

847-0336-06 דו"ח מסכם

אבחון מהיר של *Mycoplasma bovis* תוך שילוב של in situ hybridization אימונוהיסטוכימיה ו-

¹א. ליסנינסקי, ²ד. להב ו¹ש. לויזון

¹היחידה למיקופלסמה, החטיבה למחלות עופות ו²החטיבה לפתולוגיה,
המכון הוטרינרי ע"ש קמרון, בית-דגן

מס' דף

1	דפי שער
2	תוכן עניינים
3	תקציר בעברית
4-6	מבוא ותיאור הבעיה
6	מטרות המחקר
6-10	שיטות וחומרים
10-18	תוצאות ודיון
18	סיכום
19-18	רשימת הספרות

תקציר

החיידק מיקופלסמה בוביס הינו הפתוגן העיקרי של מחלות מיקופלסמתיות בבקר ומהווה נטל כלכלי עצום לשוק הבקר העולמי. החיידק גורם למגוון רחב של מחלות כגון דלקת עטין, דלקת ריאות, דלקת פרקים ומחלות במערכת המין. שיטות האבחון למ. בוביס הקיימות כיום הן: בידוד החיידק ואפיון באימונופלווארסנציה (IMF) או בשיטות מקבילות, זיהוי ע"י PCR ובדיקת נוגדנים במבחן ELISA. מכיוון שרוב בידודי מ. בוביס בארץ הם ממקרים של דלקת ריאות חשוב להשתמש בשיטה שתאפשר זיהוי של גורם המחלה ישירות בנתחי רקמה בד בבד עם אפיון הליקויים הפתולוגיים. שיטת האבחון המתאימה לכך היא אימונהיסטוכימיה (IHC) המבוססת על הגבה של רקמה שעובדה לבלוקי פרפין עם נוגדנים חד שבטיים המזהים את החיידק. אחד מהבעיות בשיטת ה-IHC לזיהוי מ. בוביס היא תגובות הצלבה עם סוגי מיקופלסמה אחרים. כמו כן, לא ניתן לאמת תוצאות של IHC כיוון שאין שיטה בשימוש שפועלת בעיקרון דומה. השוואת התוצאות של IHC מול בידוד לא תמיד מאפשרת לקבל תמונה נכונה וכוללת של המצב. יתר על כן, ישנם מקרים שמראים סטייה בין התוצאות של שתי השיטות. לכן, מטרות המחקר הנוכחי הן: (א) לפתח ולאמת את שיטת in situ hybridization (ISH) לזיהוי מ. בוביס בנתיחי ריאה. כמו כן, (ב) להעריך את שיעור הנגיעות במ. בוביס של בקר המגיע לחדר הנתיחות עם דלקת ריאות; (ג) ולבדוק נוכחות מ. בוביס בבקר ללא סימני מחלה. בניסיון לבצע ISH עוצבו שני גלאים: ה-*ISMbov5* שמשלים לרצף ה- Insertion-like Sequence המצוי במספר רב של עותקים בגנום החיידק וה-*p48L* שנבנה על בסיס הרצף של הגן *p48-like* המצוי בעותק יחיד. בסה"כ בוצעו כ-10 ניסיונות (70 דוגמאות) להעמיד את השיטת ISH ללא הצלחה. הסימון שהתקבל היה בלתי ספציפי ואובחן במקומות הלא רלוונטיים (סביב כלי דם). נכון להיום, אין בנמצא גלאים מסחריים המזהים את מ. בוביס בשיטת ה-ISI, לכן לא יכולנו לאתר את נקודת תורפה של מערכת ה-ISI שהקמנו. אומנם לא הצלחנו בפיתוח שיטת ה-ISI, אולם במהלך המחקר הושגו מספר יעדים: (א) בוצע סקר סביל של זיהוי החיידק מ. בוביס מבקר חולה במהלך השנים 2004-2006. תוצאות הסקר מראות מחד גיסא שקיימת עליה של למעלה מ-100% במספר הדגימות שנלקחו מבקר ושבהן זוהתה מיקופלסמה, ומאידך גיסא נצפתה עליה של כ-20% במספר בידודי מ. בוביס מאותן דוגמאות; (ב) נעשה סקר נוכחות מ. בוביס בלוע בקר לבשר ללא סימני מחלה שמגיע לבית המטבחיים. ניתן לראות שאחוזי בידוד מ. בוביס מבקר ללא סימני מחלה, נמוך בהרבה מאחוזי הבידוד של אותו חיידק מבקר חולה באופן כללי ומדלקות ריאה בפרט. לא נצפה קשר מובהק בין הנוכחות של מ. בוביס לבין ההכשרה בשיטה; (ג) בוצע סקר סרולוגי של בדיקת רמת הנוגדנים כנגד מ. בוביס בבקר מיובא ובבקר ישראלי מרפתות החלב. נמצא הבדל משמעותי ברמה של $p=0.02$ בין ממוצעי השכיחות של התגובה החיסונית כנגד מ. בוביס בנסיובים ממקור ישראלי ליבוא (% 0.19 מול 0.41% בהתאמה).

מבוא ותיאור הבעיה:

מיקופלסמה בוביס (*Mycoplasma bovis*) מהווה גורם תחלואה חשוב בבקר ומחולל מחלות כגון: דלקת עטין, דלקת ריאות חריפה, במיוחד בעגלים צעירים, דלקת פרקים ומחלות במערכת המין (Nicholas & Ayling, 1992; Pftzner & Sachse, 1996; Simecka *et al.*, 2003). ההידבקות במ. בוביס נעשית בהעברה אנכית בזמן ההמלטה או באמצעות הקולסטרום, וכן בצורה אופקית מפרה לפרה במגע ישיר באמצעות הפרשות שונות. לא תמיד ישנו ביטוי קליני חד משמעי (pathognomonic) להדבקה במ. בוביס. ההדבקה יכולה להישאר סמויה ולהופיע במצבי עקה או בזמן הופעה של מחלה נגיפית / חיידקית נוספת. בנוסף לכך, ההדבקה במ. בוביס לעיתים משולבת בו זמנית עם מחוללי מחלה אחרים, מה שעלול לסבך את האבחון המעבדתי ולטשטש את התמונה הקלינית.

שיעור הנגיעות במ. בוביס גבוה במדינות מסוימות באירופה ובאזורים רבים בצפון אמריקה. כך לדוגמה, בהולנד בודד החיידק מ-20% של דלקות ריאה בבקר לפיטום, בצרפת, ב-30% ובאנגליה, נמצא כי 20-25% של בקר עם דלקות ריאה מכיל נוגדנים כנגד החיידק. בנוסף, יבוא עגלים ממרכז אירופה לצפון ודרום אירלנד ב-1994 גרם להכנסת מ. בוביס למדינות, שהיו עד אז חופשיות מחיידק הזה. מאז מ. בוביס מבודדת ב-13-23% מדלקות ריאות בבקר המקומי (Nicholas & Ayling, 2003). לאחרונה גם דווח על בידודי מ. בוביס ממקרים של דלקות עטין (8.2%) בפרות מיובאות בצפון יון (Filioussis *et al.*, 2007). מבחינה כלכלית מדובר בעול כבד על משקי הבקר. הנזק השנתי שגורם הפתוגן ברחבי העולם מוערך במאות מיליוני דולרים. כך לדוגמה, בשוק האירופי המשותף, הנזק השנתי ממחלות נשימה מוערך בכ-576 מיליון אירו, כאשר ההערכה היא כי רבע עד שליש מדלקות הריאה נגרמות על ידי מ. בוביס. בארה"ב, הנזקים עקב תחלואה נשימתית ודלקות עטין הנגרמות ע"י מ. בוביס מוערכים בכ-32 ובכ-108 מיליון דולר לשנה, בהתאמה (Rosengarten and Citti, 1999). ניתן להניח, שבישראל עקב הגדרות הכשרות שמטריפות את הטבחה בשל ההידבקויות בקרום / באונות הריאה, או בבית החזה, הנזקים הכלכליים עלולים להיות גם כן גבוהים. יחד עם זאת, קשה לעמוד על מידת הנזקים שנגרמים על ידי מ. בוביס במדויק, מכיון שלעיתים מדובר בנזקים עקיפים. בנוסף, ישנם מקרים רבים בהם המחלה אינה מאובחנת כראוי והנזקים מיוחסים למחוללי מחלה אחרים.

ידוע, שבארה"ב מ. בוביס פוגע בעיקר בשלוחת הבקר לחלב, לעומת זאת, באירופה ובישראל עיקר נזקיו הם במעורבותו במחלות נשימה כחלק מהקומפלקס הנשמתי בבקר (Bovine respiratory disease complex – BRD). בעשור האחרון מ. בוביס אובחנה בארץ במספר התפרצויות של מחלות נשימה קשות בבקר ועגלים, אבל לא ניתן לקבוע האם מדובר בחיידק שהיה קיים באופן קבוע וסמוי בארץ מאז האירוע הראשון של דלקת עטין שדווח (Bar-Moshe, 1964). השערה אחרת היא שמ. בוביס הופיע בישראל בעקבות יבוא עגלים מאירופה והתבסס לאחרונה באוכלוסיית הבקר בארץ. עד המחקר הנוכחי לא היו תוצאות מוצקות לגבי שכיחות החיידק מ. בוביס בישראל.

שיטות האבחון ל- מ. בוביס הקיימות כיום הן: זיהוי החיידק ע"י בידוד וסיווגו בטכניקות שונות תוך שימוש בנוגדנים הספציפיים (Nicholas & Ayling, 2003). בנוסף קיימים מבחנים מולקולאריים

לאבחון החיידק ברמת הדנ"א, כגון ריאקציות PCR, המזהות גנים שונים (Bashiruddin *et al.*, 2005). לגילוי הנוגדנים הנוצרים בחיה הנגועה משתמשים במבחן ELISA (Nicholas & Ayling, 2003). שאפשר סריקה מהירה של מספר דוגמאות רב (Le Grand *et al.*, 2002). לכל שיטה ישנם יתרונות וחסרונות. בידוד של מ. בוכיס הוא תהליך יקר, גוזל זמן רב ומסובך מבחינה טכנית כאשר מדובר בתרבית מעורבת. כמו כן, בדגימות שאוחסנו שלא כראוי או נלקחו מחיה מטופלת באנטיביוטיקה אחוזי ההצלחה של בידוד החיידק או זיהויו ב-PCR הם קטנים. בנוסף לכך, בידוד או תוצאה חיובית ב-PCR לא בהכרח מצביעים על מעורבותו במחלה, אלא על נוכחות מ. בוכיס בחומר הנבדק. כמו כן, תוצאות חיוביות במבחן ELISA מאפשרות את הערכת מצב הנגיעות בעדר אך זו אינה בדיקה פרטנית, ולכן אינה רלוונטית לחומר שמגיע לבדיקה לאחר המוות.

כיוון שבשנים האחרונות חלה עליה משמעותית במספר הדגימות עם דלקות ריאות שבהן מעורב החיידק מ. בוכיס היה חשוב להשתמש בשיטה שתאפשר זיהוי של גורם המחלה ישירות בנתחי ריאה. נכון להיום קיימות שתי גישות כלליות לבדיקה נתחי רקמה: אימונוהיסטוכימיה (Immunohistochemistry or IHC) ו-ISH (in situ hybridization). לשיטות הללו מספר יתרונות: ניתן לזהות את החיידק ישירות בנתחי רקמה בד בבד עם אפיון הליקויים הפתולוגיים. הרגישות של השיטות אינה מושפעת באופן משמעותי מתנאי האחסון של החומר הנבדק או מזיהום חיידקי (Haines *et al.*, 2004). היתרון הנוסף הוא בכך שניתן לחזור לחומר שנשמר באחסון ולבצע בו בדיקות. זיהוי של חיידק מ. בוכיס בשיטת ה-IHC, הן במחלות נשימה (Adegboye *et al.*, 1995, Khodakaram-Tafti & Lopez, 2004) והן במחלות אחרות (Adegboye *et al.*, 1996, Haines *et al.*, 2004, Maeda *et al.*, 2003), מבוצע במעבדות אבחון וטרינריות ברחבי העולם. צריך לציין שברוב המעבדות הללו משתמשים במערכות אבחון ביתיות (generic) תוך שימוש בנוגדנים ראשוניים שונים, כגון: monoclonal antibodies, polyclonal rabbit antiserum. האמינות של השיטה נובעת בעיקר מסגוליות ורגישות של הנוגדנים המזהים שיכולים להיות ממקורות מסחריים או תוצרת עצמאית. אחד מהבעיות בשיטת ה-IHC לזיהוי מ. בוכיס היא תגובות הצלבה עם סוגי מיקופלסמה אחרים, ביניהם *Mycoplasma agalactiae*, הנפוצה בארץ. *M. agalactiae* לא נמצאת במרבית המדינות שבהן משתמשים בשיטת IHC למ. בוכיס (צפון אמריקה, צפון אירופה, אוסטרליה), ולכן אין התייחסות לנושא בדיווחים המקצועיים בספרות. תגובות הצלבה בין *M. agalactiae* לבין מ. בוכיס הן תופעה מוכרת במרבית שיטות האבחון (Bashiruddin) (Nicholas & Ayling, 2003, et al., 2005). לרבות בנוגדנים הראשוניים הנמצאים בשימוש בחטיבה לפתולוגיה של המכון הווטרינרי (Adegboye *et al.*, 1995). נכון להיום, אין אפשרות לאמת תוצאות של IHC כיוון שאין שיטה בשימוש שפועלת בעיקרון דומה. השוואת התוצאות של IHC מול בידוד לא תמיד מאפשרת לקבל תמונה נכונה וכוללת של המצב. יתר על כן, ישנם מקרים שמראים סטייה בין התוצאות של שתי השיטות (ראה פרק תוצאות ודיון). לכן, במחקר הנוכחי הציענו לפתח שיטה ה-ISH המאפשרת גם היא לזהות את מ. בוכיס בנתחי רקמה. השיטה מבוססת על שימוש בגלאי המסומן וספציפי לחיידק. כאשר הגלאי עובר היברידיזציה עם מקטע בגנום של חיידק מתקבלת צביעה אותה ניתן לזהות במיקרוסקופ. היתרונות המרכזיים של השיטה הם בסגוליות וברגישות הגבוהים.

שימוש ב-ISH לאבחון חיידקים פתוגניים ברקמות שונות נעשה בהצלחה (Tenover, 2007)
M. hyopneumoniae, *M. hyosynoviae*, *Mycoplasma* של (Zwirgmaier, 2005) כולל זיהוי של
hyorhinis בתאי ריאה דלקתיים בחזירים (Boye, M., et al., 2001, Kwon & Chae, 1999;)
(Kwon et al., 2002).

במחקר הנוכחי נעשה ניסיון להעמיד את שיטת ה-ISH. לצורך כך השתמשנו בגלאיים המבוססים על רצף של Insertion sequences (IS) שהם אלמנטים גנטיים אוטונומיים המסוגלים להשתכפל ו\או לנוע בתוך הגנום המכיל אותו, ללא תלות בבקרה מצד הגנום (Mahillon & Chandler, 1998). במחקר מקדים אבחנו במספר רב של אלמנטים IS בגנום של *M. m.* בוביס (Lysnyansky et al., 2007). לצורך המחקר בחרנו ב- *ISMbov5* השייך למשפחת ה-*IS4* כגלאי על סמך מספר היתרונות: (א) נמצא בכל הזנים של *M. m.* בוביס שנבדקו; (ב) ייחודי לחיידק; (ג) זוהה במספר עותקים רב בגנום של *M. m.* בוביס, נתון שמאפשר הגברת האיתות ב-ISH. במהלך המחקר השתמשנו בגלאי ייחודי נוסף המכונה *p48L* שעוצב על בסיס הרצף של הגן *p48-like* שהתגלה לאחרונה בחיידק *M. m.* בוביס (Robino et al., 2005).

מטרות המחקר:

1. לפתח את שיטת *in situ hybridization* לזיהוי *M. m.* בוביס בנתיחי ריאה ולאמת אותה מול שיטת IHC.
2. לבחון מה היא מידת המעורבות של החיידק *M. m.* בוביס בדלקות ריאה של בקר ישראלי שמגיע למכון הווטרינרי.
3. לבדוק נוכחות *M. m.* בוביס בבקר ללא סימני מחלה שמגיע לשחיטה כשרה לבית המטבחים במטרה:
 - להעריך את תופעת הנשאות של החיידק;
 - לבחון האם קיים קשר בין הערכת הכשרות לבין בידוד *M. m.* בוביס.

שיטות:

סימון של הגלאיים בראקצית PCR: התחלים 4A-F/R וה-140F/R המזהים רצפי דנ"א ייחודיים לגן ה-*ISMbov5* וה-*p48L*, בהתאמה שימשו להגברת הגלאיים. ריאקציות PCR נערכו בנפח סופי של 50 μ l והכילו כדלקמן: תבנית דנ"א (2.6 U, 10 ng (template), DNA expand high fidelity) Polymerase (Polymerase) בכופר ל-PCR x10 (5 μ l) המכיל 15 mM MgCl₂. בנוסף, התערובת הכילה 2.5 μ l של PCR DIG probe synthesis mix ו-2.5 μ l מתערובת של dNTPs (10mM), ו-30 picomole מכל תחיל. הגברות ב-PCR נעשו במכשיר מדגם MJResearch PT100. תוכנית להגברה של הגלאי *p48L* היא: מחזור אחד של 3 דקות ב-95 °C, ואחריו 30 מחזורים של 30 שניות ב-95 °C, 30 שניות ב-95 °C ו-54 שניות ב-72 °C. בתום, 10 דקות ב-72 °C ושמירה של דוגמאות ב-12 °C. תוכנית להגברה של הגלאי *ISMbov5* מפורטת כדלקמן: מחזור אחד של 3 דקות ב-95 °C, ואחריו 30 מחזורים של 30 שניות ב-95 °C, 30 שניות ב-52 °C ו-60 שניות ב-72 °C. תוצרי ה-PCR עברו ניקוי בעזרת High Pure

PCR Purification Kit של חברת QIAGEN. ריכוז הדנ"א נקבע בספקטרופוטומטר. רשימת התחלים בהם נעשה שימוש בעבודה זו מופיעה בטבלה מספר 1.

טבלה מס' 1: תחלים להגברה של הגלאיים ISMbov5 ו-p48L.

Probe	Size of PCR product (bp)	Sequence and positions of the PCR primers in the ISMbov5 and p48 genes
ISMbov5	372	4A-F (670-687) 5' CCTAGCACTGGCGAAATA 3' 4A-R (1024-1042) 5' CCTCTAATGAAAGGTCAAC 3'
p48L	310	140-F (841-858) 5' GAACCCGTTGCAGTTGCT 3' 140-R (1132-1151) 5' CCAAATACTTTAGCCTCACC 3'

בדיקת כמות של הגלאי המסומן בשיטת ה-spots. ריכוזים יורדים (מ-5 ng עד 1pg) של שני הגלאיים ISMbov5 ו-p48L ודנ"א של הביקורת (סופק בערכה) טופטפו על ממברנת הניילון, יובשו וקובעו ב-UV crosslinker. הממברנה הוגבה עם נוגדן חד שבטי שהוכן כנגד DIG. תהליך הפיתוח נעשה עם אנזים alkaline phosphatase לפי ההארות של היצרן (Roche).

In situ hybridization: חומר ל-ISH מתקבל מחטיבה לפתולוגיה, המכון הוותרנירי. החומר עובר תהליך העיבוד כפי שפורט למטה בפרק של האימונוהיסטוכימיה. ISH בוצעה לפי Kwon *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 1999;2002) עם שינויים. - הסרת הפראפין והשטיפות מבוצעים בתוך המתקן הפלסטי כדלקמן:

- Histo-Clear דקות ב- 5X3
- 100% Ethanol דקות ב- 5X3
- 95% Ethanol דקות ב- 5X2
- 80% Ethanol דקות ב- 5X1
- 70% Ethanol דקות ב- 5X1
- 60% Ethanol דקות ב- 5X1
- שוטפים במים וב-PBS למשך 5 דקות כל שטיפה.
- מגדירים בתמיסת ה-0.2N HCl למשך 20 דקות ושוטפים ב-PBS למשך 5 דקות כל פעם.
- מגדירים בתמיסה של Proteinase K (Roche). העיכול נעצר על ידי שטיפה ב-PBS המכיל 2mg/ml glycine למשך 5 דקות. שטיפה נוספת נעשה ב-PBS בלבד.
- בשלב הבא מבצעים post fixation ב-4% של paraformaldehyde בטמפרטורת החדר במהלך 10 דקות ואז שוטפים פעמים ב-PBS במשך 5 דקות כל שטיפה.
- מעבירים את החומר לתמיסה של 0.1M triethanol buffer (pH 8) ו-0.25% acetic anhydride ל 5 דקות. בתום זמן ההדגרה מעלים את ריכוז של ה-acetic anhydride עד 0.5%.

- שוטפים פעמים ב-2xSSC במשך 5 דקות. הפרהיברידיזציה מתבצעת ב-37°C בבופר המכיל:
x2 SSC, 0.2 mg/μl Salmon sperm, 5% Dextran sulfate, x1 Denhart's solution
50% Formamide (כשעתיים).

- שלב ההיברידיזציה בוצעה עם הגלאי המסומן בריכוז של 1 ng/μl ב-42°C
למשך 18 שעות.

בתום תהליך ההיברידיזציה ה-slides נשטפו פעמים ב-2xSSC למשך 5 דקות ופעם אחד
ב-0.1xSSC ואז ב-42°C למשך 10 דקות. זיהוי של תוצר ההיברידיזציה בוצעה לפי הוראות של
היצרן (Roche). הצביעה הנגדית נעשה עם החומר המכונה nucleic acid. בהמשך המחקר
השתמשנו בקיט Link-Label ISH Core מיועד לזיהוי חיידקים בשיטת ISH (BioGenex) לפי
המלצת היצרן.

קיבוע של תאי מ. בוביס לצורכי ה-ISH: תרבית (5 מל') של מ. בוביס הנמצאת בפאזה לוגריתמית של
צמיחה סורכזה ב-5000 x g במשך דקה, נוזל עליון נזרק ופלט הורחף ב 50 μl של PBS. הקיבוע של
תאי המיקופלסמה נעשה ב-4% PFA שהוסף ל-PBS ביחס של (PBS) 1: (PFA) 3. כ-100 μl של
הנוזל טופף על זכוכית נושא ויובש בטמפרטורת החדר במשך כשעתיים. תהליך ההיברידיזציה ופיתוח
בוצעה כפי שמפורט מעל רק ללא טיפול באנזים Proteinase K.

האימונוהיסטוכימיה: בחטיבה לפתולוגיה של המכון הווטרנרי מזה כמה שנים משתמשים בשיטת ה-
IHC למטרת זיהוי ה- מ. בוביס תוך כדי שימוש בנוגדנים חד שבטיים מסחריים (Chemicon
(Temecula CA). תכנותם של שני הנוגדנים תוארו ע"י Adegboye et al., Adegboye et al. (1995).
נוגדן MYB163 ו-MYB87 אינם מזהים אנטיגנים של רקמת הבקר. הנוגדן MYB163 (1995).
אינו מראה הצלבה עם *M. agalactiae* או עם סוגי מיקופלסמה אחרים של בקר (בסה"כ נבדקו 8
סוגים). לעומת זאת הנוגדן MYB87 מזהה את החיידק *M. agalactiae* ולפחות עוד 3 סוגי מיקופלסמה
של בקר, ביניהם *M. bovirhinis*, סוג ששכיח מאד בראיה של עגלים הסובלים מדלקת ראיות. חשוב
לציין שלפי Adegboye et al. (1995) תגובת ההצלבה של הנוגדן MYB87
נצפתה רק בשיטת ה-Western blot ולא בשיטת ה-IHC. עם זה, בחטיבה לפתולוגיה בוצעה IHC על
נתחי ריאה דלקתיים של צאן והתקבלה תגובה חיובית, לכן הסוגיה של ההצלבה צריכה להיבדק שנית.

השיטה האימונוהיסטוכימית:

הרקמה מקובעת בפורמלין 10% למשך יומיים. לאחר מכן הרקמה מעובדת בהיסטוקינת ומועברת להכנת
בלוקי פרפין לצורך חיתוך פרוסות. פרוסת הרקמה עוברת דה-פאראפיניזציה, הידרציה והזגרה עם נוגדן
מונוקלונלי כנגד מ. בוביס Chemicon mouse anti-mycoplasma bovis. בשלב הבא מגיבים את
הרקמה עם נוגדן שניוני הנושא אנזים HRP, המפריש חמצן מולקולרי המפרק את הסובסטרט הנותן צבע

ייחודי במקום הקישור של הפריון עם הנוגדן. הרקע של הרקמה נצבע בהמטוקסילין, כמו בצביעה היסטולוגית. מהלך הבדיקה האימונוהיסטוכימית מתואר להלן
- סידור ה-Slides בתוך מתקן פלסטי מתאים וחימום ה-Slide באינקובטור ב-60°C למשך 30 דקות.

- יש להביא את ה-Slide לטמפ' החדר.

- הסרת הפראפין והשטיפות להלן, מבוצעים בתוך המתקן הפלסטי.

• Histo-Clear 5X3 דקות ב-

• 100% Ethanol 5X3 דקות ב-

• 95% Ethanol 5X2 דקות ב-

• 80% Ethanol 5X1 דקות ב-

• 70% Ethanol 5X1 דקות ב-

• 60% Ethanol 5X1 דקות ב-

- שוטפים במים מזוקקים למשך 5 דקות .

- הדגרה עם 0.1% trypsin ב-37°C למשך 10 דקות. בתום התהליך שוטפים במים מזוקקים למשך 5 דקות ומכניסים את ה-slides לתמיסת ה-EDTA (pH 8.0), מביאים להרתחה במיקרוגל (15 דקות ב 50% של הכוח).

- מקררים את התמיסה עד טמפרטורת החדר ושוטפים פעם נוספת במים מזוקקים. בהמשך מדגירים

את ה-slides עם הרקמה ב 3% של H₂O₂ במשך 10 דקות ושוטפים פעמים ב-PBS. מכאן ואילך

כל השלבים מתבצעים במכונה Bio Genex.

- מוסיפים את הנוגדן החד- שבטי (Mab 8972 Chemicon) במיחול 1:1000 לשעה. משך התהליך של

ה-IHC נעשה לפי הוראות של יצרן (Chemicon).

מקור הדוגמאות:

א. סקר סביל נעשה על דוגמאות שהגיעו למעבדה הרפרנטית מהחטיבה לבקטריוLOGIA. יש לציין

שכבר כמה שנים כל מקרה שאובחן בחדר הנתיחות כדלקת ריאה נשלח לבידוד מיקופלסמה.

במידה שאובחנה *Mycoplasma spp.* הדוגמאות מגיעות למעבדה הרפרנטית לזיהוי סוג המיקופלסמה.

ב. זיהוי של מ. בוביס בשיטת האימונוהיסטוכימיה וה- in situ hybridization בוצעה על נתחי

ריאה דלקתיים שהוכנו בחטיבה לפתולוגיה.

ג. סקר נוכחות מ. בוביס בבקר לבשר שמגיע לשחיטה כשרה לבית המטבחים בוצע על דוגמאות

שנלקחו מלוע של בקר ללא סימני מחלה.

ד. נסיובים מבקר יבוא ומרפתות חלב ישראליות התקבלו בחטיבה לבקטריוLOGIA מתחנות הסגר

וממשקים.

הגדרת המין מיקופלסמה נקבעת על ידי הגבת מושבות עם נוגדנים ספציפיים בשיטת אימונופלורסנציה (IMF).

בדיקת נוגדנים בשיטת ELISA בוצעה תוך שימוש בקיט BIO K162 (Bio-X-Diagnostics, Belgium) על פי הוראות היצרן.

תוצאות ודיון:

1. ניתוח ממצאי הזיהוי של מיקופלסמות פתוגניות בבקר במהלך שנת 2006.

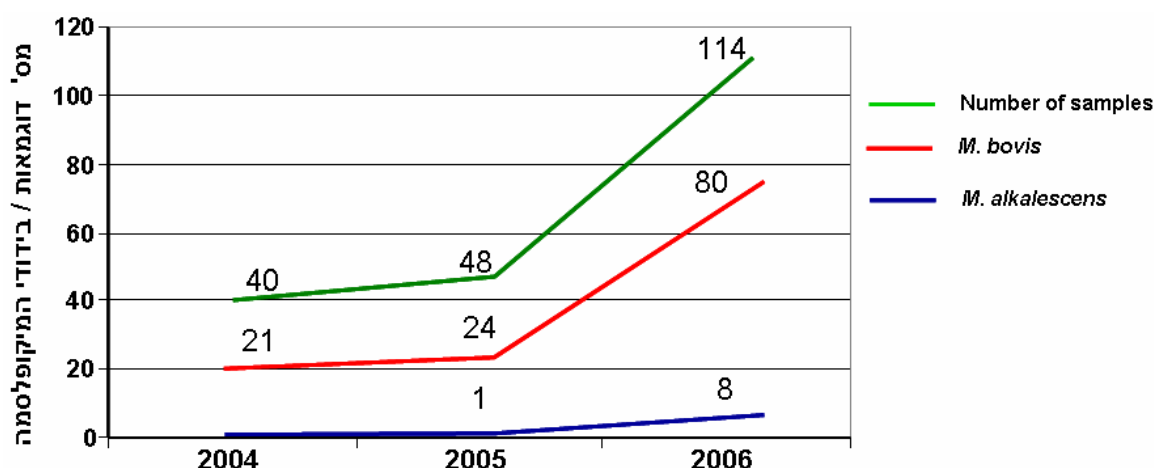
על מנת לקבל הערכה ראשונית של שיעור נגיעות הבקר הישראלי במ. בוביס, בוצע סקר סביל של זיהוי החיידק מבקר חולה (ראה טבלה מסי 2). בשנת 2006 בדומה ל-2005 רוב הדוגמאות שהגיעו לזיהוי מיקופלסמה מקורן במערכת הנשימה. לא התקבלו דוגמאות שמקורן מדלקות עטין ואילו חמש דגימות חיוביות היו מדלקות פרקים, כולן מאירוע אחד שהתרחש בהסגר איילות, בבקר שהגיע מאוסטרליה וחלה במחלת ה-shipping fever.

טבלה מסי 2: סיכום תוצאות הזיהוי של בידודי מיקופלסמה פתוגנית מבקר במהלך 2006.

מקור הבידוד (מספר בידודים)		סה"כ תרביות
פרקים	מערכת נשימה עליונה/ראייה	
<i>M. bovis</i> (5)	<i>M. bovis</i> (75) <i>M. alkalescens</i> (8) <i>M. bovisgenitalium</i> (1)	114

ניתוח התוצאות שהתקבלו במעבדה הרפרנטית במהלך 2006 מראה שישנה עליה משמעותית במספר הדגימות שהגיעו לזיהוי מיקופלסמות בבקר. כך, בשנת 2005 התקבלו בסך הכול כ-48 דגימות מבקר, מתוכן ב-24 נמצא חיידק מ. בוביס. לעומת זאת, בשנת 2006 התקבלו כ-114 דגימות, ומ. בוביס זוהה ב-80 מהם (ראה תרשים מסי 1).

תרשים מסי 1: סיכום תוצאות הזיהוי של בידודי מיקופלסמות פתוגניות מבקר במהלך 2004-2006.

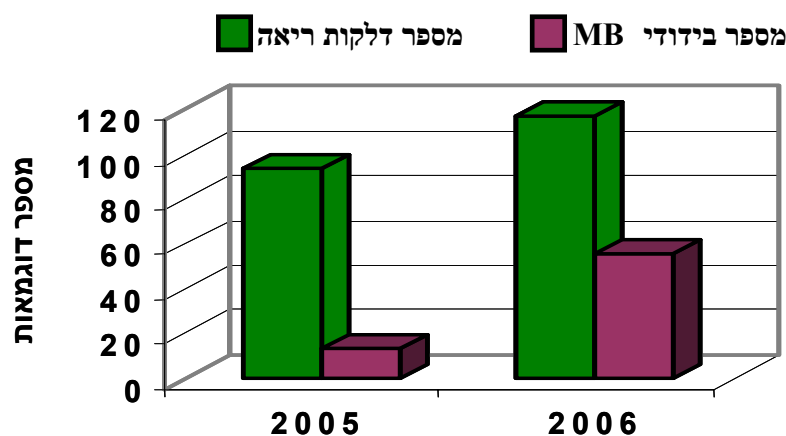


תוצאות הסקר מראות מחד גיסא שקיימת עליה של למעלה מ-100% במספר הדגימות שנלקחו מבקר ושבהן זוהתה מיקופלסמה, ומאידך גיסא נצפתה עליה של כ-20% במספר בידודי מ. בוכיס מאותן דוגמאות (21/40 ב-2004, 48/24 ב-2005 ל-80/114 ב-2006) (ראה תרשים מס' 1). בנוסף, נצפתה עליה במספר הבידודים של *M. alkalescens* (2 בידודים ב-2005 ו-8 ב-2006). מיקופלסמה זו גורמת לדלקת פרקים, לדלקת עטין ולדלקת ריאות (ראה תרשים מס' 1). שבעה מתוך שמונה מקרים בהם היה מעורב חיידק זה מקורם בדלקות ריאה. גם בדיווחים מאירופה, לדוגמא באנגליה, אחוז הבידודים של *M. alkalescens* עלה מ-2% ב-2001 ל-8% ב-2002 (Ayling et al., 2004) ובהולנד החיידק בודד לראשונה ב-2007 (Kokotovic et al., 2007). גם מספר בידודי מ. בוכיס מעגלי יבוא שמתו בהסגר, בשל דלקת ריאה, נמצא במגמת עלייה (7 מקרים ב-2005 לעומת 21 ב-2006). העלייה החדה במספר בידודי המ. בוכיס ב-2006 אינה נובעת בהכרח משיפור במערך האבחון, אלא כנראה מעליה בשיעור הנגיעות של בקר ישראלי במ. בוכיס.

2. ניתוח ממצאים בקטריאליים, וירליים ומיקופלסמתיים בדוגמאות שאובחנו כדלקות ריאה בחדר נתיחות במהלך 2005-2006.

העובדה שחלה עלייה חדה במספר בידודי המ. בוכיס מחומר קליני שמגיע למכון הווטרנרי מעלה את השאלה מה היא מידת המעורבות של החיידק בדלקות ריאה של בקר ישראלי. על מנת לנסות ולענות על השאלה נעשה ניתוח תוצאות של הבדיקות שהתקבלו מזיהוי של מיקופלסמה מדלקות ריאה. סה"כ 118 דוגמאות הוגדרו כדלקות ריאה בחדר הנתיחות בשנת 2006, לעומת 94 ב-2005. מתוכן 81 הגיעו מחטיבה לבקטריאולוגיה למעבדה הרפנטית לזיהוי של מיקופלסמה, כאשר ב-56 מהמקרים זוהה מ. בוכיס. ב-2005, בודד מ. בוכיס ב-13 מתוך 94 מקרים של דלקות ריאה (14%) כאשר ב-2006 החיידק זוהה ב-56 מתוך 118 דוגמאות (47%) (ראה תרשים מס' 2).

תרשים מס' 2: זיהוי של מ. בוכיס בדוגמאות שאובחנו כדלקות ריאה בחדר נתיחות במהלך 2006.



גורמים פתוגנים בקטריאליים ווירליים אחרים שהתגלו ב-81 הדוגמאות שאובחנו כדלקות ריאה ובהן גדלו *Mycoplasma spp.* מוצגים בטבלה מס' 3.

טבלה מס' 3: ממצאים בקטריאליים / וירליים בדלקות ריאה של בקר ישראלי שהגיעו לזיהוי המיקופלסמה במהלך 2006.

מספר בידודים	תוצאות הבידוד מ-81 דגימות של דלקות ריאה
19	פסטורלה מולטוצידה
14	ארקנובקטר פיוגנס
8	מנהימיה המוליטיקה
7	היסטופילוס סומני
6	א. קולי
3	פסטורלה המוליטיקה A
2	סטרפ המוליטי
21/ 1/16	נגיפים / נגיפים בלבד / לא נבדק
81	<i>Mycoplasma spp.</i>
20 /56	מ. בוביס / מ. בוביס בלבד
2	מ. בוביס יחד עם מ. אלקלסנס
5/3	תרבית מעורבת (חיידקים לא מזוהים) / שלילי

בשש עשרה דוגמאות בודדו הנגיפים הבאים: (1) PI-3, (4) IPVI IBR-, (6) BVD, (7) BRSV. בטבלה מס' 3 ניתן לראות ש-מ. בוביס זוהה ב-56 מהמקרים וב-20 מתוך 56 דוגמאות (35.7%) זה היה הממצא היחיד. יש לציין שמספר בידודי החיידק מ. בוביס בדלקות ריאה בבקר היה גדול יחסית למספר בידודי החיידקים הפתוגניים האחרים. מעניין לציין, שאף על פי שחיידק מ. בוביס מוגדר כפתוגן ראשוני, ברוב המקרים הוא פועל בשילוב עם חיידקים/נגיפים פתוגניים אחרים כחלק מהקומפלקס הנשמתי בבני בקר ובפרות (Bovine Respiratory Complex). לדוגמא, בשני שליש מהמקרים (36 מתוך 56) מ. בוביס בודד יחד עם חיידק או נגיף אחר, כלומר נוצר קומפלקס של פתוגנים המעורבים במחלה (multifactorial etiology of pneumonia). ידוע, שהדבקה במיקופלסמה קשורה ומסייעת לתהליכים מחלתיים רבים. חיידקי המיקופלסמה יכולים לדכא את המערכת החיסון של המאכסן, דבר המותיר אתו

חשוף יותר לפגיעות ממקורות חיצוניים ופנימיים כאחד. יש להניח שעל רקע של הדבקה ב- מ. בוביס, מחוללי מחלה אחרים יכולים לגרום למחלה קשה יותר, מתמידה ולעתים כרונית. גם תגובת המאכסן עלולה להיות חריפה יותר (hyper host immune response) ולהתבטא בהחמרת המחלה. יחד עם זאת, במספר לא קטן של דלקות ריאות (20 מתוך 56) בודד רק מ. בוביס, עובדה התומכת ביכולתו לגרום למחלה באופן עצמאי.

3. תוצאות הזיהוי של מ. בוביס בשיטת האימונוהיסטוכימיה בדלקות ריאה שאובחנו במהלך 2006 במכון הווטרינרי. בדיקת נוכחות החיידק מ. בוביס בשיטת האימונוהיסטוכימיה בוצעה עם 45 מתוך 118 משטחים ממקרים של דלקות ריאה שאובחנו במהלך שנת 2006 (טבלה מס' 4).

טבלה מס' 4: תוצאות הזיהוי של החיידק מ. בוביס בשיטת האימונוהיסטוכימיה (IHC) בדלקות ריאה במהלך שנת 2006.

אין בידוד של MB	בידוד של MB	
5	21	IHC חיובית ל-MB
2	12	IHC שלילית ל-MB

כשליש מהדוגמאות (45/118) שהובחנו ב-2006 כדלקות ריאה נבדקו ב-IHC לנוכחות מ. בוביס. מתוך 26 נתנו תגובה חיובית. ראוי לציין, שב-12 מקרים מהם בודד מ. בוביס, התקבלה תגובה שלילית בשיטת IHC (ראה טבלה מס' 4). המצב המתואר לעיל הוא מצב המצביע כביכול על כשל שיטת ה-IHC לזיהוי את החיידק במקרים מסוימים, דבר הדורש בדיקה חוזרת. לא ברור האם ניתן להשוות את תוצאות שתי השיטות הללו, בעיקר באותם מקרים בהם היה בידוד חיידק ותוצאה שלילית בשיטת IHC. ידוע, שקיימת ספציפיות שונה של נוגדנים המזהים את החיידק מ. בוביס והנמצאים בשימוש לצורכי IHC. על מנת לברר סוגיה זו יש צורך לבצע בדיקה חוזרת על הדוגמאות שהוגדרו כחיוביות ב-IHC ללא בידוד של מ. בוביס ועל דוגמאות שהוגדרו כשליליות ב-IHC עם בידוד החיידק. בנוסף, כדי לבדוק את ההתאמה בין שתי השיטות. יש להרחיב ולבצע IHC על דוגמאות נוספות שמהן בודד החיידק מ. בוביס, ושטרם נערכה עליהן בדיקה אימונוהיסטוכימית. בשלושה מקרים שתקבלה תוצאה חיובית למ. בוביס ב-IHC ובודדה מיקופלסמה אחרת. ההסבר אפשרי לכך הוא כי צמיחה של חיידקים אחרים הסתירה ואף דיכאה את הצמיחה של מ. בוביס וכתוצאה מכך התקבלה תוצאה שלילית בבידוד.

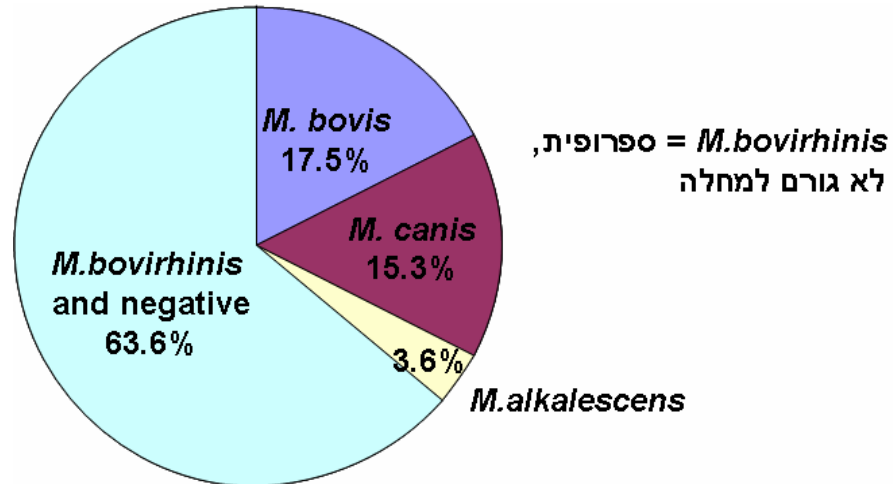
4. סקר נוכחות מ. בוביס בבקר לבשר שמגיע לשחיטה כשרה לבית המטבחיים.

מהנתונים שהוצגו לעיל ניתן ללמוד שחיידק מ. בוביס מעורב באופן משמעותי בדלקות ריאה של בקר ישראלי. השאלה הנוספת שנשאלה במהלך המחקר היא מה מידת הנוכחות של החיידק הזה בלוע של בקר ללא סימני מחלה והאם קיים קשר בין הערכת הכשרות (חלק, כשר או טרף) לבין בידוד מ. בוביס. לצורך כך, התרכזנו בדיגום של בקר שהגיע לשחיטה לבית המטבחיים "מרבק". בסה"כ נאספו כ-132 דגימות

80) מבקר לבשר ו-52 מבקר לחלב) ממערכת הנשימה העליונה של בקר ישראלי ובקר מיובא (75 ו-58 דוגמאות, בהתאמה). בידודי מיקופלסמה פתוגנית שזוהו במהלך הניסוי מוצגים בתרשים מס' 3.

תרשים מס' 3: אחוזי הבידוד של מיקופלסמות פתוגניות ממערכת הנשימה העליונה של בקר ללא

סימני מחלה שמגיע לשחיטה כשירה.



מתוך 132 דוגמאות, 46 הוגדרו כ"חלק" (37.7%), 52 כ"כשר" (42.6%) ו-24 כ"טרף" (19.6%). עשר דוגמאות חסרות שיפוט. ניתן לראות שאחוזי בידוד מ. בוכיס מבקר בריא שמגיע לשחיטה, נמוך בהרבה מאחוזי הבידוד של אותו חיידק מבקר חולה באופן כללי (17.5% לעומת 64%) ומדלקות ריאה בפרט (69%). יחד עם זאת, לתופעת הנשאות יש תפקיד חשוב בפיזור החיידק המדביק בעדר והיא מהווה אתגר מיוחד באפידמיולוגיה של המחלה ובאבחון. לא נצפה קשר מובהק בין הנוכחות של מ. בוכיס לבין הכשרה בשחיטה (חלק, כשר או טרף).

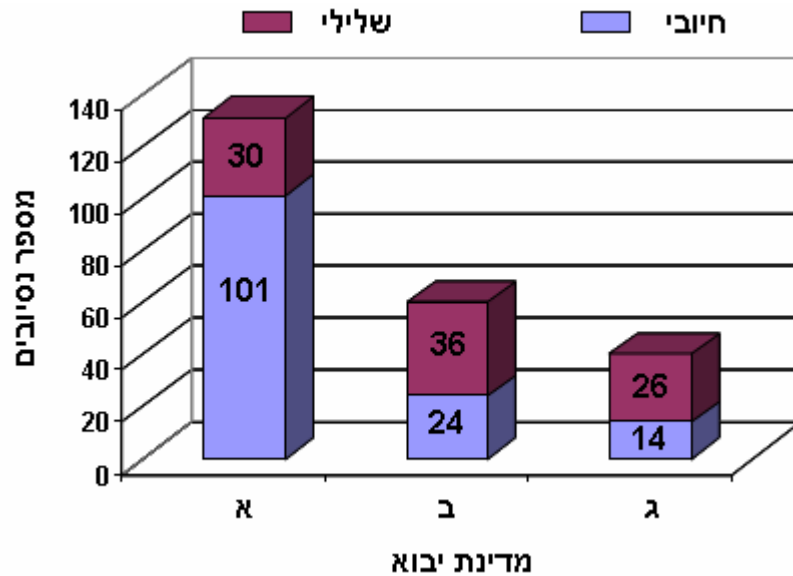
בניסוי שנעשה בבית המטבחיים בודד לראשונה בישראל חיידק *Mycoplasma canis* (21 מתוך 122). באנגליה, החיידק מבודד ב-18% מבקר חולה בדלקות ריאה (Ayling et. al., 2004). רוב הבידודים של *M. canis* שנאספו במהלך הניסוי ב"מרבק" היו מבקר מיובא (15 מתוך 21, רובם יבוא מהונגריה), כאשר 19 מתוך 21 בידודים של החיידק נתגלו בבקר לחלב. יש לציין שנצפה קשר סטטיסטי מובהק בין הטרפת בע"ח לבין בידוד של ה-*M. canis* ($p=0.02$). אין בידינו מידע על רמת הנוכחות של החיידק בבקר חולה, בשל חוסר ניסיון באבחון של החיידק עד עתה.

5. בדיקת רמת הנוגדנים כנגד חיידק מ. בוכיס בבקר מיובא ובבקר מרפתות חלב ישראליות.

ישראל מייבאת כ-80 אלף ראש בקר בשנה. בעבר נמצא שקיים קשר בין הכנסת עגלי יבוא לארץ לבין התפרצות מחלת הנשימה שבה מעורב מ. בוכיס. השנה, עקב העליה החדה במספר בידודי החיידק, הועלתה השאלה מה רמת הנוגדנים כנגד מ. בוכיס בבקר מיובא והאם הוא מהווה סכנה לבקר ישראלי, במיוחד לבקר מרפתות החלב.

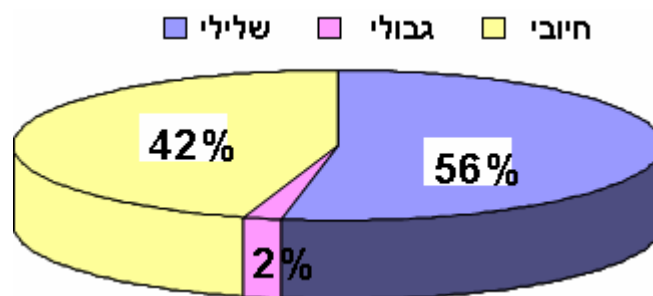
ב-2007 בוצע סקר סרולוגי הקדמי בשיטת ה-ELISA בחטיבה לבקטריאולוגיה במטרה לבדוק את רמת הנוגדנים כנגד מ. בוביס בבקר מיובא ובבקר מרפתות חלב ישראליות. לשם כך נבדקו 813 נסיובים ממספר אצוות (3 ממדינה א, 6 ממדינה ב ו-3 ממדינה ג) שהובאו לתחנות ההסגר השונות. בתרשים מס' 4 ניתן לראות שאחוז הדוגמאות החיוביות נע בין 77 (מדינה א), 40 (מדינה ב) ו-35 (ממדינה ג).

תרשים מס' 4: בדיקת רמת הנוגדנים כנגד חיידק מ. בוביס בעגלי יבוא בשיטת ה-ELISA.



מסקנת ביניים היא שהבקר המיובא מהווה סכנה מסוימת להטיית רמות המצאות החיידק מ. בוביס בארץ. יחד עם זאת, צריך לקחת בחשבון שהמספר הרב של דוגמאות חיוביות שהתגלה במשלוחים ממדינה א נובע בחלקו מכך שהדגימות נלקחו בזמן בדיקת הגורמים ל-shipping fever. בסקר נוסף נבדקה רמת ההגבה הסרולוגית למ. בוביס בבקר מרפתות חלב ישראליות ונעשתה השוואה עם הרמה הסרולוגית לאותו חיידק בבקר מיובא. בסקר של רפתות חלב השתתפו כ-44 ישובים ונבדקו כ-502 נסיובים. 56% מהרפתות נמצאו שליליות, שני אחוז היו גבוליים, ו-42% מהרפתות הראו תגובה חיובית (תרשים מס' 5).

תרשים מס' 5: חלוקה של שכיחות התגובה ל-מ. בוביס בסקר רפתות חלב בישראל.

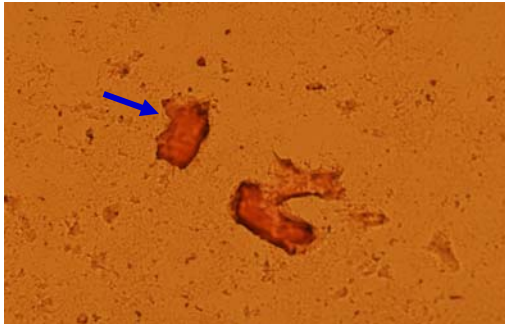


בהשוואת התגובות החיוביות למ. בוביס (מבחן anova between groups) נמצא הבדל משמעותי ברמה של $p=0.02$ בין ממוצעי השכיחות של התגובה החיסונית כנגד מ. בוביס בנסיובים ממקור ישראלי ליבוא (0.19% מול 0.41% בהתאמה).

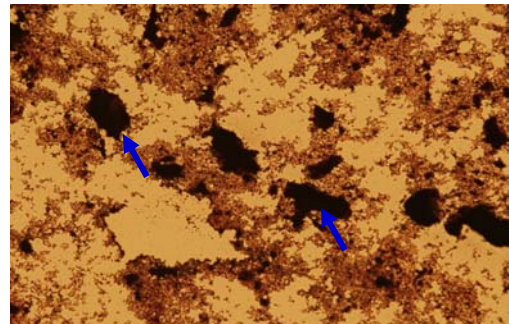
6. הכנת הגלאים לשימוש בשיטת ה- *in situ hybridization*

המטרה המרכזית של מחקר זה הייתה לפתח שיטה אבחונית ISH לזיהוי מהיר של מ. בוביס בנחתי ריאה. לצורך פיתוח שיטת ה-ISH לאבחון נבחרו שני גלאיים: מקטע דנ"א בגודל של 372 bp המשלים לרצף של ה-*ISMbov5* ומקטע דנ"א בגודל של 310 bp המשלים לרצף של הגן *p48*. הגן *p48* נמצא בעותק יחיד בגנום של מ. בוביס, לעומתו ה-*ISMbov5* שייך למשפחה הרב גנים עם הומולוגיה גבוהה בניהם (98%). ההנחה שלנו הייתה שבחירה של שני גלאיים לגנים ה-*ISMbov5* וה-*p48* השונים ביניהם במספר העותקים תאפשר לבדוק את סוגיית ההגברה של חוזק האיתות במהלך ה-ISH. בהמשך ביצענו **הערכה כמותית ואיכותית של הגלאיים המסומנים בחומר פלואורסנטי DIG**. הריכוז המינימלי של שני הגלאים שנתן את התגובה החיובית היה 10pg. בדרך כלל לצורכי ISH משתמשים בגלאי שריכוזו לא עולה על 2ng/μl. **בהמשך בדקנו את הימצאות וסגוליות הגלאיים *p48L* ו-*ISMbov5* בזני מ. בוביס שבודדו באזורים שונים ותקופות שונות בארץ ובאירופה**. מתוצאות הבדיקה ניתן ללמוד ששני הגנים נמצאו בכרומוזום של כל חיידק מ. בוביס שנבדק. כצפוי, הגלאי *ISMbov5* הכיר ברוב המקרים מספר רב של עותקים, לעומתו הגלאי *p48L* עבר היברידיזציה רק עם מקטע אחד. **הייחודיות של הגלאיים *ISMbov5* ו-*p48L* נבדקה בריאקציה ה-PCR ובאנליזת ה-dot blot על דנ"א גנומי שהופק מ-8 מינים שונים של מיקופלסמה (כולל *M. agalactiae* הפתוגן בצאן, שמראה אחוזי זהות גבוהים למ. בוביס ותגובת הצלבה ברמות שונות) ומ-7 מינים של חיידקים פתוגניים אחרים הנמצאים בבקר. הגלאיים *ISMbov5* ו-*p48L* הגיבו רק עם מ. בוביס, כלומר הם נמצאו יחודיים לחיידק זה. בנוסף, נבחנה יכולת הגלאי *ISMbov5* לזיהוי חיידק מ. בוביס בתרבית ללא הפקת דנ"א. תאי מ. בוביס מקובעים הוגבו עם ריכוזים שונים של הגלאי *ISMbov5* (2 ng/μl, 5 ng/μl, 10 ng/μl ו-20 ng/μl) (תרשים מס' 6). תאי הביקורת הוגבו עם בופר היברידיזציה בלבד ללא גלאי. התפתחות של צבע כחול כהה הצביע על יצירת קשר בין דנ"א מטרה בתאי החיידק לבין הגלאי המסומן. בדיקת ריכוזים שונים של הגלאי במהלך ISH הראתה שהריכוז הטוב ביותר הוא 2 ng/μl. שימוש בריכוזים גבוהים יותר יצר תגובה בלתי ספציפית שגברה ככל שעלה ריכוז הגלאי המסומן.**

תרשים מס' 6: זיהוי של תאי *M. bovis* המקובעים עם הגלאי *ISMbov5* המסומן ב-DIG.



ביקורת שלילית: חיידקי MB שקובעו והודגרו עם הגלאי *ISMbov5*

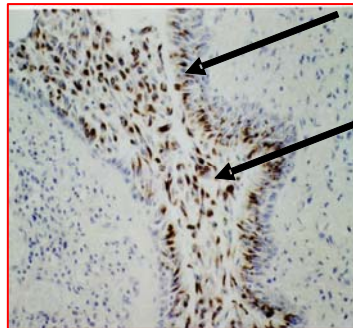


חיידקי MB שקובעו ב-4% PFA והודגרו בלי גלאי

7. העמדה של שיטת ה-ISH לאבחון מעורבות החיידק מ. בוכיס בדלקת ריאות בבקר ועגלים. בניסיון לבצע ISH על נתחי ריאה בחרנו בדוגמאות שאובחנו כחיוביות למ. בוכיס ב-IHC (תרשים מס' 7, פנל A) ובבידוד. בסה"כ בוצעו 10 ניסיונות (70 דוגמאות) להעמיד את השיטה ללא הצלחה. הסימון המתקבל הייה בלתי ספציפי ואובחן במקומות הלא רלוונטיים (סביב כלי דם) (תרשים מס' 7, פנל B).

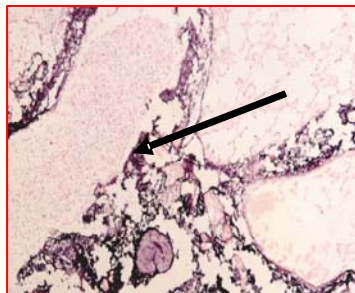
תרשים מס' 7:

(A) זיהוי של החיידק *M. bovis* בריאה דלקתית בשיטת אימונהיסטוכימיה.



זיהוי של החיידק מ. בוכיס בחתך של ריאה דלקתית

(B) ניסיון זיהוי של החיידק *M. bovis* בריאה דלקתית בשיטת *in situ hybridization*.



צביעה בלתי ספציפית מסביב לכלי דם

ההשערה היא שקיימות מספר נקודות תורפה שאליהן צריכים להתייחס:

(א) תהליך קיבוע הדוגמאות ב-formalin. הדוגמאות שעמדו לרשותנו בתחילת המחקר עברו קיבוע

במשך שבוע ימים לפחות. בספרות העוסקת בתחום ה-ISH מודגש שמשך הקיבוע משמעותי ביותר ואינו צריך לעלות על 48 שעות. על כן, התקבלה החלטה שכל דגימה חדשה שמגיעה למכון הווטרינרי ושאובחנה כדלקת ריאות תעבור תהליך קיבוע קצר של עד 48 שעות. למרות המאמצים, המשכנו לקבל תגובה בלתי ספציפית או חוסר תגובה.

(ב) טיפול באנזים proteinaseK. מטרת הטיפול באנזים היא להגביר את נגישות תאי המטרה לגלאי. על מנת להגיע לחדירה טובה של הגלאי יש לבחור באופן ניסיוני בריכוז מתאים של האנזים. טיפול יתר פוגע ברקמה והורס את חומר המטרה. לחלופין, טיפול בריכוז נמוך מדי של האנזים אינו מאפשר לגלאי להגיע למטרה. בתחילת המחקר השתמשנו בריכוזים שונים של אנזים proteinaseK מחברת Roche, כמו כן ניסינו למצוא זמן דגירה מתאים. בהמשך, השתמשנו בקיט Link-Label ISH Core המיועד לזיהוי חיידקים בשיטת ISH (BioGenex). שימוש בקיט זה הקטין את זמן הביצוע באופן משמעותי, שיפר את עוצמת הצבעים, אף לא השיג את מטרה המרכזית, קרי, זיהוי החיידק מ. בוכיס בריאה.

(ג) התאמה של נתחי הריאה. בתחילת העבודה השתמשנו בדגימות קליניות, שלא ניתן לקבוע באופן חד משמעי את מידת הנגיעות שלהן במ. בוכיס. חשבנו שרצוי להשתמש בדגימות מחיות מודבקות באופן מלאכותי שבהן זוהה חיידק המטרה. על מנת לקבל דוגמאות מקובעות של ריאה מעגלים שהודבקו באופן מבוקר בחיידק מ. בוכיס ושתהליך הקיבוע אכן 48 שעות, פנינו לעמיתנו באוניברסיטת פלורידה, בארצות הברית. בקשתנו נענתה בחיוב, קיבלנו כ-100 נתחי ריאה ובלוטות לימפה מבקר שהודבק באופן מבוקר במ. בוכיס. בדיקת הדוגמאות ב-IHC הראתה תוצאה חיובית חזקה. לעומתה, ההגבה של הדוגמאות עם גלאים ISMbov-5 ו-p48 בשיטת ה-ISH לא צלחה. החיסרון במערכת המוצעת הוא באי יכולתנו להשתמש בביקורת חיובית המאפשרת לאתר את הבעיה - האם היא בתהליך המבחן או בגלאים עצמם. נכון להיום, אין בנמצא גלאים מסחריים המזהים מ. בוכיס בשיטת ה-ISH.

סיכום:

אומנם לא הצלחנו בפיתוח שיטת ה-ISH, אף על פי כן במהלך המחקר הושגו מספר יעדים::

1. בוצע סקר סביל של זיהוי החיידק מ. בוכיס מבקר חולה במהלך השנים 2004-2006. תוצאות הסקר מראות מחד גיסא שקיימת עליה של למעלה מ-100% במספר הדגימות שנלקחו מבקר ושבהן זוהתה מיקופלסמה, ומאידך גיסא נצפתה עליה של כ-20% במספר בידודי מ. בוכיס מאותן דוגמאות (20/40 ב-2004, 48/24 ב-2005, ל-80/114 ב-2006). יתר על כן, בשנת 2006 נצפתה עליה חדה במספר בידודי מ. בוכיס מדלקות ריאות: 13/94 ב-2005, לעומת 56/114 ב-2006.
2. נעשה סקר נוכחות מ. בוכיס בלוע בקר לבשר בריא שמגיע לבית המטבחיים. במהלך הניסוי, נאספו כ-132 דגימות (80 מבקר לבשר ו-52 מבקר חלב) מבקר ישראלי (75 דוגמאות) ומבקר מיובא (58). ניתן לראות שאחוזי בידוד מ. בוכיס מבקר בריא שמגיע לשחיטה נמוך בהרבה מאחוזי הבידוד של אותו חיידק מבקר חולה באופן כללי (17.5% לעומת 64%) ומדלקות ריאה בפרט (69%). יחד עם זאת, לתופעת הנשאות יש תפקיד חשוב בפיזור החיידק המדביק בעדר והיא מהווה אתגר מיוחד באפידמיולוגיה

של המחלה ובאבחון. לא נצפה קשר מובהק בין הנוכחות של מ. בוביס לבין ההכשרה בשחיטה (חלק, כשר או טרף).

3. בפעם הראשונה בודד חיידק *M. canis*. הראנו שקיים קשר סטטיסטי מובהק בין הטרפה בעת השחיטה לבין בידוד החיידק ($p=0.02$).

4. בוצע סקר סרולוגי של בדיקת רמת הנוגדנים כנגד מ. בוביס בבקר מיובא ובבקר ישראלי מרפתות החלב.

REFERENCES:

Adegboye, D.S., U. Rasberry, P.G. Halbur, J.J. Andrews, and R.F. Rosenbusch. (1995). Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded calf lung tissues. *J. Vet. Diagn. Inves.* **7**: 261-263.

Adegboye, D.S., P.G. Halbur, D.L. Cavanaugh, R.E. Werdin, C.C.L. Chase, D. Miskimins, W., and R.F. Rosenbusch. (1995). Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis* associated lung abscesses in calves. *J. Vet. Diagn. Inves.* **7**: 333-337.

Adegboye, D.S., P.G. Halbur, R.G. Nutsch, R.G. Kadlec, and R.F. Rosenbusch. (1996). Pneumo-arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves: value of an immunohistochemical test for confirming *Mycoplasma bovis* in lesions. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* **209**: 647-649.

Ayling, R. D., S. E. Bashiruddin, and R. A. Nicholas. (2004). *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet. Rec.* **155**:413-6.

Bar-Moshe, B. (1964). The isolation of mycoplasma from an outbreak of bovine mastitis in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine* **21**, 97-99.

Bashiruddin, J. B., Frey, J., Konigsson, M. H. & other authors (2005). Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet J* **169**, 268-275.

Boye, M., T. K. Jensen, P. Ahrens, T. Hagedorn-Olsen, and N. F. Friis. (2001). *In situ* hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *Apmis* **109**:656-64.

Filioussis, G., Christodoulouopoulos, G., Thatcher, A., Petridou, V., and Bourtzis-Chatzopoulou, E. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical cases in Northern Greece. *The Vet J* **173**, 215-218.

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 diarrhoea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. *Can Vet J* **45**, 231-234.

Khodakaram-Tafti, A., and A. Lopez. (2004). Immunohistopathological findings in the lungs of calves naturally infected with *Mycoplasma bovis*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* **51**:10-4.

Kokotovic, B., Friis, N. F., and Ahrens, P. (2007). *Mycoplasma alkalescens* demonstrated in bronchoalveolar lavage of cattle in Denmark. *Acta Vet. Scand* **49**, 2-4.

- Kwon, D. & Chae, C. (1999).** Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Vet Pathol* **36**, 308-313.
- Kwon, D., Choi, C. & Chae, C. (2002).** Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Vet Pathol* **39**, 584-587.
- Le Grand, D., Calavas, D., Brank, M., Citti, C., Rosengarten, R., Bezille, P. & Poumarat, F. (2002).** Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Vet Rec* **150**, 268-273.
- Lysnyansky, I., Ben-Barack, I., Ron, Y., Levisohn, S. & Yogev, D. (2007).** Inter-and Intra-strain Variability within IS3, IS4 and IS30-related Insertion Sequence Families of *Mycoplasma bovis* (in preparation).
- Maeda, T., T. Shibahara, K. Kimura, Y. Wada, K. Sato, Y. Imada, Y. Ishikawa, and K. Kadota. (2003).** *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J Comp Pathol.* **129**:100-10.
- Mahillon, J. & Chandler, M. (1998).** Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 725-774.
- Markham, P. F., Kanci, A., Czifra, G., Sundquist, B., Hains, P. & Browning, G. F. (2003).** Homologue of macrophage-activating lipoprotein in *Mycoplasma gallisepticum* is not essential for growth and pathogenicity in tracheal organ cultures. *J Bacteriol* **185**, 2538-2547.
- Nicholas, R. A. & Ayling, R. D. (2003).** *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci* **74**, 105-112.
- Pfutzner, H. & Sachse, K. (1996).** *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech* **15**, 1477-1494.
- Razin, S. (2002).** Diagnosis of mycoplasmal infections. In *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, pp. 531-543. Edited by S. Razin & R. Herrmann. New York: Plenum.
- Robino, P., Alberti, A., Pittau, M., Chessa, B., Miciletta, M., Nebbia, P., Grand, D. L. & Rosati, S. (2005).** Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* **109**, 201-209.
- Rosati, S., Pozzi, S., Robino, P., Montinaro, B., Conti, A., Fadda, M. & Pittau, M. (1999).** P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a malp product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. *Infect Immun* **67**, 6213-6216.
- Rosengarten, R., and Citti, C. (1999).** The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: Stipkovits, L., Rosengarten, R., Frey, J. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol.3. European Commission, Brussels, pp. 14-17.
- Simecka, J. W., Davis, J. K., Davidson, M. K., Ross, S. E., Stadlander, C. T. K. & Cassell, G. H. (1992).** *Mycoplasma* diseases of animals. In *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, pp. 391-416. Edited by J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch & J. B. Baseman. Washington, DC: ASM Press.
- Tenover, F. C. (2007).** Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. *Clin. Infect. Dis.* **44**:418-23.
- Zwirgmaier, K. (2005).** Fluorescence in situ hybridisation (FISH)--the next generation. *FEMS Microbiol Lett* **246**, 151-158