

## יישום שיטת ה-Flow cytometry לזיהוי מהיר של מיקופלסמה אגלקטיה

### מיקופלסמה בוביס בדוגמאות חלב

א. ליסניסקי<sup>1</sup>, א. קריפוקס<sup>2</sup>, מ. פריד<sup>3</sup>, ג. לייטנר<sup>2</sup>

<sup>1</sup>היחידה למיקופלסמה, החטיבה למחלות עופות, <sup>2</sup>החטיבה לבקטריולוגיה המכון הווטרנרי ע"ש קמרון, בית-דגן; <sup>3</sup>המערך הארצי לבריאות העטין ואיכות החלב, מועצת החלב

### תקציר מדעי של תוכנית המחקר:

שיטות האבחון למיקופלסמה אגלקטיה (MA) ומיקופלסמה בוביס (MB) בחלב הקיימות כיום הן: בידוד של החיידק וסיווגו ע"י הגבה עם נוגדנים ספציפיים בשיטות שונות, זיהוי ע"י PCR ובדיקת נוגדנים במבחן ELISA. לכל שיטה ישנם יתרונות וחסרונות. בידוד של ה-MB/MA הוא תהליך שגוזל זמן רב. עלות מבחני PCR גבוהה כאשר מדובר בבדיקה של מספר רב של דוגמאות חלב. בנוסף לכך, תוצאה חיובית ב-PCR לא בהכרח מצביעה על מעורבות של MA/MB במחלה, אלא על נוכחות החיידק בחומר הנבדק (זיהום חיצוני בדוגמאות שמקורו אינו בחלב). כמו כן, תשובה שלילית ב-PCR אינה יכולה להיחשב חד משמעית. שיטת ה-ELISA לגילוי הנוגדנים בדם או בחלב מאפשרת סריקה מהירה של מספר דוגמאות רב אך לצורך פיקוח, התשובה המתקבלת הינה חלקית מאחר ובדיקה זו אינה יכולה לאשר או לשלול נוכחות MA/MB בבע"ח.

שיטת ה-Flow cytometry (FACS) הינה שיטה מהירה ורגישה, ללא צורך בבידוד של החיידק או בהעשרה. שיטה זו משמשת לצורכי מחקר ובדיקות שגרתיות לרבות בקטריאליות. העיקרון של השיטה מבוסס על הזרמת תאים מסומנים בחומר זרחני (פלואורסצנטי) בנוזל וספירתם לפי גודל וגרעין. בנוסף, במידה ותא החיידק מסומן בסמן ספציפי ניתן לקרוא את הסיגנל, וכך לזהות את החיידק בדוגמה. שיטת ה-FACS יכולה להיות הן כמותית והן איכותית בקריאה מהירה של תאים בדוגמה.

**מטרת המחקר** הייתה לבחון שימוש בטכניקת ה-FACS לצורך זיהוי מהיר של MB ו-MA בדוגמאות חלב. במהלך המחקר התרכזנו בהעמדה ואימות של שיטת ה-FACS. כגלאי השתמשנו בנוגדנים פוליקלונליים ייחודיים ל-MB/MA הקשורים ל-FITC (חומר פלואורסצנטי). בדיקות הרגישות של השיטה, שנעשתה עם חיידקים (זני יחוס וזני שדה) בריכוזים ידועים, הראתה שנוגדנים פוליקלונליים במהול 1:100 מזהים כ- $10^4$  ומעלה חיידקים/מ"ל הן בתמיסת PBS והן בחלב רזה ומלא. לא נצפו הבדלים משמעותיים בזיהוי חיידקי מיקופלסמה ( $10^4$  תאים/מ"ל) בשיטת ה-FACS בין חלב טרי לבין קפוא. בנוסף, הספציפיות של נוגדנים פוליקלונליים כנגד MA/MB נבדקה מול חיידקי *E. coli* שהוכנסו ל-PBS ולחלב בריכוזים ידועים. הבדיקה הראתה שנוגדנים פוליקלונליים אנטי MA/MB אינם קושרים

חיידקי *E. coli*. יחד עם זאת, נמצא שקיימת תגובה צולבת בין הנוגדנים האנטי MA/MB בזיהוי של MB ו-MA. גם נוגדן חד שבטי MY11-320.1 זהה חיידקי MB בריכוז של  $10^4$  תאים/מ"ל ומעלה ב-PBS ובחלב. כיוון שהנוגדן הפסיק לעבוד חודשיים אחרי רכישתו, לא הצלחנו להעריך את הספציפיות שלו. שימוש בנוגדן חד שבטי מעלה את מחיר הבדיקה, דבר שאינו מאפשר שימוש בשיטת ה-FACS לצורכי בעור וניטור.

### **מבוא ותיאור הבעיה:**

אגלקטיה מדבקת (CA) הינה מחלת צאן הנגרמת ע"י כמה מיני מיקופלסמה, כשהנפוץ בהם הוא מיקופלסמה אגלקטיה (MA). חיידק זה אנדמי בארץ ובאזורים אחרים הגובלים בים התיכון, באפריקה ובאסיה (6, 9, 22). בישראל, מחלת ה-CA בעזים נגרמת על ידי מספר מינים של מיקופלסמה, כגון MA, *M. mycoides mycoides* LC, *M. capricolum ssp. capricolum*, *M. mycoides capri* ו-*M. putrefaciens* ובכבשים הגורם ל-CA הוא MA. אף אל פי כן, ארגון ה-OIE והרשויות הוטרינריות במרבית המדינות בהן מחלת CA מהווה בעיה כלכלית משמעותית (איטליה, ספרד, צרפת, יוון, אלבניה) מתייחסים, בנוהלי הפיקוח והבקרה, רק ל-MA, אולי בגלל הדומיננטיות של שלוחת הכבשים בארצות אלו.

מחלת ה-CA מתבטאת בירידה קשה בתנובת החלב, דלקת פרקים, דלקת עיניים ואף תמותה, בעיקר בוולדות. חשוב לציין שלא כל הסימנים מופיעים בכל שלב בהתפרצות המחלה ואירוע אחד יכול להיות שונה מאחר. באופן כללי סימני המחלה חריפים יותר בגזעי עזים מושבחים בהשוואה לעזי באלדי או כבשים (22). הנזק מ-CA במדינות האירופאיות הנמצאות סביב הים התיכון מוערך בכ-30 מיליון \$ בשנה. בישראל, במהלך השנים 1990 עד 1997 נרשמו כ-68 אירועי CA בעדרי צאן, כמחציתם בעדרי עזים. בשנת 1997 בלבד אובחנה MA ב-13 עדרים: 7 עדרי כבשים, 4 עדרי עזים ו-2 עדרים מעורבים. באותה השנה רק באירוע אחד של CA אובחן מין מיקופלסמה אחר כגורם המחלה. לפי הנתונים העדכניים של המעבדה הרפנטית למיקופלסמה (המכון הוטרינרי ע"ש קמרון) ב-2003 אובחן חיידק MA ב-10 עדרי צאן (4 מהם עדרי עזים), ב-2005 ב-10 עדרי צאן (3 מהם עדרי עזים), ב-2006 ב-11 עדרי צאן (2 מהם עדרי עזים), ב-2007 ב-3 עדרי צאן (1 מהם עדר עזים), ב-2008-2009 ב-3 עדרי צאן כל שנה (2 מהם עדרי עזים). באותן שנים היו גם בידודים של מינים אחרים (מאשר MA) של מיקופלסמה הגורמים למחלת ה-CA בעזים. ללא ספק, נתונים אלו מהווים תמונה חלקית בלבד, בחלקו כתוצאה מחוסר דיווח של מקרים קליניים. לכן, ההשערה שלנו היא שמספר עדרי הצאן בהם נמצא חיידק MA גדול בהרבה ממספר האירועים שאובחנו ויש מקרים שאינם מגיעים לקביעה מעבדתית של גורם המחלה.

חיידק המיקופלסמה *נוביס* (MB) הינו חיידק הדומה מאד מבחינה גנטית ל-MA ומהווה גורם תחלואה חשוב בבקר. החיידק מחולל מחלות כגון: דלקת עטין, דלקת ריאות, דלקת פרקים ומחלות

במערכת המין של הבקר (7, 13). אף על פי שבישראל, עיקר נזקיו של MB הם במעורבותו במחלות נשימה כחלק מהקומפלקס הנשימתי בבקר (Bovine respiratory disease complex – BRD), בשנת 2008 הופיעה התפרצות של דלקות עטין שבמהלכה אובחנו 18 עדרים (56 פרות) נגועים ב-MB. להשוואה, עד 2008, אובחנו מקרים בודדים של MB מדלקות עטין (מקסימום 3 עדרים חיוביים בשנה). בשנים 2009-2010 אובחנו דרך דגימות חלב 10 עדרים חדשים חיוביים ל-MB (Freed, M., unpublished results). בעת אבחון של דלקת עטין בה מעורב חיידק MB, מומלץ להוציא את החיה הנגועה מהעדר וכמו-כן לערוך בדיקה פרטנית של הפרות בעדר החשוד כנגוע.

שיטות האבחון ל-MA ול-MB בחלב הן: (א) זיהוי נוכחות החיידק ע"י בידוד במצע סלקטיבי וסיווגו ע"י הגבה עם נוגדנים ספציפיים ל-MA ול-MB בטכניקות שונות; (ב) זיהוי דנ"א מיקופלסמתי באמצעות מבחנים מולקולאריים כגון ריאקציות PCR, המזהות גנים שונים ו(ג) בדיקת נוגדנים בשיטת ה-ELISA (10, 16-18, 21, 24). לכל שיטה ישנם יתרונות וחסרונות. בידוד של MA/MB הוא תהליך שגוזל זמן רב. בנוסף, במידה ומדובר בהדבקה מעורבת עם מיקופלסמות פתוגניות או ספרופטיות אחרות שגדלות מהר יותר מאשר MA (דוגמת ה-*M. mycoides mycoides* LC או ה-*M. mycoides capri*), אחוזי ההצלחה בבידוד יורד. מבחני PCR מקצרים באופן משמעותי את זמן קבלת התשובה (מחמישה ימים עד 24 שעות), אבל הם יקרים כאשר מדובר בבדיקה של מספר רב של דוגמאות חלב. בנוסף לכך, תוצאה חיובית ב-PCR לא בהכרח מצביעה על מעורבות של MA/MB במחלה, אלא על נוכחותם בחומר הנבדק (זיהום חיצוני בדוגמאות שמקורו אינו בחלב). כמו כן, תשובה שלילית ב-PCR אינה יכולה להיחשב חד משמעית. שיטת ה-ELISA לגילוי הנוגדנים בדם או בחלב מאפשרת סריקה מהירה של מספר דוגמאות רב אך שימוש בשיטה זו למטרות פיקוח מספק תשובה חלקית בלבד מאחר ואין באפשרותה לשלול או לאשר נוכחות MA/MB בבע"ח. ידוע שחיידקי ה-MA וה-MB יכולים לשרוד בבע"ח בנוכחות נוגדנים, אבל אין מידע על פרק הזמן של השארות הנוגדנים לאחר "העלמות" החיידקים. שיטת ה-Flow cytometry (FACS) הינה שיטה מהירה, רגישה וספציפית, ללא צורך בבידוד של החיידק או בהעשרה. שיטה זו משמשת לצורכי מחקר ובדיקות שגרתיות לרבות בקטריאליות. בעשור האחרון שיטת ה-FACS משמשת לתחומים שונים של מיקרוביולוגיה ומאפשרת לבצע בדיקות כמותיות, ביוכימיות ופיזיולוגיות (1). העיקרון של השיטה מבוסס על מיון של תאים בנוזל וספירתם לפי גודל וגרעין ובמידה ותא מסומן בסימון זרחני ניתן להעריך את כמות התאים החיוביים (סימון התאים יכול להיעשות למשל בחומר פלואורסנטי או בצבע זרחני). שיטת ה-FACS יכולה להיות הן כמותית והן איכותית (לפי ספציפיות של הנוגדן המזהה או לפי חומר פלואורסצנטי) ומאפשרת קריאה מהירה של התאים שבדוגמה. שיטת ה-FACS נמצאה בשימוש רחב לזיהוי חיידקים נפוצים, לרבות זיהוי חיידקיים בחלב בקר ובאבקות חלב (10-12, 14-15). בתחום המיקופלסמה, שיטת ה-FACS שימשה (א) לצורך לימוד של תהליכי האינטראקציה בין מיקופלסמות לבין תאים האאוקריוטיים או תאים של מערכת החיסון של הפונדקאי; (ב) איתור של הזיהום המיקופלסמתי בתרביות רקמה; (ג) זיהוי והתמיינות של מינים שונים

של מיקופלסמה באמצעות נוגדנים ספציפיים; (ד) חקר של תופעת שונות אנטיגנים; (ה) כימות של מיקופלסמות במצע נוזלי (ו) וקביעת MIC (1). לאחרונה, דווח על יישום שיטת ה-FACS לזיהוי של *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC במצע נוזלי (3, 4). חשוב לציין ששימוש בטכניקה FACS בחלב לצורך זיהוי חיידקי מיקופלסמה נעשה ע"פ כל הדיווחים ע"י אינוקוליאציה של החיידקים המסומנים מראש. הסימון נעשה בחומרים פלואורסצנטיים שמסמנים את ה-DNA הבקטריאלי ולא ב נוגדן כלשהי.

**מטרת המחקר** הייתה לבחון שימוש בטכניקה Flow cytometry לצורך זיהוי מהיר של מיקופלסמה אנלקטיה ומיקופלסמה בוביס בדוגמאות חלב.

#### תת מטרות:

1. קביעת הרגישות של מבחן FACS.
2. קביעת הסגוליות של מבחן FACS.

#### חומרים ושיטות:

**זני מיקופלסמה ששימשו במהלך המחקר ותנאי גידולם.** זני MB הכילו זן יחוס *M. bovis* type strain PG45 ושני זני שדה ישראליים A ו-B שבודדו מדלקת עטין ב-2007 וב-2008, בהתאמה. זני MA הכילו זן יחוס *M. agalactiae* type strain PG2 וזן שדה ישראלי C שבודד מדלקת עטין ב-2008. גידול של חיידקי מיקופלסמה נעשה על מצע MB נוזלי ו/או מוצק עם תוספת של purvate phosphate (0.5% w/v) ו- של phenol red (0.005% w/v) לפי המלצתו של Hannan (13). חיידקים במצע נוזלי שהגיעו לפאזה לוגריטמית (שינוי צבע המצע מאדום לכתום-צהוב) חולקו למבחנות של 1.0-1.5 מ"ל והוקפאו ב-80°C. הגדרת מין המיקופלסמה במצע מוצק נעשה על ידי הגבת מושבות עם נוגדנים ספציפיים בשיטת אימונופלורסנציה (IMF).

**טיטרציה של חיידקי המיקופלסמה.** מספר חיידקי המיקופלסמה החיים (ccu/מ"ל) נקבע בשיטה סטנדרטית (23) במתכונת מיקרופלטה, עם 8 חזרות לכל תרבית. חישוב של most probable number (MPN) נעשה בעזרת לוח סטטיסטי מתאים (19). ריכוזי הסטוק נעו בין  $10^8$ - $10^9$  חיידקים/מ"ל.

#### נוגדנים.

נוגדנים ששימשו במהלך המחקר הם polyclonal monospecific antibodies:

*Mycoplasma bovis* fluorescein labeled globulin (horse)

*Mycoplasma agalactiae* fluorescein labeled globulin (horse)

*Mycoplasma gallisepticum* fluorescein labeled globulin

*Mycoplasma meleagridis* fluorescein labeled globulin (donkey)

הנוגדנים במהולים 1:40 ו-1:100 שימשו ל-IFM ולשיטת ה-FACS, בהתאמה. ידוע על קיימה של התגובה הצולבת בין נוגדן אנטי MB לבין חיידקי MA ובין נוגדן אנטי MA ובין חיידקי MB ב-IFM. לא ידוע על קיום של תגובות צולבות בין נוגדני אנטי MG ו-MM לבין חיידקי MB ו-MA והפוך. נוגדן חד שבטים MY11-320.1 המזהה MB נרכש מחברת ה- (Abcam(Cambridge,UK). הנוגדן במיהול 1:100 נבדק בשיטת ה-FACS.

### הכנת החיידקים לבדיקה בשיטת ה-FACS.

חיידקי MB ו-MA גודלו במצע MB עד שינוי צבע של המצע מאדום לכתום-צהוב ( $10^8$ - $10^9$  חיידקים/מ"ל). אחד מ"ל של חיידקים סורכו ב 12000 g במשך 10 דקות, הפלט נשטף ב-PBS וסורכו שוב ב 12000 g למשך 10 דקות. אחרי השטיפה, חיידקי מיקופלסמה הורחפו ב-1 מ"ל PBS (ריכוז  $\sim 10^8$  חיידקים/מ"ל). הסימון בוצע עם חומר זרחני FITC (100  $\mu\text{g/ml}$ ) בחושך, למשך 45 דקות בטמפרטורת החדר. אחרי 3 שטיפות עם PBS, החיידקים הורחפו ב-1 מ"ל של PBS ונבחנו במכשיר FACS. סימון של חיידקים בריכוזים  $10^3$  -  $10^7$  בנוגדנים פלואורסצנטיים נעשה בנפח של  $50 \mu\text{l}$  בתוספת של  $50 \mu\text{l}$  של נוגדן פלואורסצנטי במהול 1:100. הסימון בוצע תוך הדגרה בטמפרטורת החדר למשך 30-45 דקות. בתום הסימון, החיידקים נשטפו פעמים ב-PBS. החיידקים הועברו למבחנות מיוחדות לקריאה במכשיר FACS.

### טיפול בחלב מלא.

קיימים פרוטוקולים שונים המאפשרים לעלות את רגישות של שיטת ה-FACS בזיהוי חיידקים בחלב. אחד מהם הוא שימוש בתמיסה "לניקוי" חלב שמומלץ לשימוש במכשיר BactoScan. התמיסה כוללת 0.1% X-100 Triton ואנזימים פרוטאוליטיים כגון Protease K ו-Savinase. מהולים עשורניים של חיידקי ה-MB הוכנו ב-1 מ"ל של חלב מלא. מכל המהולים נלקחו  $100 \mu\text{l}$  ולהם הוספו  $50 \mu\text{l}$  של Protease K (0.05 mg),  $10 \mu\text{l}$  של Savinase (Sigma-Aldrich, St.Louis,MO,US) ו- $50 \mu\text{l}$  של X-100 Triton 0.1%. מבחנות הודגרו ב- $37^\circ\text{C}$  במשך 45 דקות. בתום ההדגרה, המבחנות סורכו ב-12000g למשך 15-20 דקות. הפלט הורחף ב-1 מ"ל של PBS וסורכו שוב ב 12000 g למשך 20 דקות. סימון של החיידקים בנוגדן פלואורסצנטי נעשה כפי שפורט לעיל.

### קביעת הרגישות של מבחני ה-FACS.

א. בתנאי "in vitro" תוך זיהוי של חיידקי MB/MA ב-PBS.

סדרת מהולים עשרוניים ( $10^3 - 10^7$ ) של חיידקי MB ו-MA הוכנה ב-PBS. החיידקים בריכוזים שונים סומנו תוך חשיפתם לנוגדן הספציפי המסומן בחומר פלואורסצנטי. בתום תהליך הסימון, בוצעה קריאה של הסימון המתקבל במכשיר FACS.

#### **ב. בתנאי "in vitro" תוך זיהוי של חיידקי MB/MA בחלב רזה/מלא.**

סדרת מהולים עשרוניים ( $10^3 - 10^7$ ) של חיידקי MB ו-MA הוכנה בחלב רזה (10%) ומלא של בקר או עזים. החיידקים בריכוזים שונים סומנו תוך חשיפתם לנוגדן הספציפי המסומן בחומר פלואורסצנטי. בתום התהליך הסימון, בוצעה קריאה של הסימון המתקבל במכשיר FACS.

#### **בדיקת הספציפיות של נוגדנים פוליקלונליים.**

ספציפיות של הנוגדנים, אנטי MB ו-MA נבדקה מול חיידקי *E. coli*. בנוסף, נוגדנים פוליקלונליים המזהים מיקופלסמות של עופות *M. gallisepticum* (MG) ו-*M. meleagridis* (MM) נבדקו ביכולתם לזהות חיידקי MB ו-MA ב-PBS וב-חלב.

#### **תוצאות ודיון:**

#### **העמדת שיטת ה-FACS.**

**א) בדיקת הרגישות של שיטת ה-FACS תוך שימוש בנוגדנים פוליקלונליים המסומנים ב-FITC.**

בשלב ראשון, בדקנו יכולת של חיידקי MB/MA להסתמן ב-FITC ולזהותם ב-FACS. מהולים עשרוניים ( $10^3 - 10^7$ ) של חיידקי MB ו-MA מסומנים ב-FITC בתמיסת PBS ובחלב רזה (1%) של בקר ועזים נבחנו. התוצאות הראו שניתן לזהות חיידקי MB/MA מריכוז של  $10^4$  cfu/ml ומעלה, הן בתמיסת PBS והן בחלב (תרשים מס' 1). הניסוי נעשה מספר פעמים, בהן התוצאות חזרו על עצמן. בשלב שני, נבדק ריכוז העבודה של הנוגדנים הפוליקלונליים. נוגדנים במהולים 1:100, 1:200 ו-1:400 מסומנים בסמן פלואורסצנטי הוגבו עם חיידקי MB/MA בריכוזים שונים בתמיסת PBS. נמצא, שנוגדנים במהול 1:100 זהו כ- $10^4$  חיידקים/מ"ל בעצמה הכי חזקה (תרשים מס' 2), לכן, בהמשך העבודה השתמשנו בנוגדנים במהול הזה.

בשלב שלישי, נבדקה יכולת של אותם נוגדנים פוליקלונליים לזהות חיידקי MB/MA בתמיסת PBS ובחלב רזה (1%). זני יחוס וזני שדה של MB/MA במהולים  $10^3 - 10^7$  חיידקים/מ"ל הוגבו עם נוגדנים במהולים 1:100. חיידקים ללא סימון שימשו כביקורת שלילית וחיידקים המסומנים ב-FITC שימשו כביקורת חיובית. מתוצאות שמוצגות בתרשים מס' 3 ניתן לראות שנוגדנים פוליקלונליים זיהו כ- $10^4$  חיידקים/מ"ל הן ב-PBS והן בחלב.

לאחרונה, דווח על יישום שיטת ה-FACS לזיהוי וכימות של *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC במצע נוזלי (3, 4). בעבודה הזאת השתמשו בסמן פלואורסנטי דוגמת ה-SYBR green, הצובע את הדני"א הבקטריאלי, בשילוב עם שיטת ה-FACS. תוצאות ה-FACS הושוו לתוצאות של ה-plate count method המחשב מספר מושבות של החיידק בפלטה (colony forming units, CFUs). נמצא, כי הריכוז הנמוך ביותר של החיידקים המזוהה בשיטת ה-FACS הוא  $10^4$  תאים/מ"ל ואילו בשיטת ה-plate count method הריכוז הוא  $10^3$  תאים/מ"ל (4). בעבודה אחרת השתמשו בשיטת ה-FACS לצורכי זיהוי של ארבע מיקופלסמות שונות כגון MA, *M. putrefaciens*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* ו-*M. mycoides* subsp. *mycoides* LC בחלב של עזים (5). החיידקים בריכוזים שונים הוספו לחלב, נצבעו ב-SYBR green ונבחנו ב-FACS. סף הרגישות של שיטת ה-FACS היה  $10^4$  תאים/מ"ל. בנוסף, ניתן היה בקלות להבדיל בין מיקופלסמות לבין חיידק *Staphylococcus aureus*, הגורם הנפוץ של דלקות עטין בצאן (5).

ידוע מהספרות ששימוש בשיטת ה-FACS להימצאות החיידקים בחלב מלא, מעלה בעיות טכניות כגון רגישות נמוכה יחסית עקב נוכחות של תאים סומאטיים, חלקיקים קטנים של שומן וחלבונים קטנים. לכן, על מנת לעלות את רגישות שיטת ה-FACS בזיהוי חיידקים בחלב, השתמשנו בתמיסה "לניקוי" חלב שמומלצת לשימוש במכשיר BactoScan (ראה פרק של שיטות וחומרים). נמצא, שמספר חיידקים שמזוהים אחרי טיפול בתמיסה "לניקוי" לא השתנה ( $10^4$  תאים/מ"ל), אבל הנפח של הבדיקה היה רק 0.1 מ"ל לעומת 1 מ"ל של חלב ללא טיפול. תוצאה זאת מראה שרגישות השיטה אינה נפגעה מהטיפול האנוימיטי ובדטרנגנט.

בנוסף, בדקנו אפשרות של זיהוי מיקופלסמות בשיטת ה-FACS בחלב קפוא. חלב מלא ללא ממצאים בקטריאליים חולק לשתי מבחנות ואחת מהן עברה הקפאה ב- $20^{\circ}\text{C}$  למשך שעה, ואחרי מזה הפשרה. המבחנה השנייה נשמרה בינתיים ב- $4^{\circ}\text{C}$ . מהולים עשרוניים ( $10^3 - 10^7$  תאים/מ"ל) של חיידקי MA/MB הוכנו מהחלב הקפואה שעבר הפשרה ומהחלב שנשמר ב- $4^{\circ}\text{C}$ . החיידקים סומנו בנוגדנים פוליקלונליים ונבחנו במכשיר ה-FACS. במהלך הבדיקה נעשה שימוש בתמיסת "הניקוי". לא התקבלו הבדלים משמעותיים בין חלב טרי לבין קפוא בזיהוי חיידקי מיקופלסמה ( $10^4$  תאים/מ"ל) בשיטת ה-FACS (data not shown).

#### **בדיקת ספציפיות של נוגדנים פוליקלונליים אנטי MB/MA.**

בשלב זה בדקנו האם נוגדני MA/MB קושרים פתוגנים אחרים כגון *E. coli* והאם קיימת תגובה צולבת בין נוגדנים הללו בזיהוי של חיידקי MA/MB. מהולים עשרוניים של חיידקי MB/MA ו-*E. coli* ( $10^3 - 10^7$ ) הוכנו בתמיסת PBS ובחלב. החיידקים סומנו בנוגדנים פוליקלונליים אנטי MA/MB ונבחנו ב-FACS. תוצאות הניסוי הראו שנוגדנים פוליקלונליים אנטי MA/MB אינם מזהים *E. coli* ב-PBS.

ובחלב, אך קיימת תגובה צולבת בין הנוגדנים בזיהוי של MA ו-MB (תרשים מס' 4, א-ב ו- data not shown). בהמשך בדקנו, האם נוגדנים פולקלונליים שהוכנו כנגד מיקופלסמות אחרות, יכולים לתת תגובה כוזבת חיובית (false positive) כאשר משתמשים בהם לסימון חיידקי MA/MB ב-PBS ובחלב. התברר, שהנוגדנים כנגד MG ו-MM (מיקופלסמות של עופות), נקשרו לחיידקי MB ול-MA הנמצאים בחלב לא פחות טוב משאר נוגדנים פולקלונליים ספציפיים שהוכנו כנגד MA ו-MB (תרשים מס' 4, ב-ד). לעומת זאת, ב-PBS התגובה הייתה ספציפית. קשה להסביר מה גרם לנוגדנים פוליקלונליים, שלא הוכנו כנגד MA/MB, לזהות את אותם החיידקים בחלב. אחד ההסברים האפשריים הוא שנוגדנים הללו, שמיועדים ל-IMF, לא ספציפיים מספיק לשימוש בשיטת ה-FACS. הסבר נוסף, שטיפול בתמיסת ה"ניקוי" של חלב גורם לשינוי בהצגת האנטיגנים על פני שטח של החיידק וכתוצאה מכך להופעה של התגובה הצולבת בין הנוגדנים.

בהמשך נבדקה יכולת של הנוגדן החד שבטי MY11-320.1 לשמש לצורכי זיהוי חיידקי MB בשיטת ה-FACS. הנוגדן זהה לחיידקי MB בריכוז של  $10^4$  cfu/ml ב-PBS ובחלב (תרשים מס' 4 ו- data not shown). חודשיים אחרי רכישתו ושמירתו של הנוגדן ב- $4^{\circ}\text{C}$  (לפי המלצתו של היצרן), הנוגדן הפסיק לעבוד, לכן לא הצלחנו להעריך את ספציפיות של הנוגדן. כאן המקום לציין, ששימוש בנוגדנים חד שבטים מייקר מאד את מחיר הבדיקה, ובכך מקשה על שימוש בשיטת ה-FACS לצורכי ביעור וניטור.

### **ב) שימוש בשיטת ה-FACS לזיהוי חיידקי MA ו-MB בחלב נגוע.**

דגימות חלב מן השדה הידועות כחיוביות ל-MB ול-MA (9 בקר, 5 צאן) נבדקו במקביל בשיטת ה-FACS ובבקטריולוגיה. דגימות חלב היו שמורים ב- $20^{\circ}\text{C}$  – לתקופה בין 3 ימים עד שנה. הסימון נעשה בנוגדנים פוליקלונליים. חיידקי מיקופלסמה נתגלו ב-13/14 מהדגימות (data not shown). רק בדגימת חלב אחד מבקר לא התקבלה תגובה חיובית ב-FACS. ריכוז MB באותה דגימות חלב היה  $6 \times 10^3$  חיידקים/מ"ל. בנוסף, נבדקה אפשרות לזהות חיידקי MB בתערובת של דגימות החלב. לצורך כך, ערבבנו חלב נגוע ונקי ביחסים של 1:4 ו-1:9 (0.1 מ"ל מכל חלב). התערובות סורכזו, משקעים עברו טיפול בתמיסת "הניקוי", סומנו בנוגדן פוליקלונלי ונבחנו ב-FACS. בשני המקרים התקבלה תגובה חיובית (תרשים מס' 5).

### **סכום**

שימוש בשיטת ה-FACS לצורך זיהוי חיידקי MA ו-MB בחלב העלה שנוגדנים פוליקלונליים אנטי MA/MB במהול 1:100 מזהים כ- $10^4$  ומעלה חיידקים/מ"ל הן בתמיסת PBS והן בחלב. לא נצפו הבדלים משמעותיים בזיהוי חיידקי מיקופלסמה ( $10^4$  תאים/מ"ל) בשיטת ה-FACS בין חלב טרי לבין קפוא. בדיקת הספציפיות של נוגדנים פוליקלונליים אנטי MA/MB הראתה שהם אינם קושרים חיידקי *E. coli*, פתוגן שכיח הגורם לדלקות עטין בבקר וצאן. יחד עם זאת, נמצא שקיימת תגובה צולבת בין



הנוגדנים האנטי MA/MB בזיהוי של MA-ו-MB. בנוסף, התברר שנוגדנים פוליקלונליים שהוכנו כנגד MIKOPLESOMOT של עופות יכולים לתת תגובה כוזבת חיובית (false positive) בזיהוי חיידקי MA/MB בחלב. לאומת זאת, ב-PBS התגובה הייתה ספציפית. גם נוגדן חד שבטי MY11-320.1 זהה חיידקי MB בריכוז של  $10^4$  cfu/ml ומעלה ב-PBS ובחלב. כיוון שהנוגדן הפסיק לעבוד חודשיים אחרי רכישתו, לא הצלחנו להעריך את הספציפיות שלו. שימוש בנוגדן חד שבטי מעלה את מחיר הבדיקה, דבר שאינו מאפשר שימוש בשיטת ה-FACS לצורכי בעור וניטור.

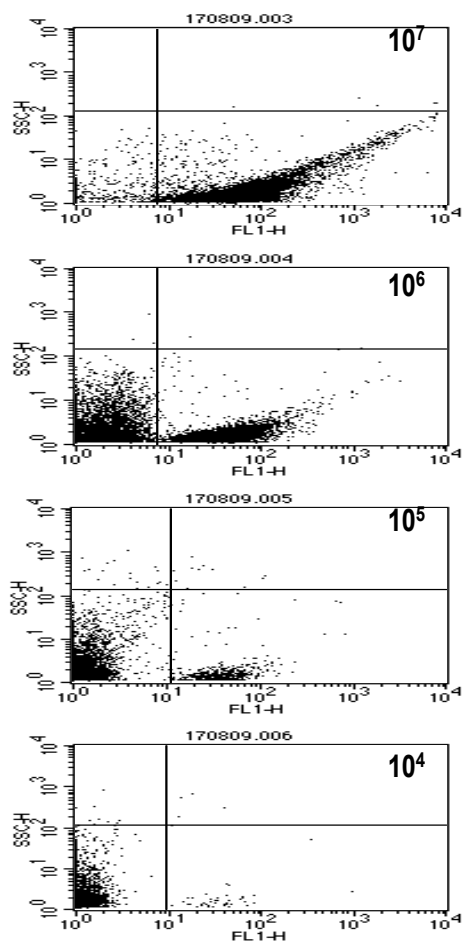
### רשימת ספרות:

1. **Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C. and M. Sánchez-Pérez .** 2000. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev. 13(2):167-95.
2. **Assuncao, P., Rosales, R.S., Antunes, N.T., De la Fe, C., and J.B. Poveda.** 2007. Applications of flow cytometry to mycoplasmaology. Frontiers in Bioscience 12: 664-672.
3. **Assuncao, P, Rosales, R.S., Rifatbegovic, M., Antunes, N.T., De la Fe, C., Ruiz de Galarreta, C.M., and J.B. Poveda.** 2006. Quantification of mycoplasmas in broth medium with SYBR green-I and flow cytometry. Frontiers in Bioscience, 11:492-497.
4. **Assuncao, P., De la Fe, C., Antunes, N.T., Ruiz de Galarreta, C.M., and J.B. Poveda.** 2006. Use of flow cytometry for enumeration of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* large-colony type in broth medium. J Appl Microbiology, 100: 878-884.
5. **Assuncao, P., Davey, H.M., Rosales, R.S., Antunes, N.T., De la Fe, C., Rzmirez, A.S., Ruiz de Galarreta, C.M. and J.B. Poveda.** 2007. Detection of mycoplasmas in goat milk by flow cytometry. Cytometry, 71A, 1034-1038.
6. **Bergonier, D., Bertelot, X., and F. Poumarat.** 1997. Contagious Agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Rev.sci.tech.Off. int.Epiz. 16(3):848-873.
7. **Caswell, J.L., and M. Archambault.** 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. Anim Health Res Rev. 8(2):161-86.
8. **Comas-Riu J., Ruis N.** 2009. Flow cytometry applications in the food industry. J. Ind. Microbiology and Biotechnology. 36(8):999-1011.
9. **De la Fe, C., Assuncao, P., Antunes, T., Rosales, R.S., and J.B. Poveda.** 2005. Microbiological survey for Mycoplasma spp. in a Contagious Agalactia endemic area. The Veterinary Journal. 170(2):257-9.
10. **Gunasekera, T.S., Attfield, P.V., and D.A. Veal.** 2000. A Flow Cytometry Method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. Applied and Environmental Microbiology. 66:1228-1232.
11. **Gunasekera, T.S., Veal, D. A., and P. V. Attfield.** 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and

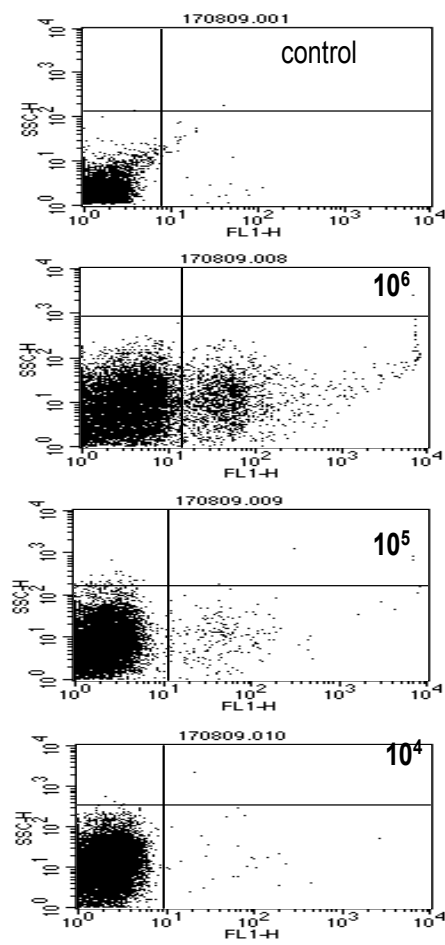
- somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology*. 85:267-279.
12. **Hannan, P. C. T., G. D. Windsor, A. de Jong, N. Schmeer, and H. Stegemann.** 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2037-2040.
  13. **Holm, C and L. Jespersen.** 2003. A flow-Cytometric Gram-Staining Technique for milk-associated Bacteria., *Applied and Environmental Microbiology*. 69 (5):2857-2863.
  14. **Holm C., Mathiasen T., and L.Jespersen.** 2004. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. *Journal of Applied Microbiology*. 97:935-941.
  15. **Fusco, M., Corona, L., Onni, T., Marras, E., Longheu, C., Idini, G., and S. Tola.** 2007. Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant antigens for rapid detection of antibodies against *Mycoplasma agalactiae* in sheep. *Clin Vaccine Immunol.* 14(4):420-5.
  16. **Kittelberger, R., O'Keefe, J.S., Meynell, R., Sewell, M., Rosati, S., Lambert, M., Dufour, P., and M. Pépin.** 2006. Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. *N Z Vet J.* 54(1):10-5.
  17. **Lorusso, A., Decaro, N., Greco, G., Corrente, M., Fasanella, A., and D. Buonavoglia.** 2007. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae* DNA. *J Appl Microbiol.* 103(4):918-23.
  18. **Miles, R. and R. Nicholas.** 1998. *Mycoplasma ptotocols*. Eds., Miles, R. and R. Nicholas. Humana press, Vol. 104.
  19. **Nicholas, R. A., and R. D. Ayling.** 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 74:105-12.
  20. **Oravcová, K., López-Enríquez, L., Rodríguez-Lázaro, D., and M. Hernández.** 2009. *Mycoplasma agalactiae p40* gene, a novel marker for diagnosis of contagious agalactia in sheep by real-time PCR: assessment of analytical performance and in-house validation using naturally contaminated milk samples. *J Clin Microbiol.* 47(2):445-50.
  21. **Rapoport, E., Flitman-Tene, R., Yogev, D., and S. Levisohn.** 1999. Outbreaks of Contagious Agalactiae in Israel: Clinical and epizootical aspects. In: *Mycoplasma of Ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics (COST 826)*. Eds: L. Stipkovits, R. Rosengarten and J. Frey. Brussels, European Commission Press. III: 120-123.
  22. **Sachse, K., Salam, H.S., Diller, R., Schubert, E., Hoffmann, B., and H. Hotzel.** 2009. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *The Veterinary Journal*. Online.

**תרשים מס' 1:** בדיקת רגישות של שיטת ה-FACS בזיהוי ריכוזים שונים של חיידקי MB המסומנים ב-FITC והנמצאים ב-PBS ובחלב.

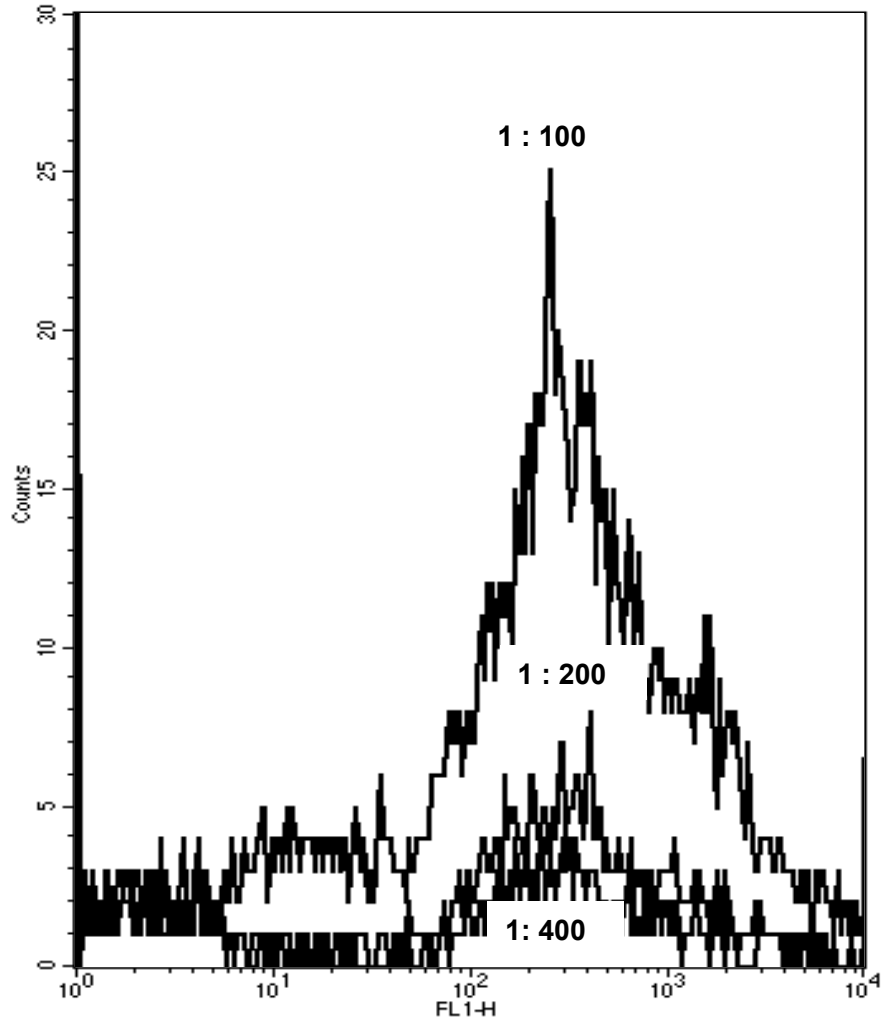
PBS



Milk

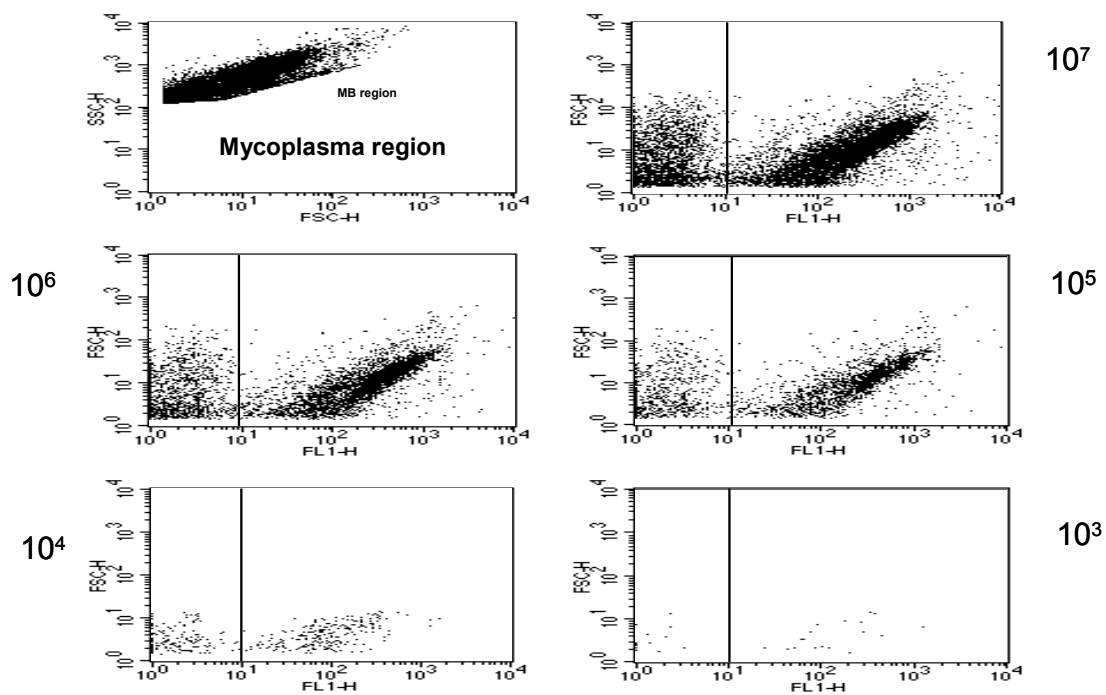


**תרשים מס' 2:** בדיקת מהול עבודה של הנוגדנים הפוליקלונליים .

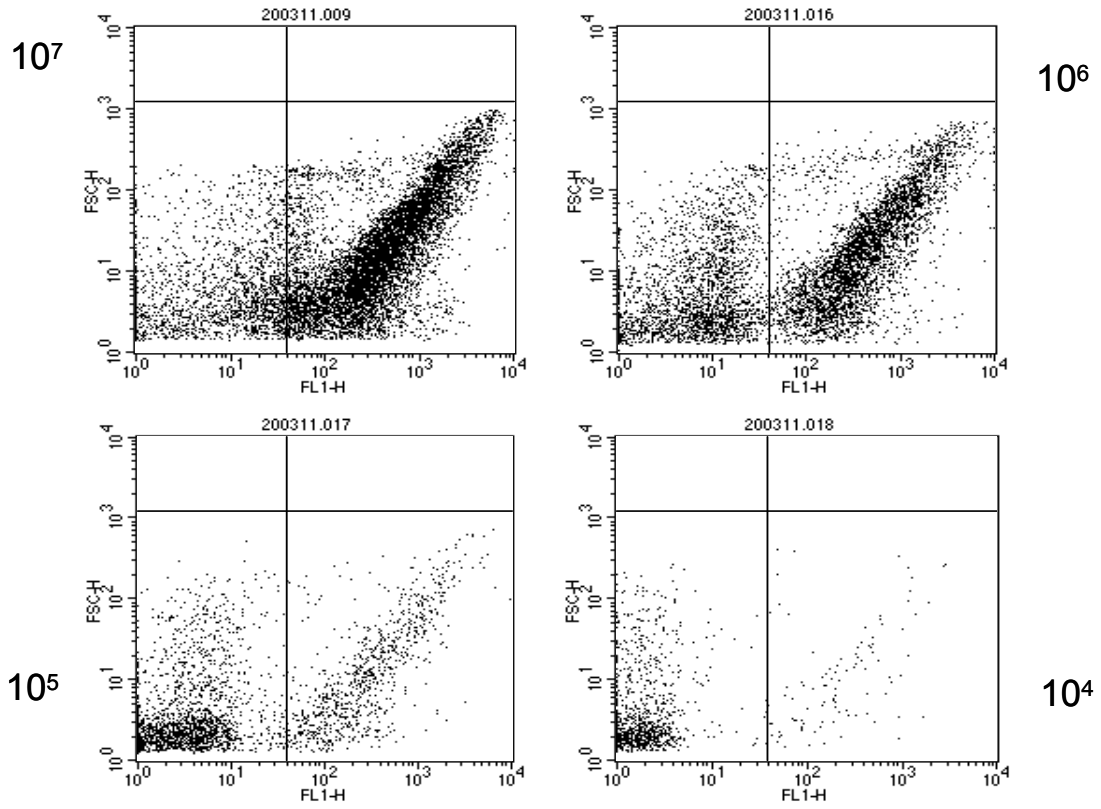


**תרשים מס' 3:** בדיקת הרגישות של שיטת ה-FACS תוך שימוש בנוגדנים פוליקלונליים.

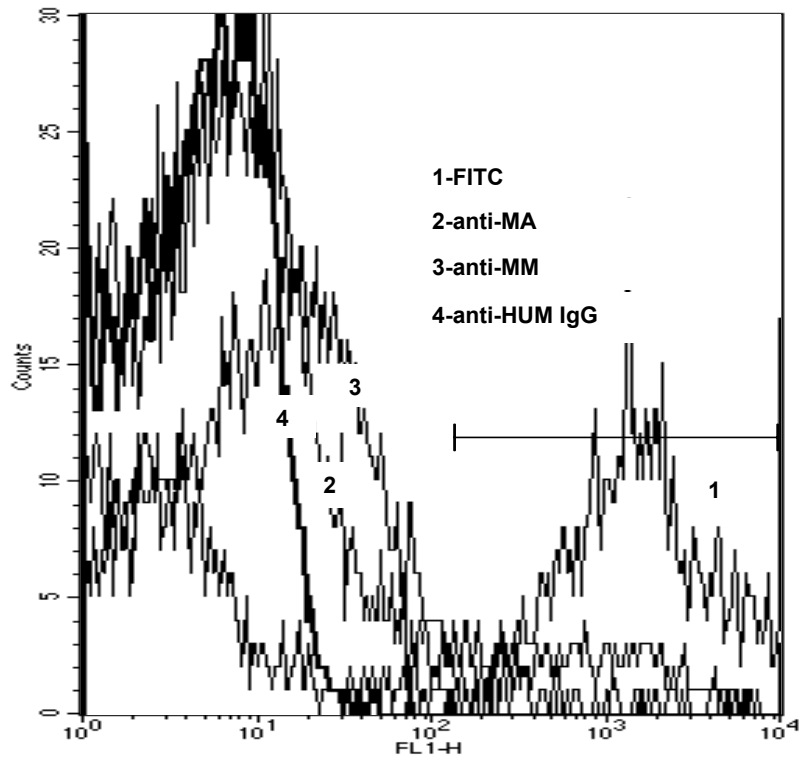
(א) זיהוי של ריכוזים שונים של חיידקי MB ב-PBS.



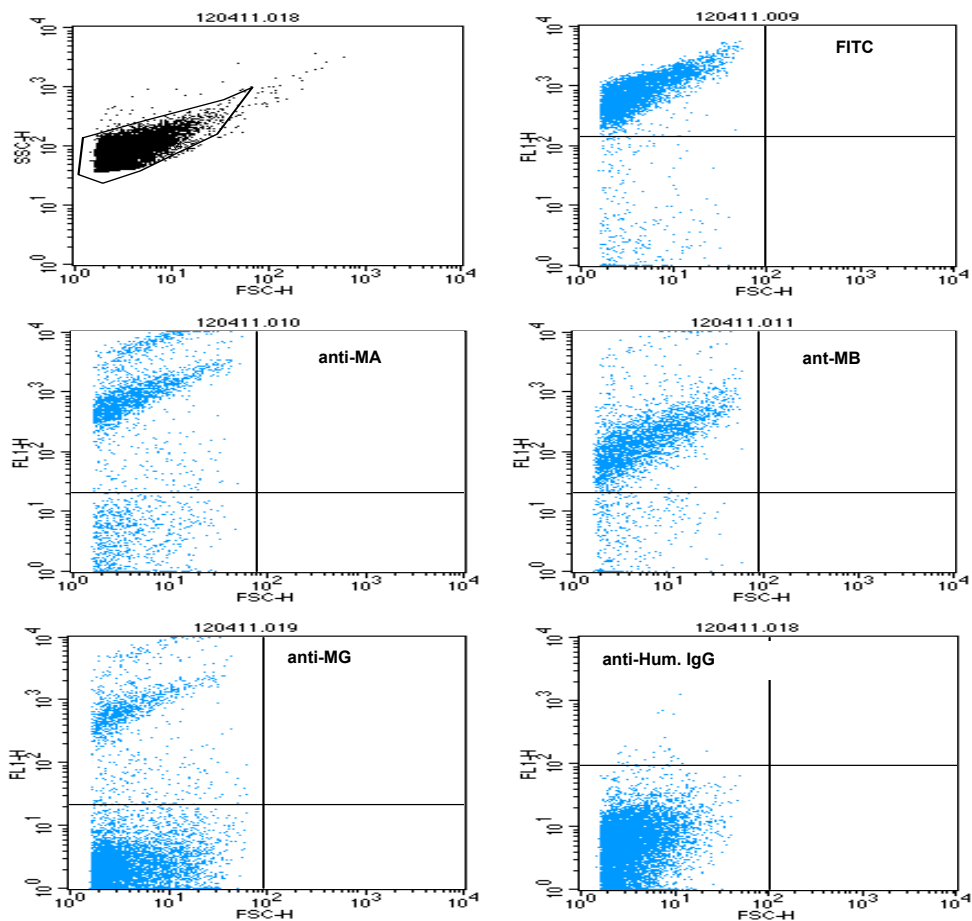
(ב) זיהוי של ריכוזים שונים של חיידקי MB בחלב.



**תרשים מס' 4:** בדיקת ספיציפיות של נוגדנים פוליקלונליים אנטי MB/MA.  
א. בדיקת ספיציפיות של נוגדנים פוליקלונליים אנטי MB/MA בזיהוי של *E. coli*.

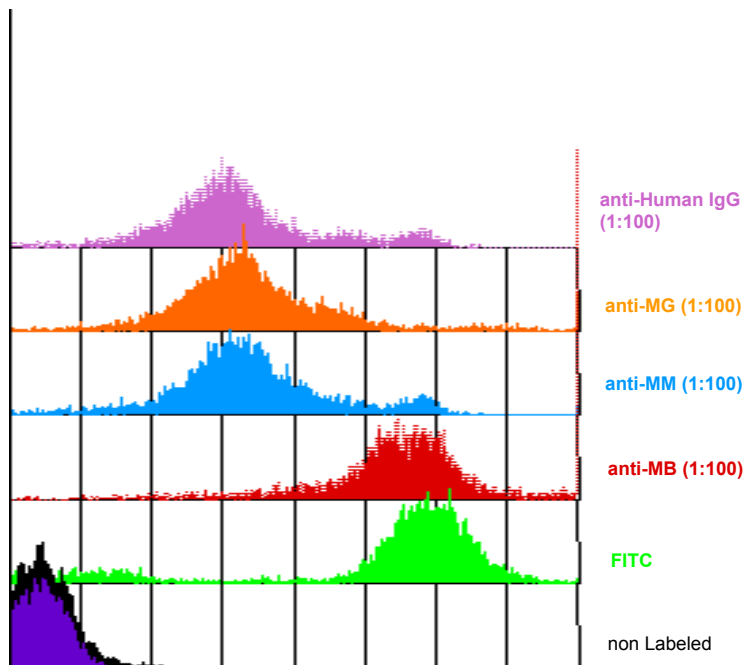


(ב) זיהוי ריכוזים שונים של MA בחלב תוך שימוש בנוגדנים פוליקלונליים שונים.

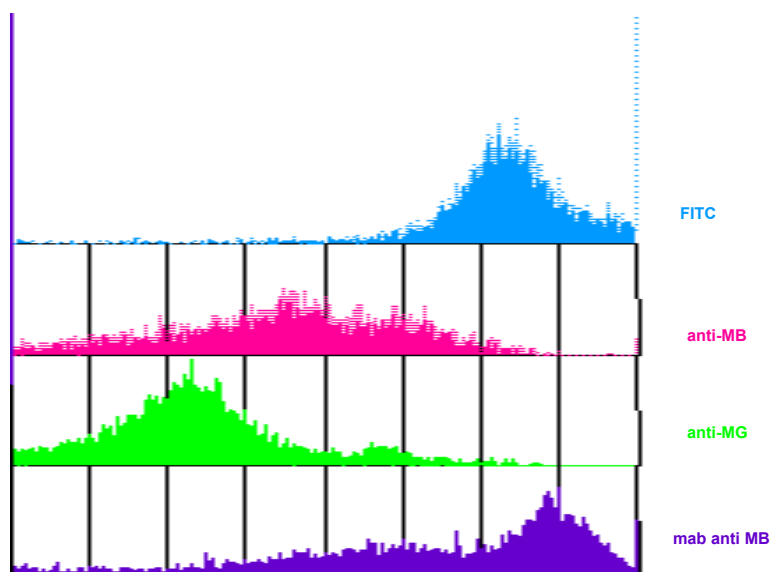




(ג) זיהוי של MB ב-PBS תוך שימוש בנוגדנים פוליקלונליים שונים.

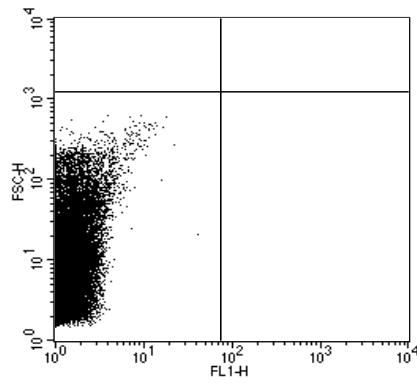


(ד) זיהוי של MB בחלב תוך שימוש בנוגדנים פוליקלונליים ומונוקלונליים שונים.

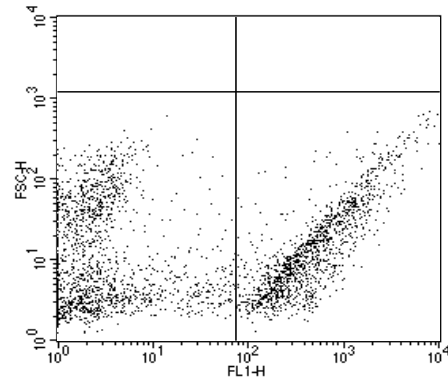


תרשים מס' 5. זיהוי של MB בחלב מדוגמות שדה.

10<sup>4</sup> חיידקים/מ"ל



**Before centrifugation**



**10x concentrated milk**