM5-2 5' TGACTACCAATTAGACCGACTATTTTAC 3'	ל-MB	4. 72°C-1' 30" 5. Go to 2 X 35 6. 72°C-7' 7. 4°C-30' 8. 12°C-forever

במידה והיה צורך לרצף את תוצרי ה-PCR, הם עברו ניקוי בעזרת High Pure PCR Purification Kit של חברת QIAGEN ונשלחו ליחידה לקביעת הרצף במכון ויצמן.

פתולוגיה ובדיקה בבית המטבחים.

בסך הכול התקבלו 25 דגימות ריאה (8 מעגלים מקומיים ו-17 מעגלים מיובאים של משק S) שהגיעו מבית המטבחים. עבור כל 25 העגלים התקבלה תוצאה של בדיקת כשרות שנעשתה על ידי בודק כשרות מוסמך. בדיקה היסטופתולוגית (H&E) בוצעה ל-21 דגימות ריאה (4 מעגלים מקומיים ו-17 מעגלים מיובאים). הבדיקה נעשתה בחטיבה לפתולוגיה של המכון הווטרנרי. עגלים ממשק B נשחטו שחיטה לא כשרה ברש"פ ולכן לא היה ניתן לבצע בדיקות לאחר השחיטה.

סטטיסטיקה.

ניתוח תוצאות נעשה באמצעות מבחן χ^2 -בריבוע.

3. סיווג מולקולארי באמצעות שיטת ה-Multiple-locus variable-number tandem-

(MLVA) repeat analysis.

שישה עשר ו-24 בידודי MB שבודדו במשקים B ו-S, בהתאמה סווגו באמצעות שיטת ה-MLVA. שמות הבידודים, מקור העגל שממנו בודד החיידק, כמו כן מספר הדיגום מופיעים באיור מס' 2. זן יחוס PG45 שימש כביקורת. בעבודה נעשה שימוש בשבעה זוגות של תחלים לאתרי VNTRs שונים (Pinho et al., 2012; Spergser et al.,) (TR59 ו-TR49-51, TR35, TR30, TR29, TR148, TR427) (2013). ראקציית PCR נעשתה בנפח סופי של 50 μ l והיא כוללה 10 μ l בופר PCR 10x, 1.25U של MyTaqTM דנ"א פולימראז (BIOLINE), 20 pmol תחל (Sigma) ו-5 μ l דנ"א גנומי. ראקציית PCR התבצעה ב-BIO RAD) C1000 Touch thermal cycler. הגברת תוצרי ה-PCR במערכות ה-VNTRs נעשתה בהתאם לתנאים שפורסמו (Pinho et al., 2012; Spergser et al., 2013). העץ הגנטי הורכב בעזרת תוכנה שהורדה מהאתר:

<http://pubmlst.org/perl/mlstanalyse/mlstanalyse.pl?site=pubmlst&page=treedraw&referer=pubmlst.org>

4. דיגום משקי פטום עם BRD.

אוכלוסיית המחקר הייתה ארבעים ואחד עגלי פיטום בגיל של 1-6 חודשים מארבע מפטמות הנמצאות באזורים גיאוגרפיים שונים. עגל עם טמפרטורה רקטלית של $\geq 39.7^{\circ}\text{C}$ ואחד מהסימנים הבאים דיכאון, נוזלת, דימוע או שיעול, נחשב כסובל מ-BRD. דיגום נעשה באמצעות שיטת ה-TTA,

כמו כן נלקח דם לבדיקת נוגדנים בנסיוב (ראה טבלה מס' 4). הדגימות נבדקו לנוכחות של MB ומיני מיקופלסמה אחרים באמצעות שיטת הבידוד, ה-PCR וה-ELISA כפי שמתואר למעלה. במידה והתאפשר (זמינות ערכות ELISA), נבדקה נוכחות של נוגדנים כנגד פתוגנים וירליים (ראה טבלה מס' 4).

תוצאות ודיון

1. מעקב אחר דינאמיקת ההדבקה ב-MB במפטמה.

תוצאות MB-ELISA ו-MB-PCR מראות בבירור שבקר מיובא אכן יכול לשמש כמקור להדבקה של הבקר המקומי (טבלה מס' 3). ניתן ללמוד מתוצאות ה-ELISA, שבכניסת עגלי יבוא למשקים B ו-S כ-70% ו-94% מהם, בהתאמה הכילו נוגדנים כנגד MB לעומת 15% ו-16% בעגלים מקומיים. יש לציין שזמן מחצית החיים של נוגדני MB מוערך בכ-20-30 יום. כיוון שבמספר מצומצם של עגלי יבוא משקל הכניסה היה כ-100 ק"ג ומטה, ניתן להניח שמדובר בעגלים צעירים מאד שיכולים לשאת נוגדנים אימהיים. הימצאות של נוגדנים אימהיים יכולה לרמז על כך שהעגלים הללו נאספו ממשקים המזוהמים ב-MB. יחד עם זאת, אחוז גבוה של עגלי יבוא חיוביים ל-MB ב-ELISA, רמה גבוהה של נוגדנים כנגד MB ועליה בחוזק התגובה הסרולוגית עם הזמן, במיוחד בין דיגום בזמן 0 ו-1 (תוצאות אינן מוצגות), מרמזים על חשיפה של עגלי היבוא ל-MB זמן קצר לפני הגעה למשקים. גם תוצאות PCR-MB של הדיגום בזמן 0 ודיגום בזמן 1 תומכות בתוצאות של MB-ELISA. כך אחוז הדוגמאות החיוביות ל-MB בדיגום 0 בשני המשקים היה גבוה יותר באופן מובהק סטטיסטית בעגלי יבוא מאשר בעגלים מקומיים (75% לעומת 5%; $P > 0.001$ במשק B ו-67% לעומת 16%; $P > 0.002$ במשק S) (טבלה מס' 3). חודשיים לאחר מכן (תוצאות של זמן 1), חלה עליה בזיהוי של MB בעגלים מקומיים. כך לדוגמא, במשק B, 30% מדוגמאות הדני"א שהופקו מבקר מקומי היו חיוביות ל-MB. בדיגום בזמן 1 אחוז הדוגמאות החיוביות ל-MB בשיטת PCR היה אף גבוה יותר בבקר המקומי מאשר בבקר המיובא במשק S (53% לעומת 33% בבקר המיובא) (טבלה מס' 3). את הירידה בזיהוי MB באמצעות PCR בדוגמאות שנאספו מבקר מקומי ומיובא בשני המשקים בדיגום בזמן 2 ניתן להסביר כתוצאה של מתן טיפול אנטיביוטי (chlortetracycline) לעגלים ושל עליה ברמת הנוגדנים בדם של הבהמה שיכולים לדכא את התרבות החיידק ואף לסלקו.

ממחקרים שנעשו לאחרונה עולה שנגיעות ב-MB בעגלי פיטום צעירים הינה נמוכה לפני הגעתם למפטמות. אך, תוך שבועיים רוב העגלים עוברים היפוך סרולוגי (Arcangioli et al., 2008; Radaelli et al., 2008). לדוגמא, במחקר שנעשה בצרפת, רק 2% מעגלי פיטום נשאו נוגדנים כנגד MB בכניסה למפטמה, חודשיים אחרי כן כ-90% מהעגלים עברו היפוך סרולוגי (Arcangioli et al., 2008). Hanzlicek ושותפיו למחקר, הראו שנוכחות הנוגדנים כנגד MB בכניסה של עגלים למפטמה

(זמן 0) ו-42 יום לאחר מכן הייתה בשיעור של 26.6% ו-98.2% ($P < 0.05$), בהתאמה. בנוסף, נצפה קשר בין היפוך סרולוגי שהתרחש בין הימים 0 ו-42 ($P = 0.04$) לבין שיעור נמוך של עליה במשקל (lower weight gain). שיעור העלייה במשקל היה ניכר בעגלים שהיו שליליים ל-MB בשיטת PCR עשרה ימים לאחר תחילת המחקר ($P = 0.01$). לא נצפה קשר בין המצב הבריאותי של העגלים לבין היפוך סרולוגי (Hanzlicek et al., 2011). ממחקר אחר עלה שבעגלים שעברו היפוך סרולוגי נצפתה ירידה משמעותית במשקל, והם קיבלו כמות גדולה של אנטיביוטיקה בהשוואה לעגלים ללא היפוך (Tschopp et al., 2001). במחקר הנוכחי לא נצפה קשר בין היפוך סרולוגי לבין ירידה במשקל או המצב הבריאותי של העגלים (תוצאות אינן מוצגות). בנוסף, לא נמצא קשר מובהק בין תוצאות הכשרות לבין נוכחות של MB (או מיקופלסמות אחרות), סטטוס סרולוגי או תוצאה פתולוגית. כיוון שלא התקבלו מספיק דגימות ריאה מבקר מקומי לא היה באפשרותנו להשוות את נתוני השחיטה, תוצאות הפתולוגיה, זיהוי של MB וסטטוס סרולוגי בין שתי קבוצות הבקר: מקומי ומיובא.

על מנת לבדוק מה היא הדרך התפשטותו של החיידק MB בשתי המפטמות, בידודי MB שנאספו במשקים B ו-S סווגו באמצעות שיטת ה-MLVA. מספר הפרופילים שהתקבל ממערכות ה-VNTRs שונות נע בין 2-3. תשעה סוגים סופיים של VNTR (final VNTR type, (FVT)) התקבלו מקומפילציה של תוצאות מ-7 מערכות ה-VNTRs (איור מס' 2). זנים שבודדו מעגלים שהגיעו למשק B מציגים 5 FVTs, בעוד שהזנים שבודדו במשק S מציגים 3 FVTs. בהתבסס על זהות בקרב ה-FVTs השונים, זני MB שנבדקו מתחלקים לשתי קבוצות עיקריות: קבוצה B ו-C (זן יחוס PG45 שייך לקבוצה A) (איור מס' 2). קבוצה B כוללת 22 בידודים (16 ממשק B ו-6 ממשק S) המציגים 5 FVTs שונים, בעוד שקבוצה C כוללת 18 בידודים, כולם ממשק S, המציגים 3 FVTs שונים (איור 2). סוג ה-FTV שנצפה בבידודים שבודדו מעגלים במשק B אינו זהה לזה שנצפה בבידודים שבודדו במשק S. יש לציין, שבגלל אילוצים טכניים (לא תמיד היה בידוד, אלא רק דנ"א; ריכוז של הדנ"א היה נמוך וכו') לא תמיד היינו יכולים לבדוק מעקובת של הבידודים, כלומר בידודים שזוהו באותו עגל בדיגומים שונים כמו כן כפי שתואר קודם, לא התקבלו מספיק דגימות חיוביות בדיגום בזמן 2 בשני המשקים. בכול אופן, תוצאות הסיווג שהתקבלו הצביעו על מספר מאפיינים: (א) במקרים בהם היו שני בידודים עוקבים מאותו עגל זוהו חיידק MB עם גנוטיפ זהה. יחד עם זאת ישנם מקרים כאשר גנוטיפ של החיידק היה שונה מדיגום לדיגום, כמו במקרה של בידוד מס' 8840 שבודד במשק B או בידודים 2780 ו-7415 שבודדו במשק S (איור 2); (ב) תוצאות הסיווג שויכו זני MB שהתגלו במשק B בבקר ישראלי ובבקר מיובא לשתי קבוצות שונות, פרט לבידוד מס' 9401 (מעגל מקומי) שנמצא בתת קבוצה Ba יחד עם 10 בידודים מבקר מיובא. הממצא הזה מרמז שככל הנראה במשק B היו לפחות שתי אוכלוסיות שונות של חיידקים: אחת "מקומית" ואחד "מיובאת" שלא התערבבו ביניהן, לפחות בעגלים שנבדקו. במשק S ממצאים היו שונים במקצת. כך לדוגמה, ניתן לזהות ש-6/7 בידודים שנתגלו בעגלים ישראליים, שויכו לתת קבוצה Ca המכילה 9/17 בידודים "ליטאיים". מתוך אותם

שישה בידודים "ישראליים", חמישה בודדו בדיגום 1 ו-2. על בסיס של התוצאות האלו ניתן להניח שמדובר בהדבקה של הבקר המקומי על ידי חשיפה לחיידקי MB "שהגיעו" עם הבקר המיובא. בנוסף, בבקר מקומי התגלה גם חיידק MB (703; דיגום 0) עם גינוטיפ שונה מאלו שנמצאו בבקר הליטאי, דבר שמצביע על מספר מקורות הדבקה של הבקר הישראלי (איור 2) באותו משק.

לאחרונה בוצע מחקר שמטרתו הייתה לקבוע האם גנוטיפ בודד או גנוטיפים שונים של MB נמצאים במכלאה בזמן התפרצות של BRD. במהלך המחקר נדגמו כ-112 עגלים ב-12 מכלאות (3 מפטמות) במהלך 16 מקרי התפרצויות של BRD. בידודי MB אופיינו בשיטת ה-pulsed-field-gel electrophoresis (PFGE). תוצאות הסיווג הראו שאף על פי שעגלים הגיע ממקורות שונים, גנוטיפ בודד של החיידק זוהה בזמן ההתפרצות (Timsit et al., 2012). המסקנות שהחוקרים מסיגים מתוצאות המחקר הינן כדלקמן: (א) למרות ש-MB מתפרץ מחדש בזמן עקה בעגלים נשאים, העלייה בנפיצות החיידק בזמן התפרצות ה-BRD נובעת בעקב מעברה אופקית של הגנוטיפ הדומיננטי אחד; (ב) הותרו שני מקורות להדבקה: עגלים חדשים שהוכנסו למפטמות כמו גם עגלים בוגרים שאכסנו במכלאות סמוכות ושכול הנראה היו מודבקים כרוניים ב-MB (Timsit et al., 2012). תוצאות דומות התקבלו גם במחקרים אחרים שהציבו מטרות דומות (Arcangioli et al., 2011; Butler et al., 2001). במחקר שנעשה במעבדתנו, סווגו 68 בידודי MB שבודדו בישראל בין השנים 2000-2011 מעגלים שיובאו לישראל מאוסטרליה (11 בידודים), ליטא (13 בידודים) והונגריה (11 בידודים) וזנים שבודדו במשקים ישראליים מפרות עם דלקות עטין (31). גם במקרה הזה, הסיווג בוצע באמצעות שיטת ה-MLVA, כפי שנעשה במחקר הנוכחי. הנתונים הצביעו על דמיון גנטי בין זנים של MB שבודדו מפרות חולבות מקומיות לזנים שבודדו מעגלים שיובאו לישראל מאוסטרליה. כלומר, ניתן להסיק מהנתונים שיתכן והייתה העברה של זנים מעגלים מיובאים לעדרים של פרות חולבות (Amram et al., 2013). דוגמא נוספת להעברה של MB מעגלי יבוא לפרות חולבות היא התפרצות של BRD שהתרחשה במשק A בשנת 2010; כשלושה חודשים אחרי הכנסת עגלי פיטום מאוסטרליה למשק. תוצאות שהתקבלו על ידי MLVA מקבצים לקבוצה אחת בעלת אותו סיווג גנטי IV, זנים שבודדו ממשק A (ממקרה של דלקת עטין והזנים שבודדו מעגלים שהובאו לישראל מאוסטרליה), וזנים שבודדו מעגלים שהובאו מאוסטרליה ושהו בהסגר בישראל. למרות שעגלים שמקורם באוסטרליה והועברו לחווה A ופרות מקומיות מאותה חווה לא נבדקו לנוכחות MB לפני התפרצות של דלקת עטין ו-BRD, קיימות ראיות לא ישירות המעידות על קשר בין ההתפרצות של דלקת עטין ו-BRD לבין העברה של עגלים שמקורם באוסטרליה לחווה: (1) מעולם לא בודד חיידק MB בחווה זו, (2) זו היא ההעברה הראשונה של עגלים מיובאים לחווה, (3) זן שבודד בחווה ממקרה של דלקת עטין בשנת 2010 מציג את הסיווג הגנטי IV, הזהה לסיווג הגנטי של עגלים שהובאו לישראל מאוסטרליה ושהו בהסגר בין השנים 2009-2010 (Amram et al., 2013).

2. הערכת המעורבות של *M. bovis* ב-BRD.

בדגימות TTA, החיידק MB זוהה ב-18/41 עגלים (3/4 מפטמות), כאשר בשתי מפטמות (מס' 2 ו-4) שכיחות החיידק הייתה גבוהה (80% (8/10) ו-90% (9/10)) ואילו במפטמה מס' 1 רק עגל אחד היה חיובי ל-MB. אחוז העגלים עם כייל נוגדנים כנגד MB נע בין 0-80 (ראה טבלה מס' 4). בדגימות TTA שנלקחו במפטמות מס' 1, 2 ו-4 נתגלה זיהום מעורב ב-MB ו-MD (MD התגלתה ב-1/11 (9%), ב-6/10 (60%) ו-5/10 (50%) דגימות, בהתאמה), כאשר במפטמה מס' 3 אובחנה רק MD ב-7/10 דגימות TTA. בנוסף, 50% ו-30% מדגימות במפטמות 2 ו-4, בהתאמה היו חיוביות ל-*P. multocida*. לצערנו, בגלל בעיות בהספקת ערכות ה-ELISA רק דגימות משתי מפטמות נבדקו לנוכחות הנוגדנים כנגד פתוגנים וירליים, דוגמת IBR, BRD, PI (ראה טבלה מס' 4). יש לציין, שמכיוון שמס' מקרי BRD שנבדק במחקר הנוכחי היה קטן, אין להגיע למסקנה כוללת על מעורבות של MB במחלה הזאת בישראל. יחד עם זאת, ככול הנראה במפטמה מס' 1 חיידקי המיקופלסמה אינם היוו סיבה להתפרצות BRD. במשק זה נמצאו כיילים נוגדנים כנגד IBR (ב-9/11 עגלים), BVD (7/11), PI (11/11) ו-BTV (10/11). שכיחות גבוהה של MB יחד עם MD ו-*P. multocida* בדגימות TTA ב-2/4 מפטמות (2 ו-4), יכולה להצביע על מעורבות רב גורמית ב-BRD במפטמות האלו. גורמים רבים מעורבים ב-BRD; מצבו הפיזיולוגי של העגל, תנאי הממשק, תנאים סביבתיים, תזונה, אירועי עקה שונים (גמילה מיניקה, הובלה, ערבוב עם עגלים חדשים) כמו כן מעורבות של מספר פתוגנים (נגיפיים ו/או בקטריאליים). לדוגמה, באנגליה, *P. multocida* ו-BRSV הם הפתוגנים הנפוצים ביותר שמבודדים יחד עם MB מריאות דלקתיות (Robin, unpublished results), בצרפת מדובר ב-BVDV (Arcangioli et al., 2008). בצפון אירלנד, עד 2005 החיידק הנפוץ ביותר שבודד עם MB היה *H. somni* ומאז החיידקים "המובילים" הם *A. pyogenes* ו-*M. haemolytica*. בנוסף, חיידקי MB ידועים ביכולתם לדכא את מערכת החיסון של המאכסן, עובדה המותירה את המאכסן חשוף יותר לפגיעות ממקורות חיצוניים ופנימיים כאחד. על רקע הדבקה ב-MB, מחוללי מחלה אחרים כמו *P. multocida*, *M. haemolytica* ו-*H. somni* יכולים לגרום למחלה קשה יותר, מתמידה ולעתים כרונית. הוצעה גם השפעה סינרגיסטית בין MB לבין BVDV בהדבקה משולבת (Haines et al., 2004; Shahriar et al., 2004). בישראל, *M. haemolytica* ו-*P. multocida* הם הממצאים הנפוצים ביותר בדגימות מדלקות ריאה מעגלי יבוא אשר מגיעים למעבדה לבקטריוλογία במכון הווטרינרי, רובם מתחנות ההסגר. חיידקי *H. somni* היו ממצא נדיר יותר בדלקות ריאות בארץ עד לפני כ-10 שנים מאז הייתה עליה משמעותית בממצא זה הן בדלקות ריאות והן בדלקות עטין בבקר. במפטמה מס' 3 ככול הנראה, המחלה נגרמה על ידי MD – חיידק שלגביו קיים תת אבחון בישראל. תת אבחון נובע בעקב מעצם העבדה ש-MD הינו חיידק "מפונק" (fastidious) אותו קשה לגדל בתנאי מעבדה. בדיגום שנעשה בשתי מפטמות B ו-S, בהן בדקנו דינמיקת ההדבקה ב-MB,

ראינו שחיידק MD נתגלה רק בדוגמאות של TTL וריאה וכלל לא מדגימות אף. יש להניח, שנוכחות רבה של מיקופלסמות ו/או חיידקים אחרים באף ממסכת או מדכאת את התרבותו של חיידק ה-MD במערכת הנשימה העליונה. כשהחיידק יורד למערכת הנשימה התחתונה, שבה אוכלוסיית החיידקים דלילה, הוא מתחיל "לשגשג" וקל יותר לזהותו. בישראל, תועדו מקרים ספורים בהם זוהתה MD בחומר קליני שמגיע ליחידה למיקופלסמה, כולם מדגימות ריאה או TTL. החיידק MD נמצא ב-41% מדגימות ריאה של בקר מיובא (7/17) וב-0% מדגימות ריאה של הבקר המקומי (0/8) (טבלה מס' 3), אך לא נמצא קשר בין הימצאותו בריאה לבין מצב הכשרות או תוצאה היסטופתולוגית.

לסיכום:

1. תוצאות MB-ELISA ו-MB-PCR שהתקבלו משני משקים B ו-S שנבדקו, מראות בבירור שבקר מיובא אכן יכול לשמש כמקור להדבקה של הבקר המקומי. במחקר הנוכחי לא נצפה קשר בין היפוך סרולוגי לבין ירידה במשקל או המצב הבריאותי של העגלים. בנוסף, לא נמצא קשר מובהק בין תוצאות בדיקת הכשרות לבין נוכחות של MB (או מיקופלסמות אחרות), סטטוס סרולוגי או תוצאה פתולוגית. יש לציין שכיוון שלא התקבלו מספיק דגימות ריאה מבקר מקומי לא היה באפשרותנו להשוות את נתוני השחיטה, תוצאות הפתולוגיה, זיהוי של MB וסטטוס סרולוגי בין שתי קבוצות הבקר: מקומי ומיובא.
2. סיווג מולקולרי שבוצע על בידודי MB משני משקים B ו-S הראה נוכחות של גנוטיפים שונים של החיידק MB בשני המשקים. במשק B נתגלו לפחות שתי אוכלוסיות שונות של חיידקים: אחת "מקומית" ואחד "מיובא" שלא התערבבו ביניהן, לפחות בעגלים שנבדקו. לעומתו, תוצאות הסיווג במשק S מצביעות על הדבקה של הבקר המקומי על ידי חשיפה לחיידקי MB "שהגיעו" עם הבקר המיובא. יחד עם זאת, בבקר מקומי התגלה גם חיידק MB עם גנוטיפ שונה מאלו שנמצאו בבקר הליטאי, דבר שמצביע על מספר מקורות הדבקה של הבקר הישראלי במשק S.
3. מכיוון שמש' המשקים עם סימני BRD שנבדקו במחקר הנוכחי היה קטן (4), אין להגיע למסקנה כוללת על מעורבות של MB במחלה הזאת בישראל.
4. תוצאות המחקר מצביעות על כך שבמידה וקיים חשד במעורבות של החיידק *M. dispar* ב-BRD יש לשלוח דגימות TTA למעבדה ולא דגימות מהאף.

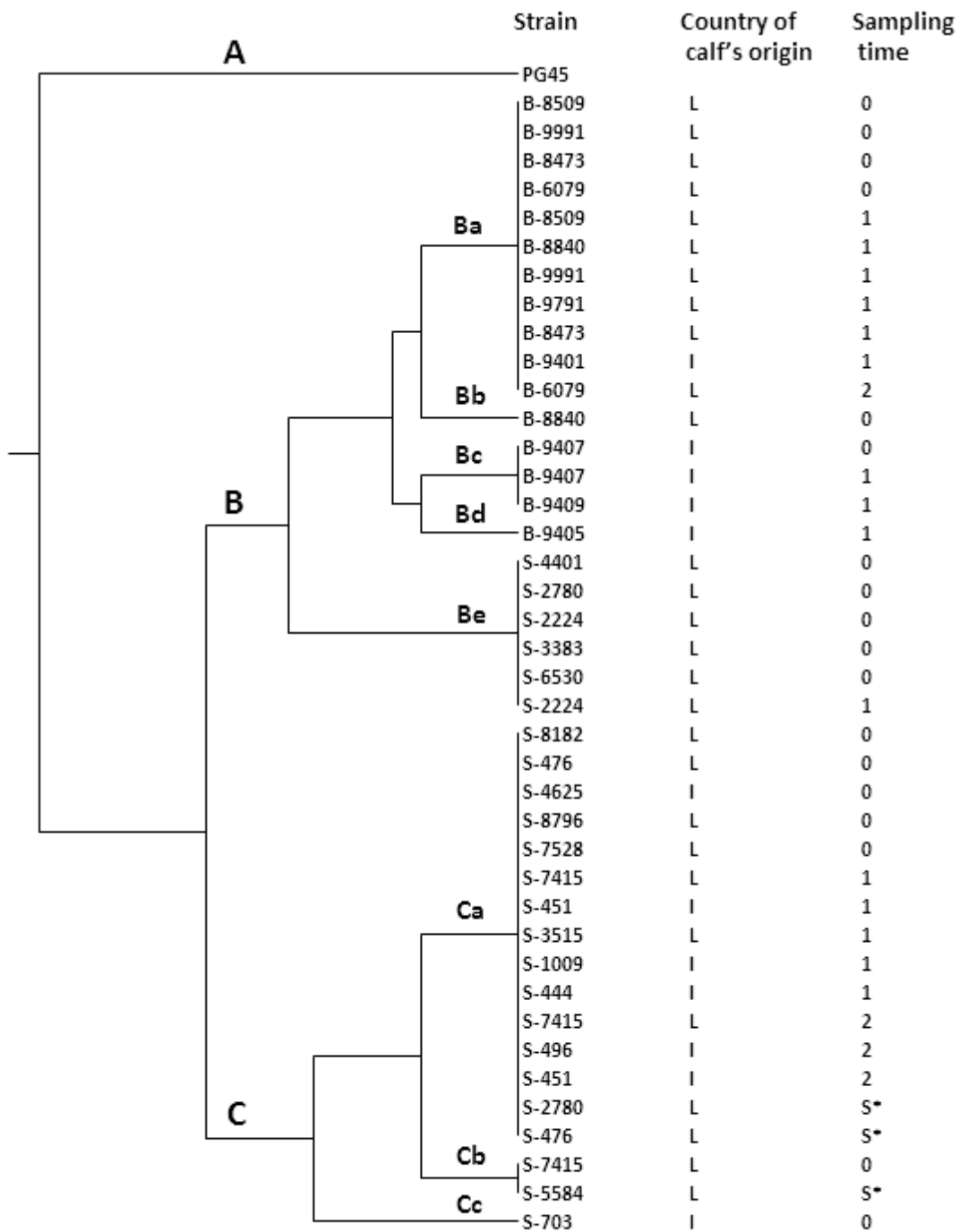
טבלה מס' 3: תוצאות בקטריולוגיה, PCR וסרולוגיה שהתקבלו במהלך שלושה דיגומים מעגלים מקומיים ומיובאים בשתי מפטמות.

	Sampling time	Prevalence (%) (number positive/number tested)			
		Feedlot B		Feedlot S	
		Local calves	Imported calves	Local calves	Imported calves
<i>M. bovis</i> seropositive (%)	Time 0	15 (3/20)	70 (14/20)	16 (3/19)	94 (17/18)
	Time 1	85 (17/20)	100 (19/19)	88 (15/17)	100 (18/18)
	Time 2	94 (17/18)	100 (19/19)	100 (18/18)	94 (17/18)
<i>M. bovis</i> PCR (nasal swabs & TTL) (%)	Time 0	5 (1/20)	75 (15/20)	16 (3/19)	67 (12/18)
	Time 1	30 (6/20)	68 (13/19)	53 (9/17)	33 (6/18)
	Time 2	0 (0/18)	5 (1/19)	11 (2/18)	11 (2/18)
	Slaughter	NT	NT	0 (0/8)	47 (8/17)
Mollicutes culture (nasal swabs & TTL) (%)	Time 0				
	Total positive	70 (14/20)	90 (18/20)	95 (18/19)	83 (15/18)
	<i>M. bovis</i>	0 (0/20)	75 (15/20)	5 (1/19)	50 (9/18)
	<i>M. alkalesence</i>	10 (2/20)	0 (0/20)	5 (1/19)	33 (6/18)
	<i>M. dispar</i> *	0 (0/20)	5 (1/20)	26 (5/19)	22 (4/22)
	Time 1				
	Total positive	80 (16/20)	100 (19/19)	88 (15/17)	83 (15/18)
	<i>M. bovis</i>	25/ (5/20)	53 (10/19)	35 (6/17)	28 (5/18)
	<i>M. alkalesence</i>	15 (3/20)	11 (2/19)	18 (3/17)	11 (2/18)
	<i>M. dispar</i>	0 (0/20)	5 (1/19)	0 (0/17)	0 (0/18)
	Time 2				
	Total positive	28 (5/18)	32 (6/19)	72 (13/18)	50 (9/18)
	<i>M. bovis</i>	0 (0/18)	5 (1/19)	11 (2/18)	6 (1/18)
	<i>M. alkalesence</i>	6 (1/18)	16 (3/19)	11 (2/18)	6 (1/18)
	<i>M. dispar</i>	0 (0/18)	0 (0/19)	0 (0/18)	0 (0/18)
	Slaughter				
Total positive	NT	NT	63 (5/8)	59 (10/17)	
<i>M. bovis</i>	NT	NT	0 (0/8)	47 (8/17)	
<i>M. alkalesence</i>	NT	NT	63 (5/8)	12 (2/17)	
<i>M. dispar</i>	NT	NT	0 (0/8)	41 (7/17)	
BVD seropositive (%)	Time 0	(5/20) 25	55 (11/20)	47 (9/19)	22 (4/18)
	Time 1	(6/20) 30	53 (10/19)	18 (3/17)	28 (5/18)
	Time 2	(8/18) 44	58 (11/19)	17 (3/18)	28 (5/18)
IBR seropositive (%)	Time 0	(12/20) 60	50 (10/20)	100 (19/19)	89 (16/18)
	Time 1	(12/20) 60	53 (10/19)	12 (2/17)	0 (0/18)
	Time 2	(0/18) 0	5 (1/19)	39 (7/18)	6 (1/18)
PIV3 seropositive (%)	Time 0	100 (20/20)	100 (20/20)	95 (18/19)	100 (18/18)
	Time 1	95 (19/20)	100 (19/19)	76 (13/17)	100 (18/18)
	Time 2	NT	NT	100 (18/18)	100 (18/18)
BRSV seropositive (%)	Time 0	95 (19/20)	75 (15/20)	84 (16/19)	100 (18/18)
	Time 1	100 (20/20)	100 (19/19)	85 (15/17)	100 (18/18)
	Time 2	100 (18/18)	100 (19/19)	89 (16/18)	100 (18/18)

NT- not tested

* *M. dispar* was isolated only from TTL at sampling time 1.

איור מס' 2: תוצאות הסיווג בשיטת ה-MLVA.



0.05

* Slaughter

טבלה 4: תוצאות הדיגום של עגלים בזמן התפרצות של BRD.

מס' עגלים חיובים בבדיקות אחרות	מס' עגלים חיובים למין אחר של מיקופלסמה	מס' עגלים חיובים ל-MB ב-ELISA	מס' עגלים חיובים ל-MB בנידוד/PCR	מס' TTA	גיל (חודשים)	מס' עגלים	שם המשק
IBR: 9/11 BVD: 7/11 PI: 11/11 BTV: 10/11	1/11 <i>M. dispar</i>	1/11	1/11	11	1-6	11	1
<i>P. multocida</i> : 5/10 IBR: 4/10 BVD: 2/10 PI: 9/10	6/10 <i>M. dispar</i>	8/10	8/10	10	3-4	10	2
שילי בבקטריולוגיה וירולוגיה: לא נבדק	7/10 <i>M. dispar</i> 1/10 <i>M. bovirhinis</i>	0/10	0/10	10	3-6	10	3
<i>P. multocida</i> : 3/10 וירולוגיה: לא נבדק	5/10 <i>M. dispar</i> 5/10 <i>M. arginini</i> 5/10 <i>M. bovirhinis</i>	4/10	9/10	10	3-4	10	4

- Amram, E., Freed, M., Khateb, N., Mikula, I., Blum, S., Spargser, J., Sharir, B., Ozeri, R., Harrus, S., Lysnyansky, I., 2013, Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle. Vet J Online.
- Arcangioli, M.A., Aslan, H., Tardy, F., Poumarat, F., Grand, D.L., 2011, The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. Vet. J. 192, 96-100.
- Arcangioli, M.A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bezille, P., Poumarat, F., Le Grand, D., 2008, The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. Vet. J. 177, 89-93.
- Ben Shabat, M., Mikula, I., Gerchman, I., Lysnyansky, I., 2010, Development and evaluation of a novel single-nucleotide polymorphism real-time PCR assay for rapid detection of fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma bovis*. J. Clin. Microbiol. 48, 2909-2915.
- Butler, J.A., Pinnow, C.C., Thomson, J.U., Levisohn, S., Rosenbusch, R.A., 2001, Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. Vet. Microbiol. 78:, 175-181.
- Caswell, J.L., Archambault, M., 2007, *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. Anim. Health Res. Rev. 8, 161-186.
- Gagea, M.I., Bateman, K.G., van Dreumel, T., McEwen, B.J., Carman, S., Archambault, M., Shanahan, R.A., Caswell, J.L., 2006, Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. J. Vet. Diagn. Invest. 18, 18-28.
- Haines, D.M., Moline, K.M., Sargent, R.A., Campbell, J.R., Myers, D.J., Doig, P.A., 2004, Immunohistochemical study of *Hemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hemolytica*, and bovine viral diarrhea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. Can Vet J 45, 231-234.
- Hanzlicek, G.A., White, B.J., Renter, D.G., Anderson, D.E., Larson, R.L., 2011, Associations between the prevalence of Mollicutes and *Mycoplasma bovis* and health and performance in stocker calves. Vet. Rec. 168, 21.
- Maunsell, F.P., Donovan, G.A., 2009, *Mycoplasma bovis* infections in young calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 25, 139-177.
- Nicholas, R., Baker, S.E., 1998, Recovery of mycoplasmas from animals, In: Miles, R.J., Nicholas, R.A.J. (Eds.) Methods in Molecular Medicine, Mycoplasma Protocols. Humana Press, Totowa NJ, pp. 37-44.
- Nicholas, R.A., 2011, Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. Vet. Rec. 168, 459-462.
- Nicholas, R.A., Ayling, R.D., 2003, *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. Res. Vet. Sci. 74, 105-112.
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R., McAuliffe, L., 2009, Mycoplasma Diseases of Ruminants. CABI, Wallingford, UK, 300 p.
- Pinho, L., Thompson, G., Rosenbusch, R., Carvalheira, J., 2012, Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J. Microbiol. Methods 88, 377-385.
- Poumarat, F., Le Grand, D., Philippe, S., Calavas, D., Schelcher, F., Cabanie, P., Tessier, P., Navetat, H., 2001, Efficacy of spectinomycin against *Mycoplasma bovis* induced pneumonia in conventionally reared calves. Vet Microbiol 80, 23-35.
- Prysljak, T., van der Merwe, J., Lawman, Z., Wilson, D., Townsend, H., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Perez-Casal, J., 2012, Respiratory disease caused by *Mycoplasma bovis* is enhanced by exposure to bovine herpes virus 1 (BHV-1) but not to bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 2. Can. Vet. J. 52, 1195-1202.
- Radaelli, E., Luini, M., Loria, G.R., Nicholas, R.A., Scanziani, E., 2008, Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. Res. Vet. Sci. 85, 282-290.
- Shahriar, F.M., Clark, E.G., Janzen, E., West, K., Wobeser, G., 2002, Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. Can. Vet. J. 43, 863-868.
- Spargser, J., Macher, K., Kargl, M., Lysnyansky, I., Rosengarten, R., 2013, Emergence, re-emergence, spread and host species crossing of *Mycoplasma bovis* in the Austrian Alps caused by a single endemic strain. Vet. Microbiol. Online.
- Timsit, E., Arcangioli, M.A., Bareille, N., Seegers, H., Assie, S., 2012, Transmission dynamics of *Mycoplasma bovis* in newly received beef bulls at fattening operations. J. Vet. Diagn. Invest. 24, 1172-1176.
- Tschopp, R., Bonnemain, P., Nicolet, J., Burnens, A., 2001, Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves. Schweiz Arch Tierheilkd 143, 461-467.

Abstract

Evaluation of the role of *Mycoplasma bovis* and other viral and bacterial pathogens in bovine respiratory diseases and kashrut condemnation of feedlot cattle

¹Lysnyansky, I., ¹Gerchman, I., ²Blum, S., ³Perl, S., ⁴Friedgut, O.,
⁵Sharir, B., and ⁶Klement, E

¹Mycoplasma unit, Department of Avian and Fish Diseases; ²Department of Clinical Bacteriology and Mycology; ³Department of Pathology; ⁴Department of Virology, Kimron Veterinary Institute; ⁵Hachklait Veterinary Services LTD; and ⁶Koret School of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Israel

Mycoplasma bovis is increasingly recognized by the veterinary and livestock communities as having an important impact on the health, welfare and productivity of dairy and beef cattle. In Israel, *M. bovis* is mostly associated with bovine respiratory disease (BRD) and is very often isolated from the lungs of cattle with pneumonia. In addition, outbreaks of BRD with isolation of *M. bovis* have occurred in imported calves in quarantine. It is well known that stress factors such as transportation and high density may cause clinical manifestations of latent infections. Moreover, introduction of newly-purchased animals (from other local farms or imported calves from different European countries and Australia) and high turnover of animals within feedlots that are sometimes located in close proximity to dairy herds may have significant impact on the livestock industry. This may result in introduction of *M. bovis* into a naïve population or exposure to new, maybe more pathogenic, *M. bovis* strains. The aims of this study were to understand the spread of *M. bovis* infection within a feedlot and to evaluate the involvement of *M. bovis* in BRD in Israel. The samples, *transtracheal aspiration* (TTA) and serum from local and imported calves were collected on two feedlots (B and S) at three different time points and tested for *Mollicutes*, bacterial and viral pathogens. Molecular typing of *M. bovis* field strains using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) revealed the presence of two different populations: “local” and “imported”, which did not become mixed, in the cohort of calves tested on farm B. In contrast, MLVA analysis performed on farm S indicated that imported animals served as a source of *M. bovis* infection for local calves present on the farm. However, this apparently was not a unique occurrence, as evidenced by the presence of a “local” *M. bovis* strain with an MLVA genotype differing from those previously identified in the cohort of imported strains. No correlation was found between *M. bovis* seroconversion and weight and health outcomes. In addition, no significant correlation was identified between results of kashruth examination and serological status, presence of *M. bovis*/other mycoplasmas within the lungs or histopathological examinations. An involvement of *M. bovis* in BRD was analyzed on samples arrived from four feedlots at the time of outbreaks. *M. bovis* was identified in 18/41 calves (in 3/4 feedlots), with a high incidence of positive samples (8/10 and 9/10) in feedlots number 2 and 4 and 1/11 positive in feedlot 1. The antibody titer against *M. bovis* ranged from 0 to 80. Co-infection of *M. bovis* with *Mycoplasma dispar* was also diagnosed on those farms. Indeed, *M. dispar* was identified in 1/11, 6/10 and 5/10 of samples received from feedlots 1, 2 and 4, respectively. Moreover, 7/10 TTA samples from feedlot 3 contained only *M. dispar*. In addition, *Pasteurella multocida* was isolated in 30% and 50% of the samples from feedlots 2 and 4 supported the multifactorial nature of BRD. Unfortunately, only four feedlots with BRD signs were received for laboratory analyses in this study; consequently at this stage it is not possible to draw a decisive decision regarding the involvement of *M. bovis* in BRD in Israel.