

**חקר התפתחות עמידות לאנטיביוטיקה בחיידקי מיקופלסמה בוביס והשפעתה על אלימות החיידק
והאפידמיולוגיה של המחלה**

**The emergence of antibiotic resistance in *Mycoplasma bovis* and its association
with virulence and epidemiologic features of the disease in cattle**

א. ליסנינסקי¹ ונ. שפיגל²

¹יחידה למיקופלסמה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון; ²ביה"ס לרפואה וטרינרית, האוניברסיטה העברית

שותפים למחקר:

ד"ר א. ליסנינסקי, מומחית בביוולוגיה מולקולרית של חיידקי מיקופלסמה innal@moag.gov.il

פרופ' נ. שפיגל, מומחה ברפואת חיות משק וחוקר מחלות זיהומיות

Nahum.shpigel@mail.huji.ac

תקציר

חיידק *Mycoplasma bovis* מהווה אחד מגורמי המחלה המורכבים והמאתגרים ביותר בתעשיית הבקר בישראל ובעולם, בשל הנזקים הכלכליים המשמעותיים שהוא גורם. מטרת המחקר הנוכחי הייתה לאפיין את פרופיל הרגישות לאנטימיקרוביאליים של תבדידי *M. bovis* שבודדו בישראל בשנים 2017–2025 ולהשוותו לנתונים היסטוריים מהשנים 1994–2016. במסגרת המחקר נבדקו פנוטיפית 95 תבדידים עכשוויים באמצעות שיטת broth microdilution לקביעת הריכוז המעכב המינימלי (MIC) עבור 12 חומרים אנטימיקרוביאליים. במקביל, בוצעה אנליזה מולקולרית *in silico* של נתוני ריצוף גנום מלא (WGS) עבור 143 תבדידים היסטוריים, במטרה לזהות מוטציות באתרי המטרה של האנטיביוטיקות. לצורך סיווג התבדידים כאוכלוסיות (WT) או non-wild type (NWT) נעשה שימוש בגישת visual estimation לקביעת ערכי ECOFF משוערים. לפי שיטת ההערכה החזותית, לא זוהתה עמידות נרכשת לתיאמולין או לפלורפניקול. לעומת זאת, זוהו אוכלוסיות NWT בשיעורים גבוהים עבור טילוזין וטילמיקוזין (97%), אוקסיטרציקלין (92%), גמיטרומיצין (50%), ספירמיצין (49%), טולטרומיצין (47%), אנרופלוקסצין (46%), לינקומיצין (42%) וספקטינומיצין (29%).

השוואה לנתונים ההיסטוריים הצביעה על עלייה משמעותית בשיעורי העמידות לאורך השנים. בפרט, שיעור התבדידים הלא רגישים למקרולידיים עלה מ-84% ל-97%, בעוד ששיעור העמידות לפלואורוקוויןולונים עלה מ-17.5% ל-48%. בנוסף, שיעור התבדידים העמידים לשלוש קבוצות אנטיביוטיקה לפחות (מקרולידיים, טטרציקלינים ופלואורוקוויןולונים) עלה מ-6.3% ל-43% בקבוצה ההיסטורית ל-43% בקבוצה העכשווית, בעיקר כתוצאה מהעלייה בעמידות לפלואורוקוויןולונים.

הגנוטיפ sequence type ST52, אשר זוהה בעבר כגנוטיפ הדומיננטי ברפתות החלב בישראל, אופיין בעמידות מלאה למקרולידיים ולטטרציקלינים, אך נותר רגיש מבחינה גנוטיפית לאנרופלוקסצין. ממצאי המחקר מצביעים על מגמת עלייה מדאיגה בעמידות לאנטימיקרוביאליים בקרב תבדידי *M. bovis* בישראל. מגמה זו תואמת בחלקה דיווחים ממדינות אחרות, אך משקפת גם מאפיינים מקומיים ייחודיים. בעוד שהרגישות לתיאמולין (לא נמצא בשימוש שיגרתי ברפואת הבקר) נותרה גבוהה, בדומה למגמה העולמית, נמצאו בישראל שיעורי עמידות גבוהים במיוחד לפלואורוקוויןולונים ולטטרציקלינים בהשוואה למדינות מערב אירופה. ממצאים אלה מדגישים את הצורך בגיבוש אסטרטגיות טיפול מושכלות המבוססות על שימוש בבדיקות אבחון מולקולריות מהירות, לצד פיתוח אמצעי מניעה וטיפול חלופיים, ובהם חיסונים וחומרים עם פעילות אנטימיקרוביאלית חדשניים.

מבוא:

חיידק מיקופלסמה בוביס נחשב כיום לאחד מגורמי המחלה המורכבים והמאתגרים ביותר בתעשיית הבקר בעולם ובישראל, בשל הנזקים הכלכליים הכבדים שהוא גורם. מדובר בחיידק פתוגני המשתייך למחלקת ה-Mollicutes המאופיין בגודל תא קטן במיוחד ובהיעדר דופן תא. החיידק גורם למגוון רחב של תסמונות קליניות, ובהן מחלות הנשימה בבקר (BRD), דלקות ריאה, דלקות עטין, דלקות מפרקים ודלקות אוזניים [1]. בישראל בודד החיידק בעבר בעיקר ממקרי תחלואה נשימתית, אולם החל משנת 2008 חלה תפנית משמעותית עם הופעת התפרצויות נרחבות של דלקות עטין שנגרמו על ידי — מ. בוביס תופעה שהפכה מאז לבעיה מתמשכת ברפתות החלב המקומיות.

השליטה ב-*m*. *בוביס* מאתגרת במיוחד, הן בשל היעדר חיסון יעיל והן בשל העמידות הטבעית (*intrinsic*) של החיידק לקבוצות רבות של אנטיביוטיקה. לדוגמה, החיידק עמיד באופן טבעי לאנטיביוטיקות ממשפחת הבטא-לקטמים (כגון פניצילין), הפועלות על דופן התא — מבנה שאינו קיים במיקופלסמות. בנוסף, הוא עמיד גם לסולפונאמידים, הפוגעים באזנים *dihydropteroate synthetase* אשר אינו מצוי במיקופלסמה. לפיכך, הטיפול הקליני מתבסס בעיקר על תרופות המעכבות סינתזת חלבון או DNA כגון מקרולידיים, טטראציקלינים, פלואורוקווינולונים ואמינוגליקוזידים. עם זאת, בעשורים האחרונים מדווחת ברחבי העולם עלייה מדאיגה בעמידות הנרכשת של *m*. *בוביס* גם לקבוצות אנטיביוטיקה אלו [2]. כדי לקבל החלטות מושכלות בנוגע לשימוש באנטיביוטיקה יעילה, ולבנות תוכניות למניעת הדבקה והתפשטות מהירה של החיידק, נדרש ידע בסיסי ומעודכן שיספק תמונה רחבה של דפוסי הרגישות והעמידות של *m*. *בוביס*.

מנגנוני העמידות ב-*m*. *בוביס* מבוססים בעיקר על מוטציות כרומוזמליות באתר הקישור של האנטיביוטיקה. עמידות למקרולידיים (כגון *tylosin* ו-*tilmicosin* קשורה לרוב למוטציות בגן ה-23S rRNA (בעמדות כמו 748, 2058-2060) או בחלבונים ריבוזומליים L4 ו-L22. עמידות לפלורוקווינולונים, כגון *enrofloxacin* נובעת ממוטציות באזורי ה-*quinolone resistance-determining regions* (QRDR) של החלבונים המקודדים על ידי הגנים *gyrA* ו-*parC* ואילו עמידות לטטראציקלינים קשורה למוטציות בגן ה-16S rRNA [3]. מטרת המחקר הנוכחי היא לאפיין את פרופיל הרגישות האנטימיקרוביאלית של תבדידי *m*. *בוביס* שבודדו בישראל בשנים האחרונות (2017–2025), ולהשוותם לנתונים היסטוריים מהשנים 1994–2016. הבנת מגמות העמידות והשינויים שחלו לאורך השנים, לצד זיהוי המנגנונים המולקולריים העומדים בבסיסן, חיונית לצורך גיבוש אסטרטגיות טיפול מושכלות ולצמצום השימוש באנטיביוטיקה בחיות משק. בנוסף, קבלת החלטות מושכלות בנוגע לבחירת טיפול אנטיביוטי יעיל, וכן פיתוח תוכניות למניעת הדבקה והתפשטות מהירה של החיידק, מחייבות ידע בסיסי ומעודכן שיספק תמונה מקיפה של דפוסי הרגישות והעמידות של *m*. *בוביס* בישראל.

מטרת המחקר:

בשנה הנוכחית מטרת המחקר הייתה לקבוע את פרופיל הרגישות של תבדידי *m*. *בוביס* בישראל.

מטרות ספציפיות היו:

- לאפיין את אוכלוסיית חיידקי המיקופלסמה מבחינת הרגישות לקבוצות אנטיביוטיקה שונות.
- לזהות קשרים בין הגנוטיפים לבין הפרופילים הפינטיפיים (רגישות לאנטיביוטיקה) של החיידק.

שיטות וחומרים:

בידודי *m*. בוביס ותנאי גידול. לצורך קביעת ערכי הריכוז המעכב המינימלי (MIC) נבדקו בסך הכול 95 בידודי *m*. *בוביס* שנאספו בישראל בין השנים 2017–2025. הבידודים התקבלו ממערכת הנשימה של בקר (57), מחלב (33) וממפרקים (5). הדגימות גודלו על מצע אגר Friss (FF) וזיהוי חיידקים. *בוביס* בוצע תחלה באמצעות אימונופלוואורסנציה ישירה (IMF) תוך שימוש באנטי-סרום מצומד ייחודי למין, ואומתו בהמשך באמצעות PCR ייחודי ל-*m*. *בוביס*. הסטוקים סופיים של החיידק הוכנו במצע SP4 חולקו לאליקוטים והוקפאו ללא תוספים

בטמפרטורה של -80°C . ריכוז החיידקים החיים (CFU/ml) באליקוט נקבעה באמצעות מיהולים עשרוניים סדרתיים שנזרעו על מצע אגר SP4.

חומרים אנטימיקרוביאליים ובדיקות רגישות. בדיקות הרגישות לאנטימיקרוביאליים בוצעו בשיטת microbroth dilution באמצעות פלטות Sensititre מסחריות שהותאמו אישית (Thermo Fisher Scientific). לכל באר בפלטה נוספו $100\ \mu\text{L}$ של תרחיף חיידקים בריכוז 10^4 CFU. הפלטות הכילו את החומרים האנטימיקרוביאליים הבאים:

- enrofloxacin ($0.125\text{--}16\ \mu\text{g/mL}$)
- erythromycin ($0.125\text{--}32\ \mu\text{g/mL}$)
- tilmicosin ($0.03125\text{--}64\ \mu\text{g/mL}$)
- tylosin tartrate ($0.015625\text{--}64\ \mu\text{g/mL}$)
- lincomycin ($0.5\text{--}32\ \mu\text{g/mL}$)
- spiramycin ($0.5\text{--}16\ \mu\text{g/mL}$)
- tiamulin ($0.0078125\text{--}16\ \mu\text{g/mL}$)
- spectinomycin ($0.25\text{--}256\ \mu\text{g/mL}$)
- oxytetracycline ($0.125\text{--}32\ \mu\text{g/mL}$)
- florfenicol ($0.25\text{--}16\ \mu\text{g/mL}$)

בנוסף, האנטימיקרוביאליים gamithromycin ($0.25\text{--}128\ \mu\text{g/mL}$) ו-tulathromycin ($0.25\text{--}128\ \mu\text{g/mL}$) נבדקו לקביעת ערכי MIC באמצעות שיטת microbroth dilution כפי שתוארה בעבר [4], תוך שימוש במצע SP4. בכל בדיקה נכללה באר ביקורת חיובית שהכילה $100\ \mu\text{L}$ מצע ללא חומר אנטימיקרוביאלי ו- $100\ \mu\text{L}$ של תרבית מ. בוביס, שבאר הביקורת השלילית הכילה $200\ \mu\text{L}$ מצע סטרילי בלבד. הפלטות נאטמו באמצעות מדבקת אטימה והודגרו ב- 37°C . הפלטות נבדקו מדי יום עד שבאר הביקורת החיובית הראתה שינוי צבע ברור מאדום לכתום/צהוב, המעיד על גידול חיידקי מובחן היטב (בדרך כלל לאחר 48–72 שעות הדגרה). זן הייחוס מ. בוביס PG45 (ATCC 25523) שימש כביקורת חיובית לתקפות השיטה.

קביעת נקודות סף לעמידות אנטימיקרוביאלית. מלבד ערכי הסף האפידמיולוגיים (ECOFFs) עבור florfenicol ו-enrofloxacin (<https://mic.eucast.org>), לא קיימים כיום ערכי breakpoints מוגדרים לעמידות אנטימיקרוביאלית ב-מ. בוביס. לפיכך, נעשה שימוש בגישה חזותית (visual estimation) לצורך קביעת ערכי ECOFF משוערים, אשר שימשו לסיווג הבידודים כאוכלוסיות (WT) wild type או (NWT) non-wild type. ערכי breakpoints לעמידות שנקבעו עבור *Pasteurellaceae* (CLSI, 2015) שימשו לצורכי השוואה במקרים שבהם לא ניתן היה לקבוע ערכי ECOFF בטווחי הריכוזים שנבדקו במחקר זה (ראו תוצאות).

אנליזה מולקולרית *in silico* של אתרי מטרה לאנטיביוטיקה בבידודי מ. בוביס שעברו ריצוף גנומי. זיהוי *in silico* של מוטציות נקודתיות הקשורות לעמידות אנטימיקרוביאלית ב-מ. בוביס בוצע באמצעות נתוני ריצוף גנום מלא (WGS) שהופקו בעבר בשיטת Illumina [5]. מערך הנתונים כלל 143 בידודי מ. בוביס שנאספו בין השנים 1994–2016. מתוכם, 100 בידודים מקורם בבעלי חיים ממשקי חלב וממפטמות בישראל, ואילו 43 בידודים

התקבלו מבעלי חיים מיובאים שמקורם במדינות אירופיות שונות ובאוסטרליה. בעלי חיים מיובאים אלו נדגמו במהלך ההסגר (קרנטינה) או במחלקה לפתולוגיה של המכון הווטרינרי ע"ש קימרון, במקרים שבהם בעלי החיים מתו במהלך ההובלה לישראל. במחקר הנוכחי לא נעשתה הבחנה בין בידודים מקומיים למיובאים במסגרת האנליזות ההשוואתיות. גישה זו התבססה על כך שבעלי החיים המיובאים שמהם בודד החיידק היו חלק ממשלוחי בקר גדולים, אשר לאחר תקופת ההסגר שולבו במשקים מקומיים, בעיקר במפטמות. לפיכך, בעלי חיים שנשארו את החיידק באופן תת-קליני, יכלו לשמש מקור להדבקה ולהעברת *M. bovis* לעגלים מקומיים. קריאות הרצף הגולמיות עברו בקרת איכות והרכבת גנום כפי שתואר בעבר [5], והגנומים שהתקבלו יושרו (aligned) מול גנום הייחוס *M. bovis* PG45. הגנים המטרה הקשורים לעמידות למקרולידיים (גני *rplD*, *rplV* ו-*23S rRNA*), לטטרציקלינים (גני *16S rRNA*) ולפלורוקווינולונים (*parC*, *parB*, *gyrA* and *gyrE*) הופקו ונותחו. פולימורפיזמים של נוקלאוטיד בודד (SNPs) זוהו באמצעות ניתוח רצפים השוואתי של רצפי הגנים, ובוצע סקר ממוקד למוטציות שתוארו בעבר כמקנות עמידות אנטימיקרוביאלית (ראו סקירות [2, 3]).

תוצאות:

רגישות אנטימיקרוביאלית של זני *M. bovis*. התפלגויות התדירות של בידודי *M. bovis* לפי ערכי הריכוז המעכב המינימלי (MIC) וכן ערכי $\text{MIC}_{50/90}$ מוצגים באיור 1. החומרים האנטימיקרוביאלים שהציגו ערכי MIC גבוהים באופן אחיד בקרב מרבית הבידודים כללו את:

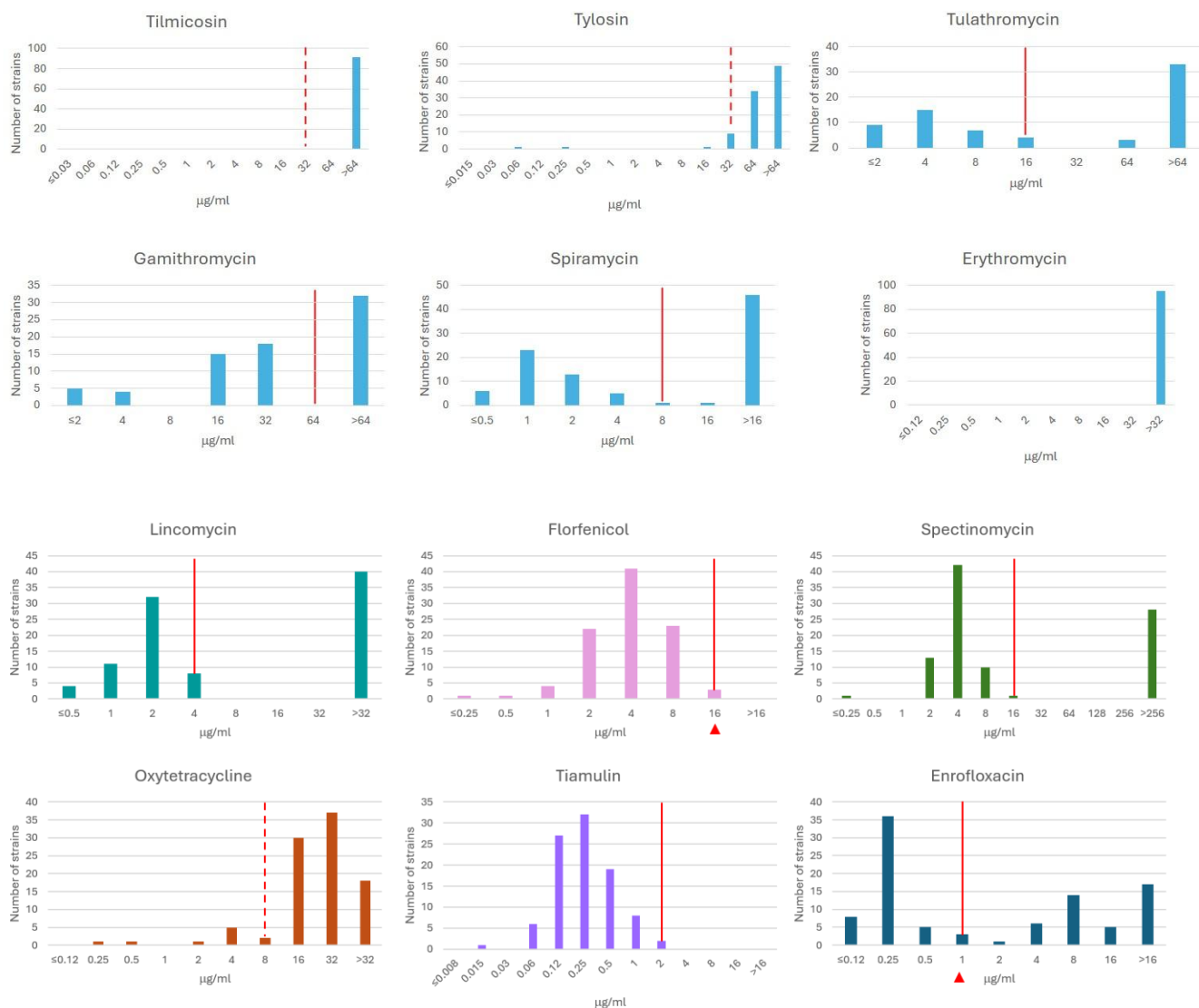
- *tilmicosin* ($\text{MIC}_{50/90}$: >64 / >64)
- *tylosin* ($\text{MIC}_{50/90}$: >64 / >64 $\mu\text{g/mL}$)
- *erythromycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: >32 / >32 $\mu\text{g/mL}$)
- *gamithromycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 32 / >64 $\mu\text{g/mL}$)

אנטימיקרוביאלים עם ערכי MIC נמוכים באופן אחיד והתפלגות ה-WT דומיננטית כללו:

- *tiamulin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 0.25 / 0.25 $\mu\text{g/mL}$)
- *florfenicol* ($\text{MIC}_{50/90}$: 4 / 8 $\mu\text{g/mL}$)

אנטימיקרוביאלים עם התפלגות דו-מוקדית (bimodal) של ערכי MIC היו:

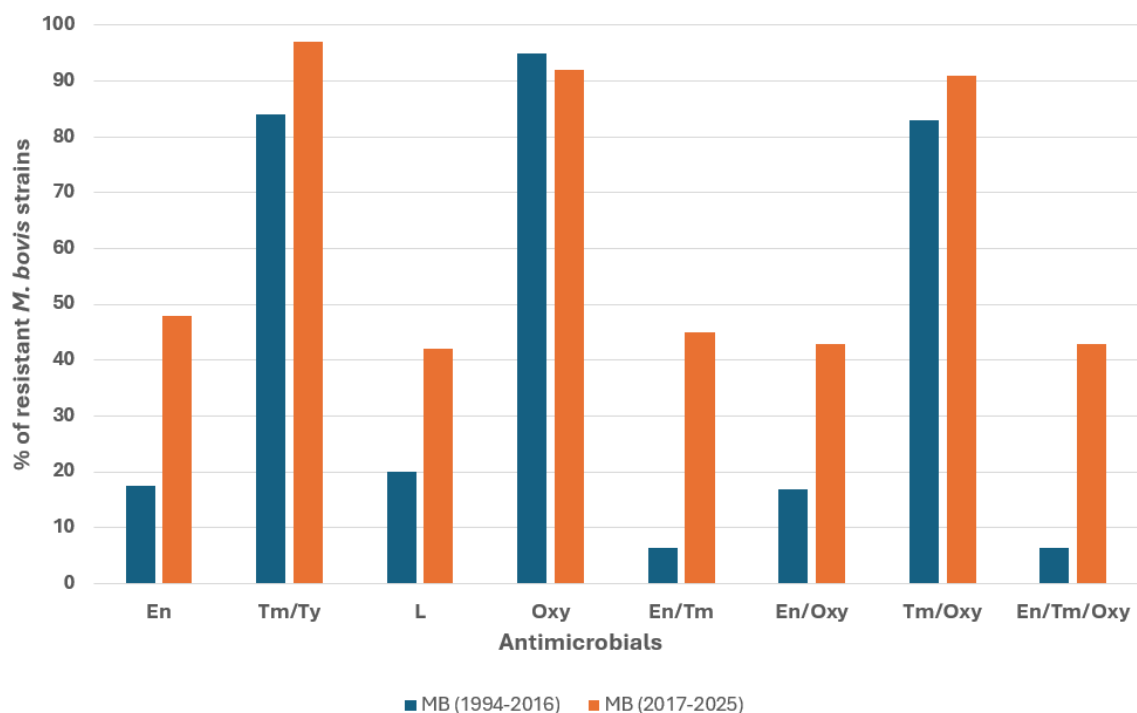
- *tulathromycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 16 / >64 $\mu\text{g/mL}$)
- *spiramycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 4 / >16 $\mu\text{g/mL}$)
- *lincomycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 2 / >32 $\mu\text{g/mL}$)
- *spectinomycin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 4 / >256 $\mu\text{g/mL}$)
- *enrofloxacin* ($\text{MIC}_{50/90}$: 0.5 / >16 $\mu\text{g/mL}$)



איור מס' 1: הערכת רגישותם של זני שדה של *M. m*. בוביס לקבוצות אנטיביוטיקה שונות.

התפלגות של בידודי *M. m*. בוביס (ציר Y) בהתאם לריכוזים המעכבים המינימליים (ציר X, מיקרוגרם/מ"ל) עבור כל אחד מ-12 התכשירים האנטימיקרוביאליים. כל צבע מייצג קבוצה שונה של חומרים אנטימיקרוביאליים. ערכי הסף האפידמיולוגיים המשווערים (ECOFFs) שנקבעו באמצעות הערכה חזותית, מסומנים בקווים אדומים רציפים, בעוד שערכי ה-ECOFF של ארגון EUCAST עבור פלורפניקול ואנרופלוקסצין (<https://mic.eucast.org>) (CLSI, 2015) *Pasteurellaceae* משפחת *Pasteurellaceae* מסומנים בחיצים אדומים. נקודות הסף לעמידות שנקבעו עבור משפחת *Pasteurellaceae* (CLSI, 2015) ושימשו להשוואה כאשר לא ניתן היה לקבוע ECOFF בטווח הבדיקה של מחקר זה, מוצגות כקווים אדומים מקווקווים.

לפי שיטת ההערכה החזותית, לא נצפתה עמידות נרכשת לתיאמולין או לפלורפניקול. עם זאת, זוהו אוכלוסיות NWT עבור ספקטינומיצין (29%), לינקומיצין (42%), אנרופלוקסצין (46%), ספירמיצין (49%), טולטרומיצין (47%) וגמיטרומיצין (50%). (איור 2). שיטת ההערכה החזותית לא אפשרה קביעת ערכי ECOFF עבור אריתרומיצין בשל עמידות מולדת (intrinsic resistance) ועבור תילמיקוסין, טילוסין ואוקסיטרציקלין עקב היעדר התפלגות נורמלית וערכי MIC גבוהים במיוחד (איור 1). עם זאת, בהתבסס על ערכי הסף של CLSI עבור *Pasteurella* ועל נתונים שפורסמו בעבר, בידודים עם ערכי MIC של $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ עבור tilmicosin ו- $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ עבור oxytetracycline סווגו כ-NWT. בהתאם לקריטריונים אלו, שיעור בידודי ה-NWT הוערך ב-97% עבור tilmicosin ו-tylosin, הידוע כמציג עמידות צולבת עם tilmicosin, וב-92% עבור oxytetracycline (איור 2). ערכי ה-MIC של זן הייחוס מ. מ. PG45 נמצאו עקביים לאורך המחקר ותאמו לטווחים שדווחו במחקרים קודמים [6-8].



איור מס' 2: מגמות לאורך זמן בשכיחות בידודי שדה עמידים של מ. מ. בישראל בין התקופות 1994–2016 ו-2017–2025.

הערכת מגמות העמידות של מ. מ. בישראל לאורך זמן. כדי לבחון האם דפוסי הרגישות בזני שדה של מ. מ. השתנו לאורך זמן, השווינו בין שתי קבוצות: 143 בידודים מהשנים 1994–2016 ו-95 בידודים מהשנים 2017–2024. בקבוצה הראשונה נקבעה הרגישות באופן גנוטיפי באמצעות זיהוי מוטציות באתרי קישור לאנטיביוטיקה, בעוד שבקבוצה השנייה הוערכה הרגישות באופן פנוטיפי באמצעות מבחני MIC (ראו פסקה לעיל). זנים שנשאו לפחות מוטציה נקודתית אחת בעמדות הידועות כמפחיתות רגישות למקרוליידים סווגו כבעלי רגישות מופחתת. סריקה של מוטציות באתרים II ו-V של 23S rRNA בקבוצה הראשונה העלתה כי 120 זנים נשאו את המוטציה G748A באחד משני עותקים של *rrl* (*rrl1*: n=92; *rrl2*: n=91), או לחלופין נשאו הן את G748A והן את A2058G (*rrl1*: n=92; *rrl2*: n=91).

($n=28$; $rrl2$: $n=29$). מאחר שמוטציות בעמדה 748 קשורות לרגישות מופחתת למקרולידים בעלי טבעת בת 16 אטומים פחמן, בסך הכול 84% (120/143) מהזנים בקבוצה הראשונה סווגו כבעלי רגישות מופחתת ל-tylosin ול-tilmicosin, מבין אלה, 24% נשאו מוטציות משולבות באתרים II ו-V של 23S rRNA ולכן ניתן לסווגם כבעלי עמידות ברמה גבוהה למקרולידים. יש לציין כי לא זוהו מוטציות באתרי קישור למקרולידים בזנים שבדדו לפני שנת 2005; עם זאת, מאחר שגודל המדגם לתקופה 1994–2005 היה מוגבל ($n=8$), לא ניתן להסיק מכך מסקנות חד-משמעיות לגבי מגמות מוקדמות לאורך זמן. בהשוואה בין ההקבוצה הראשונה (84% עמידות משוערת על בסיס גנוטיפי) לבין הקבוצה השנייה, שבה 97% מהזנים הציגו ערכי MIC של $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ עבור tilmicosin ו-tylosin כאשר ערך סף זה נקבע בהתאם לפרסומים קודמים ול-breakpoints של CLSI עבור *Pasteurellaceae* (איורים 1–2), נצפתה עלייה מובהקת בשכיחות העמידות למקרולידים ($p < 0.001$). עמידות ללינקוזאמיד, דוגמת lincomycin, קשורה בדרך כלל לנוכחות המוטציות בתוך דומיין V של גני 23S rRNA. לפיכך, בעוד ש-29/143 (20%) מהזנים שנבדקו *in silico* סווגו כעמידים לאנטיביוטיקה זו, 42% מהזנים הציגו בבדיקה הפנוטיפית ערכי MIC של $> 4 \mu\text{g/mL}$ (ECOFF לפי הנתונים של המחקר הנוכחי). למעשה, כל הבידודים בקבוצה זו שהוגדרו כלא-רגישים הציגו ערכי MIC גבוהים משמעותית של $\text{MIC} > 32 \mu\text{g/mL}$. גם במקרה של lincomycin נצפתה עלייה מובהקת בשכיחות העמידות בין שתי הקבוצות. מוטציות באזורי ה-quinolone resistance-determining regions (QRDR) של GyrA ($S83F$; $n=12$) או ParC ($D84A$; $n=1$), וכן מוטציות משולבות ב-GyrA/ParC ($[S83Y \text{ and } D84N]$; $n=1$) ($S83F \text{ and } D84N$; $n=6$), $[S83F \text{ and } S80I]$; $n=5$) זוהו בזנים שבדדו בין השנים 1994–2016. בסך הכול, 17.5% מהזנים שנבדקו *in silico* נשאו מוטציה אחת או שתיים. זנים שנשאו מוטציות בו-זמניות הן ב-GyrA והן ב-ParC, שילוב הידוע כמפחית בצורה המשמעותית ביותר את הרגישות לפלואורוקווינולונים — היוו 8.4% מהקבוצה. בקבוצה שנבדקה פנוטיפית, 48% הציגו MIC של $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ (ECOUST-ECOFF) והוגדרו כעמידים ל-enrofloxacin. ממצאים אלו מצביעים על עלייה מובהקת בעמידות ל-enrofloxacin ($p < 0.001$) בקבוצת הזנים שבדדו לאחרונה, בין השנים 2017–2025 (איורים 1–2). מוטציות בו-זמניות בעמדות 965 ($A \rightarrow T$) ו-967 ($A \rightarrow T/C$) הידועות כקשורות לרגישות מופחתת לטטרציקלינים, זוהו ב-136 מתוך 143 (95%) בידודים. בוביס מהתקופה 1994–2016. ממצאי *in silico* נמצאו בקורלציה עם ערכי ה-MIC הגבוהים של oxytetracycline שנצפו בקבוצה מהשנים 2017–2024, שבה 92% מהזנים הציגו ערכי MIC של $\geq 8 \mu\text{g/mL}$. בהתבסס על נוכחות מוטציות הקשורות לעמידות, 6.3% מזני מ. בוביס מהשנים 1994–2016 סווגו כ-multidrug-resistant (MDR) עם עמידות נרכשת לשלוש קבוצות אנטיביוטיקה – enrofloxacin, tylosin/tilmicosin ו-oxytetracycline; 83% מהזנים סווגו כעמידים למקרולידים ולטטרציקלינים. לשם השוואה, בקבוצה מהשנים 2017–2025 נצפתה עלייה מובהקת בשכיחות העמידות הרב-תרופתית, כאשר 43% מהזנים סווגו כ-MDR. ראוי לציין כי ה-multilocus-sequence type (MLST) מסוג ST52 ($n=51$) אשר זוהה בעבר כגנוטיפ הדומיננטי ברפתות חלב בישראל, אופיין *in silico* כרגיש ל-enrofloxacin (100%), אך כעמיד ל-tylosin/tilmicosin (100%) וכן ל-oxytetracycline (96%).

דיון:

ממצאי המחקר מצביעים על עלייה דרמטית ומדאיגה בשכיחות העמידות האנטימיקרוביאלית של חיידקי *M. tuberculosis* בישראל לאורך שלושת העשורים האחרונים. השוואה בין הקבוצה ההיסטורית (1994–2016) לקבוצה העכשווית (2017–2025) חושפת כי שיעור הזנים MDR זינק מ-6.3% ל-43% (בעיקר בגלל עליה בעמידות לאנרופלוקסצין). נתונים אלו תואמים את המגמות המדווחות באירופה ובסין, ומדגישים את השחיקה המהירה ביעילותם של חומרים אנטימיקרוביאלים שהיו בעבר עמודי התווך של הטיפול במיקופלסמוזיס [9-11].

בדומה לממצאים בישראל, בהם 97%–98% מהזנים עמידים ל-tilmicosin ו-tylosin ו-92% ל-oxytetracycline גם בסין (2026) דווח על עמידות כמעט מוחלטת למקרולידיים (97.9%) ולאווקסטרציקלין (100%). מחקרים מאוסטרליה (2023) הראו כי שכיחות העמידות למקרולידיים נמוכה משמעותית מזו שנצפתה באירופה ובצפון אמריקה, ולא נמצאו מוטציות אופייניות ב-QRDR-המקנות עמידות לפלואורוקוויןולונים. מגמה דומה נצפתה בקנדה, שם נרשמה רכישת עמידות גבוהה ותדירה לקבוצות אלו לאורך שני עשורים. המעבר לשימוש נרחב במקרולידיים מהדור החדש, כמו gamithromycin ו-tulathromycin, לא פתר את הבעיה בישראל, שכן גם כלפיהם נצפתה עמידות משמעותית (בכ-50%; אירוס 1-2).

שינוי משמעותי במיוחד נרשם ברגישות לפלואורוקוויןולוני (enrofloxacin). בעוד שבמחקר הקודם שלנו [8], בו נבדקה רגישות של זני *M. tuberculosis* מקומיים ומיובאים (2005–2007), זנים מקומיים נחשבו לרגישים יחסית בהשוואה לזנים מיובאים, הנתונים העדכניים מראים כי 48% מהתבדידים כיום עמידים לאנרופלוקסצין. עובדה זו מגבילה מאוד את האפשרויות הטיפוליות, שכן פלואורוקוויןולונים נחשבים לעיתים קרובות כ"קו אחרון" לטיפול בזיהומים קשים. המצב בישראל דומה לזה שבסין (68% עמידות) ובאזורים מסוימים באירופה כמו איטליה וספרד, בהם נרשמו ערכי MIC₉₀ גבוהים במיוחד לפלואורוקוויןולונים [9, 10]. בצרפת, רוב הזנים העדכניים הוגדרו כבעלי רגישות "בינונית" (intermediate) "בלבד לאנרופלוקסצין. לאומת זאת, בלגיה והולנד, העמידות נותרה נמוכה (3%–8%).

בתחום הטטרציקלינים, העמידות ב-*M. tuberculosis* בישראל היא רחבה וקבועה מזה זמן רב, כאשר מעל 90% מהזנים מציגים עמידות ל-oxytetracycline כמו גם ל-chlortetracycline (הנתונים עבור chlortetracycline לא מוצגים). מוטציות בעמדות 965 ו-967 ב-16S rRNA זוהו כסמן הגנטי המרכזי לעמידות זו. לעומת זאת, החומרים היחידים שהראו ערכי MIC נמוכים ואחידים הם tiamulin ו-florfenicol. ממצא זה עקבי עם הדיווחים מבלגיה ומהולנד [12, 13], שם נצפתה עמידות מינימלית בלבד לחומרים אלו, ועם המחקר בסין שקבע כי tiamulin נותר החומר הפעיל ביותר ביותר *in vitro* נגד החיידק אם כי יעילותו הקלינית בשדה (במיוחד בדלקות עטין ובזיהומים כרוניים) דורשת אישוש נוסף.

הנתונים האפידמיולוגיים והגנטיים מדגישים את חשיבותו של הזן ST52 בישראל [14]. זן זה, המאופיין בעמידות מלאה למקרולידיים וטטרציקלינים אך רגישות לאנרופלוקסצין, הפך לדומיננטי ברפתות החלב (הנתון נכון לסוף שנת 2017; לא קיימת תמנה סיווגית עכשווית של בידודי *M. tuberculosis*). הדמיון הגנטי בין תבדידי עטין בישראל לזנים מאוסטרליה וסין מצביע על "נתיב כניסה" אפשרי לגנוטיפים חדשים [5], אשר עשויים לעבור התאמה מקומית ולרכוש עמידות נוספת או להגיע כעמידים.

לסיכום, ממצאי המחקר הנוכחי מצביעים על מגמת עלייה בעמידות לאנטיביוטיקה בקרב תבדידי מ. בוביס. מגמה זו תואמת בחלקה את הדיווחים בעולם, אך משקפת גם מאפיינים מקומיים ייחודיים. כך, בישראל נצפו שיעורי רגישות יציבים ל-tiamulin. בדומה למגמה העולמית, לצד שיעורי עמידות גבוהים במיוחד לפלואורוקווינולונים ולטטרציקלינים בהשוואה למדינות מערב אירופה. העלייה בשיעור MDR מ-6.3% בשנים 1994–2016 ל-43% בשנים 2017–2025 משקפת שחיקה מואצת ביעילות הטיפולים הקיימים. ממצא זה עולה בקנה אחד עם מחקרים ארוכי טווח מצרפת, שבהם תוארה ירידה הדרגתית ברגישות לאנטיביוטיקה לאורך כ-30 שנה [11]. השונות הגיאוגרפית בדפוסי העמידות לחומרים אנטימיקרוביאליים שונים מדגישה את הצורך בהתאמת פרוטוקולי הטיפול לרמה המקומית ובהסתמכות על בדיקות רגישות עדכניות. נוסף על כך, העלייה החדה בשיעורי העמידות הרב-תרופתית של מ. בוביס מדגישה את הצורך הדחוף בפיתוח גישות טיפול חדשניות, כגון איתור ופיתוח של antimicrobial peptides או חומרים פעילים אחרים, וכן בפיתוח וביישום חיסונים יעילים. לבסוף, היעדר MIC breakpoints מוסדרות עבור מ. בוביס על ידי גופים בין-לאומיים כגון CLSI ו-EUCAST ממשיך להוות מגבלה משמעותית בפרשנות תוצאות המעבדה. במחקר זה נעשה שימוש בערכי ECOFF משוערים, אשר אפשרו סיווג יעיל של אוכלוסיות החידק, אך הממצאים מדגישים את הצורך הדחוף בסטנדרטיזציה בין-לאומית של בדיקות הרגישות.

References:

- .1 Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED: ***Mycoplasma bovis* infections in cattle.** *J Vet Intern Med* 2011, **25**(4):772-783.
- .2 Lysnyansky I, Ayling RD: ***Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility.** *Front Microbiol* 2016, **7**:595.
- .3 Gautier-Bouchardon AV: **Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp.** In: *Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals*. Edited by Schwarz S, Cavaco L, Shen J. Washington, DC :ASM Press; 2018: 425-446.
- .4 Lerner U, Amram E, Ayling RD, Mikula I, Gerchman I, Harrus S, Teff D, Yogev D, Lysnyansky I: **Acquired resistance to the 16-membered macrolides tylosin and tilmicosin by *Mycoplasma bovis*.** *Vet Microbiol* 2014, **168**(2-4):365-371.
- .5 Yair Y, Borovok I, Mikula I, Falk R, Fox LK, Gophna U, Lysnyansky I: **Genomics-based epidemiology of bovine *Mycoplasma bovis* strains in Israel.** *BMC Genomics* 2020, **21**(1):70.
- .6 Sulyok KM, Kreizinger Z, Fekete L, Hrivnak V, Magyar T, Janosi S, Schweitzer N , Turcsanyi I, Makrai L, Erdelyi K *et al*: **Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe.** *BMC Vet Res* 2014, **10**(1):256.
- .7 Rosenbusch RF, Kinyon JM, Apley M, Funk ND, Smith SC, Hoffman LJ: **In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003.** *J Vet Diagn Invest* 2005, **17**:436-441.
- .8 Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Lysnyansky I: **In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle.** *Vet Microbiol* 2009, **137**:268-275.
- .9 Klein U, de Jong A, Youala M, El Garch F, Stevenin C, Moyaert H, Rose M, Catania S, Gyuranecz M, Pridmore A *et al*: **New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe.** *Vet Microbiol* 2019, **238**:108432.
- .10 Wu C, Sun X, Wu Y, Shu J, Shi Z, Gong F, Yao H, Pan Z: ***Mycoplasma bovis* isolates from Chinese dairy farms: Analysis of genomic features, antimicrobial resistance, and virulence-associated structural differences.** *Vet Microbiol* 2026, **315**:110925.
- .11 Gautier-Bouchardon AV, Ferre S, Le Grand D, Paoli A, Gay E, Poumarat F: **Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France.** *PLoS ONE* 2014, **9**(2):e87672.
- .12 Bokma J, Gille L, De Bleecker K, Callens J, Haesebrouck F, Pardon B, Boyen F: **Antimicrobial Susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal, dairy and beef herds.** *Antibiotics (Basel)* 2020.(12)9 ,
- .13 Klein U, de Jong A, Moyaert H, El Garch F, Leon R, Richard-Mazet A, Rose M, Maes D, Pridmore A, Thomson JR *et al*: **Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe.** *Vet Microbiol* 2017.204:188-193 ,
- .14 Lysnyansky I, Freed M, Rosales RS, Mikula I, Khateb N, Gerchman I, van Straten M, Levisohn S: **An overview of *Mycoplasma bovis* mastitis in Israel (2004-2014).** *Vet J* 2016, **207**:180-183.