

דו"ח סופי לתכנית מחקר – 705-0024

**זיהוי הוקטור של מחלה דימומית אפיזואטית**

מוגש להנהלת מועצת החלב ע"י

פרופ' אייל קלמנט ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, הפקולטה ע"ש סמית  
לחקלאות, מזון וסביבה, האוניברסיטה העברית

Eyal Klement

*Koret School of Veterinary Medicine, Robert Smith Faculty  
of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Hebrew  
University. P.O.B. 12, Rehovot 76100, Israel.*

*E-mail: [klement@agri.huji.ac.il](mailto:klement@agri.huji.ac.il)*



הממצאים במחקר זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר: \_\_\_\_\_

## תקציר:

**רקע:** בשלהי אוגוסט 2006 ארעה התפרצות של מחלה דימומית אפיזוואוטית הנגרמת ע"י נגיף ה- EHDV (Epizootic hemorrhagic disease virus) במשקי בקר לחלב ולבשר בישראל. נגיף ה- EHDV שגרם להתפרצות נמצא מאוחר יותר כקרוב ביותר ל- EHDV-7 שבודד לפני 30 שנה באוסטרליה. המחלה אשר התפשטה בכל אזור עמק הירדן וצפון מדינת ישראל פגעה בעשרות משקים וגרמה לנזקים כלכליים הנאמדים במעל 2 מיליון דולר, בעיקר עקב ירידה בחלב ועקב תמותה. אחת השאלות החשובות ביותר בנוגע לנגיף זה קשורה לזהות הווקטור המעביר אותו. למרות שהחשוד העיקרי בהעברתו הוא היבחוש *Culicoides imicola* עדיין לא הוכח באם הוא האחראי להפצת הנגיף בישראל. במחקר המוצע ברצוננו לבדוק זאת.

**מטרה:** זיהוי הווקטור של EHDV בישראל.

**חשיבות המחקר:** התפרצות EHDV שארעה ב- 2006 הסבה נזקים עצומים למשק הבקר לחלב בישראל. לא ברור אם המחלה נותרה אנזואוטית בישראל אולם ברור כי בכדי למנוע אותה בעתיד יש לדעת מיהו הווקטור של הנגיף הגורם לה.

**תכנית עבודה:** המחקר חולק ל- 2 שלבים; בשלב ראשון הועמדו מערכות להחזקת יבחושים במעבדה ולהאכלתם. בשלב שני, בוצעו ניסויי הדבקה של מיני היבחושים השונים הניזונים על בקר לבחינת יכולתם להידבק בנגיף ע"י האכלתם על תערובת דם – נגיף ובדיקתם בפרקי זמן קצובים.

**תוצאות:** הוקמה מערכת להאכלת יבחושים. בוצעו מספר האכלות באמצעות המערכת, במהלכן נמדד זמן ההשרדות של היבחושים ואחוזי אכילה. המערכת הבנויה על פדים ספוגים בדם הוכחה כמערכת היעילה ביותר להאכלת יבחושים. מעל 40% מהיבחושות מן המין *C. oxystoma* ומעל 50% מהיבחושות מהמין *C. imicola* אכלו ארוחת דם. אחוז ההשרדות שנמדד במין הראשון הגיע ל- 40% ואילו *C. imicola* שרדו בשיעור של 15% בלבד. שליש מן היבחושים מן המין *C. oxystoma* נמצאו חיוביים לנגיף ועורר אפקט ציטופאטי. כמות יבחושי *C. imicola* ששרדו עד זמן זה היה קטן מדי מכדי לקבוע אחוז הדבקה.

**מסקנה:** הוקמה מערכת להאכלת יבחושים. באמצעות מערכת זו הדגמנו כי *C. oxystoma* הינו וקטור פוטנציאלי של הנגיף. גם *C. imicola* הדגים הדבקה בשלבים מאוחרים לאחר האכלה בדם נגוע אך יחד עם זאת קשה לקבוע מסקנות ברורות לגבי יכולתו להעביר את הנגיף בגלל מיעוט יבחושים ששרד את זמן הדגירה.

## **Abstract**

**Background:** On August 2006 an outbreak caused by epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV) occurred in dairy cattle herds in Israel. Later-on the virus which caused this outbreak was identified as belonging to the EHDV-7 serotype with genetic similarity to a virus which was isolated 30 years ago in Australia. The virus was spread along the Jordan valley and the north of Israel caused estimated losses of 2 millions \$US. One of the most important questions regarding this virus is related to the identity of its transmitting vector. Although the main suspect for its transmission is the midge *Culicoides imicola* it still was not proved as the main vector of EHDV in Israel.

**Aim:** Identification of potential vectors of EHDV in Israel.

**Study significance:** The outbreak which occurred during 2006 caused significant economical losses to the dairy cattle industry in Israel. It was not apparent if the virus is endemic in Israel. However, it is obvious that in order to prevent the virus from spreading in Israel, it was necessary to understand by which vector this virus is transmitted.

**Study plan:** The study was divided to two stages. The first stage was aimed to establish important systems for feeding *Culicoides* with EHDV and for identifying the virus in the *Culicoides*. In the next stage we aimed to test the ability of the virus to infect various *Culicoides spp.* by feeding them with blood infected by the virus.

**Results:** A system for feeding trapped *Culicoides* was established after several trials in which the percentage of fed *Culicoides* and the survival of fed *Culicoides* were measured. The system which showed the best feeding percentage was based on simple feeding the *Culicoides* with pads impregnated with fresh cattle blood. More than 40% and 50% of *C. oxystoma* and *C. imicola*, respectively were successfully fed using this system. Survival up to 16 days post feeding was 40% in *C. oxystoma* but only 15% in *C. imicola*. One third of *C. oxystoma* fed with infected blood showed infection by virus 16 days after feeding. With *C. imicola* the number of *Culicoides* survived was too small to determine if the virus survived this period.

**Conclusions:** A system for feeding *Culicoides* and maintaining them was established. Using this system we showed that *C. oxystoma* is a potential vector for the virus. Infection at this time period post feeding was also observed in *C. imicola* though the number of surviving *Culicoides* was too small to draw definitive conclusions.

## מבוא ותאור הבעיה :

הנגיף הגורם למחלה דימומית אפיוזאוטית (Epizootic Hemorrhagic Disease Virus) הוא בעל RNA דו-גדילי ושייך לגנוס *Orbivirus* ולמשפחת ה-*Reoviridae*. הנגיף הינו קרוב משפחה של נגיף כחול הלשון (Blue-tongue virus – BTV) (Maclachlan and Osburn 2004) וידוע בעיקר כגורם מחלה באייל לבן זנב בצפון אמריקה (*White tailed Deer – Odocoileus virginianus*) (Howerth, Greene et al. 1988). יחד עם זאת, מבין 10 הסרוטיפים הידועים, ידוע אחד כגורם למחלה קשה בבקר (Uren 1999; Bowen 1987; Aradaib, Sawyer et al. 1994; Abdy, Howerth et al. 1986). סרוטיפ זה מכונה Ibaraki virus והוא דומה לסרוטיפ 2 שמקורו באוסטרליה (Iwata, Manabe et al. 2001). כמו כן, ב-2006 תוארו התפרצויות במרוקו ובאלג'יר מנגיף שזוהה מאוחר יותר כשייך לסרוטיפ 318 (PROMED archive numbers 20061010.2906, 20061214.3513) וכן, ב-2007 ארעה התפרצות בתורכיה (PROMED archive number 20080522.1693) אשר מקורה ככל הנראה בסרוטיפ 6 (מידע פנימי).

בשלהי אוגוסט 2006 ארעה התפרצות של נגיף ה- EHDV במשקי בקר לחלב ולבשר בישראל (Yadin, Brenner et al. 2008). נגיף ה- EHDV שבודד נמצא מאוחר יותר כקרוב ביותר ל- EHDV-7 שבודד לפני 30 שנה באוסטרליה. המחלה פגעה תחילה במשקי עמק הירדן והתפשטה צפונה עד גבול לבנון ומערבה עד לאזור מישור החוף. דיווחים קליניים התקבלו מ-83 עדרי בקר לחלב ו-22 עדרי בקר לבשר בעוד דיווחים מצאן לא התקבלו. מספר המקרים הקליניים בעדר נע בין פרטים בודדים ועד למאות. הדיווח הראשון על המחלה התקבל ב-28/8/06, והדיווח האחרון הגיע ב-17/11/06. משך ההתפרצות בכלל מדינת ישראל הוגדר כ-2.5 חודשים. במהלך ההתפרצות נדגמו כ-60 משקים חולים ו-80 משקים בהם לא דווח על המחלה. דוגמאות הנסיוב נבדקו להמצאות נוגדנים (הוקמה מערכת ELISA תחרותית מונוקלונלית) ל- EHDV ו- BTV. באזורים גיאוגרפים שונים נמצאה רמת חשיפה שונה ל- EHDV אשר נעה בין 0% ל-100%. כן נמצא קשר בין רמת החשיפה לשני הנגיפים, דבר המצביע אולי על וקטור משותף. הממצא הקליני הבולט ביותר, שנצפה היה ירידה חדה בתנובת החלב, אשר נמשכה כ-4 שבועות רצופים וגרמה לנזקים כלכליים כבדים למשק החלב הישראלי. מניתוח ראשוני של נתוני החלב נמצא הפסד ממוצע של כ-420 ק"ג חלב לפרה חולה, נזק המתבטא גם לאחר העלמות המחלה מהמשק. התמותה כתוצאה מהמחלה הייתה נמוכה; במשק קיבוצי ממוצע המונה כ-300 חולבות הוצאו או נשחטו בממוצע כ-7 פרות/מבכירות ועגלה אחת עקב סימני מחלה הקשורים ב- EHDV. נזקי ההתפרצות מוערכים עם כן במיליוני דולרים.

מעל 1400 מינים של *Culicoides* זוהו ברחבי העולם, אולם רק חלק קטן מהם מהווים וקטורים פוטנציאליים של נגיפים (Mellor, Boorman et al. 2000). Du-Toit היה הראשון שהדגים כי *Culicoides imicola* הוא הנשא של BTV (Du Toit 1944). לאחר מכן נמצא כי יבחוש זה הוא גם הוקטור של כחול הלשון במספר אזורים באפריקה (Walker and Davies 1971; Mellor, Osborne et al. 2004; Mellor, Jennings et al. 1985; al. 1984; Meiswinkel, Venter et al. 2004) ובישראל (Boorman 1986) ובישראל (Braverman, Rubina et al. 1981). התפשטות נגיף כחול הלשון לצפון אירופה, למקומות בהם *C. imicola* אינו מצוי הביאו למציאתם של וקטורים נוספים; *C. obsoletus*,

Savini, Goffredo et al. 2005; Mehlhorn, Walldorf et al. 2007; ) *C. dewulfi* ו-*C. scoticus* (Mohammed and *C. schultzei* מ-EHDV-4 בסודן בודד 2008). (Saegerman, Berkvens et al. Mellor 1990 ובמחקר הגדול ביותר שבוצע עד כה עם נגיף זה נמצא כי מספר מיני *Culicoides* ובעיקר *C. imicola* ו-*C. bolitinos* הם בעלי יכולת העברה של 8 סרוטיפים שונים של EHDV (Paweska, Venter et al. 2005). הנגיף שבודד בישראל מהווה ככל הנראה זן חדש למרות דמיונו ל-EHDV-7. זאת נלמד מיכולתו לגרום למחלה בפרות. **כיום עדיין לא ברור מיהו הוקטור של נגיף זה בישראל.** ממצאי המחקרים הקודמים מצביעים על מספר יבחושים כנשאים פוטנציאליים של הנגיף כאשר *C. imicola* מהווה את החשוד העיקרי, אולם *C. obsoletus* ו-*C. schultzeigp* המצויים בארץ וכן *C. newsteadi* (מין נפוץ בישראל), חשודים גם הם כנשאים. מטרתו של מחקר זה היא לנסות ולזהות את הוקטורים הפוטנציאליים של הנגיף בישראל

## **מטרות המחקר:**

### מטרה מרכזית:

זיהוי הוקטור של EHDV בישראל.

### מטרות ספציפיות:

מטרה I: הקמת מערכות להפעלת המחקר - בשלב ראשון תועמדה המערכות החשובות לביצוע; תבוצענה לכידות יבחושים בשדה וימצאו התנאים האופטימליים לגידולם, תוקם מערכת האכלה מלאכותית וכן תוקם מערכת RT-PCR לזיהוי הנגיף ובידוד הנגיף מיבחושים.

מטרה II: ביצוע סריקה של היבחושים השונים לבחינת יכולת העברת הנגיף באמצעות האכלתם על דם אליו יוכנס הנגיף ובדיקתם כל 4 ימים. לאחר מכן, על אותם יבחושים אשר יזוהו כוקטורים פוטנציאליים תבוצענה ניסיונות הדבקה והדגמת הנגיף בבלוטות הרוק באמצעות בידוד נגיף ו-RT-qPCR. כל שלב מתוכנן להתבצע במשך פרק זמן של שנה כך שמשך התכנית הכולל הוא שנתיים.

### השערת המחקר:

אנו משערים כי נגיף ה-EHDV מועבר על-ידי מין היבחוש *C. imicola*, כלומר, היבחוש רוכש את הנגיף בארוחת דם, הנגיף עובר את מעטפת המעי של היבחוש, מתרבה ומגיע בסופו של דבר לבלוטות הרוק שלו.

### חשיבות המחקר:

התפרצות EHDV שארעה ב-2006 הסבה נזקים עצומים למשק הבקר לחלב בישראל. לא ברור אם המחלה נותרה אנזואוטית בישראל אולם בכדי למנוע אותה בעתיד יש לקבוע מיהו הוקטור של הנגיף הגורם לה. מטרת המחקר הנ"ל היא כאמור לזהות את הוקטורים הפוטנציאליים של הנגיף.

## פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו במהלך המחקר ותוצאותיהם:

### א. הקמת מערכת RT-PCR -

הוקמה מערכת RT-PCR מדם וחרקים G על פי פרוטוקול המפורט במאמר (Aradaib et al., 1998) הרעיון בקצרה מבוסס על ביטוי מקטע (בגודל ~ 500Kbp) של החלבון הלא מבני השלישי (NS3), מקטע שמור ולא ספציפי לזן הנגיף. הפריימרים ל EHDV על פי המאמר הם:

P1 (233-256) 5'-GGTTGCTTATGCTTCGTATGCGGA-3'

P2 (735-758) 5'-CACGACATAGTGACCTTGGAGCTT-3'.

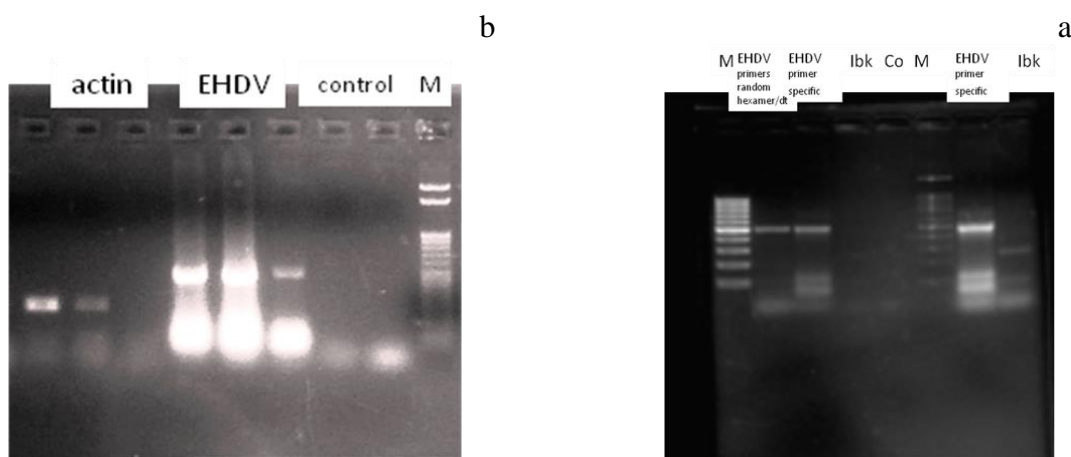
בתהליך דומה מתבצע ביטוי של חלק מגן נוסף,  $\beta$  Actin, חלבון שמור בחרקים אשר ביטוי המקטע הספציפי מהווה ביקורת להצלחת השיטה במיצוי חומצות גרעין (RNA) מהיבחושים. הפריימרים ל  $\beta$  Actin:

P1 523F 5'-CTA CGA GGG ATA CGC TCT GC-3'

P2 755R 5'-GCA GCT CGT ACG ATT TCT CC-3'

בעלי טמפרטורת Annealing (טמפרטורה אופטימלית להצמדות הפריימרים למקטע) של  $55^{\circ}$  צלסיוס, טמפרטורה הזוהה גם לפריימרים של EHDV, נתון המאפשר לבצע תהליך RT-PCR אחד ללא גרדיאנט לשני הפריימרים.

בתרשים 1 ניתן לראות שהמערכת מסוגלת לזהות נוכחות של נגיף EHDV (הזן הישראלי שהופק מתרביות תאים במעבדה) ונוכחות של RNA (בטא-אקטין – חלבון שמור בחרקים) המופק מיבחושים אשר נשמרו באתנול 100%.



**תרשים 1:** תוצרי RT-PCR על גיל אגרוז 1.5%. תרשים a: מתאר תוצרי מקטע של EHDV segment 10 משני בידודים שונים: זן Ibaraki 2 (Ibk) ללא תוצרים ו EHDV) בידוד ישראלי עם תוצרים (~525kbp) אשר אומתו גם בריצוף. תרשים b: מתאר תוצרי מקטע של EHDV segment 10 מבידוד ישראלי (EHDV) ו תוצרי בטא אקטין (actin) של חרקים כביקורת להפקה של RNA מחרקים. התהליך התבצע בגרדיאנט טמפרטורות (טווח של 55-59 מעלות צלסיוס) על מנת לזהות את טמפרטורת ה Annealing (טמפרטורת חיבור הפריימרים) האופטימלית. ניתן לראות שבנד המוגבר ביותר התקבל בטמפרטורה של  $55^{\circ}$  גם בין תוצרי האקטין וגם בין תוצרי ה EHDV.

## ב. הקמת מערכת האכלת יבחושים -

היבחושים להאכלה נלקחו ממלכודות אור יונקות שהופעלו ליד אורווה במושב בית-אלעזרי מאמצע אוקטובר 2009 ועד אמצע נובמבר וכן ובתוך מבנה משותף של רפת ואורווה במושב כפר ורבורג. מספר היבחושים הממוצע למלכודת היה כ 300. שני המינים העיקריים שנלכדו היו *Culicoides schultzei* group ו *Culicoides imicola*, 70% ו 29% בהתאמה. 95% מהיבחושים שנלכדו היו נקבות. שלוש שיטות האכלה שונות נוסו כאשר שיטת הפד הדנטאלי (שיטת ברורמן) הספוג בדם (תרשים 2) הייתה היעילה מכולן. שיעור האכילה בשיטת הפד הספוג בדם הייתה בין 2%-15% (כ 3/300, 32/400, 15/150, 52/360). שיעורי האכילה במערכות האחרות (מערכת האמבט הסגורה ושיטת ונטר) היו פחות מ-1%. ככל שריכוז הסוכרוז אשר הוסף לדם (כמעודד לארוחת דם) היה גבוה יותר שיעורי האכילה היה גבוהים יותר, ריכוזי סוכרוז של 2%, 10% ו 20% הניבו בממוצע שיעורי אכילה של 2%, 8% ו 15% בהתאמה. שיעורי אכילה של *Culicoides schultzei* group היו גבוהים יותר משל *Culicoides imicola* זאת מכיוון *Culicoides schultzei* group ואילו *Culicoides schultzei* group שניזון מאזור הבטן מוצץ דם כלפי מעלה, כיוונו של הפד הדנטאלי במערכת. לא נמצאו הבדלים בשיעורי האכילה בין משך אכילה של שעתיים לעומת משך אכילה של שלוש שעות. מעל ל 90% שרדו את ההרדמה לצורך מיון שנעשתה מיד לאחר האכילה. האכלה של דם ונגיף ביחס של 1:2 נתנה שיעורי אכילה דומים לאלו שהתקבלו ללא נגיף, 16% (3/18). כלוב המכיל 54 יבחושים (משני המינים הנ"ל) רוויים בדם ללא נגיף הונח בחדר ללא בקרה לטמפרטורה, לחות ואור. התבצע מעקב יומיומי אחר היבחושים בכלוב (ללא הרדמה נוספת) שכלל החלפת צמר הגפן הרווי במים וסוכר (10% סוכרוז). נמצא שמעל 90% מהיבחושים שרדו תקופת אינקובציה של 10 ימים.



**תרשים 9.** שיטת הפד הדנטאלי הספוג. היבחושים מצויים בכלובי האכלה העשויים חומר אורגני (קני סוכר) ומכוסים ברשת ניילון (גרם ניילון). על גבי הרשת מונחים 2 פדים ספוגים ב 4-5 מיליליטר דם פרה רווי בנגיף (מתרבית תאים) ביחס של 1:1, מחומם לטמפרטורה של 39° צלזיוס וצמר גפן נוסף ספוג במים. היבחושים מואכלים למשך של 2-3 שעות.

**הדבקה *Culicoides oxystoma* ו-*Culicoides imicola* בנגיף EHDV –**

חרקים מלכידות שדה הואכלו בדם פרה רווי בנגיף ועם תוספת סוכרוז: 0.2 גרם סוכרוז ו-0.25 מ"ל תרחיף נגיף לכל מ"ל דם. כל האכלה נמשכה שעתיים, ובתום ההאכלה בוצע מיון על-מנת לבדוד את היבחושות רוויות הדם. הוגדרו 4 קבוצות זמן של יום עיבוד יבחושות לאחר האכלה: יום 0, יום 3-4, יום 10-11 ויום 15-16. היבחושות רוויות הדם גודלו עד ליום העיבוד, פרט לקבוצת יום 0. יבחושות רוויות דם עובדו, כל יבחושה בנפרד, לפי 4 קבוצות הזמן: כל יבחושה הועברה למדיום העברת נגיף, נכתשה, והתרחיף סורכו.

לצורך בידוד הנגיף, כל תרחיף (200 מיקרוליטר) הועבר לבארית בפלטת 24-באריות המכילה תרחיף של תאי BHK והפלטה הודגרה בטמפרטורה של 37°C. לאחר הגעה ל-100% קונפלואנטיות, מדיום הגידול והתאים מכל בארית הועברו לבארית גדולה יותר בפלטת 6-באריות בתוספת 2 מ"ל מדיום גידול. לאחר הגעת באריות אלו ל-100% קונפלואנטיות, מדיום (200 מיקרוליטר) מכל בארית הועבר לבארית בפלטת 24-באריות המכילה תרחיף תאי CPAE. הפלטות הודגרו בטמפרטורה של 37°C ונוטרו על בסיס יומי, לאיתור אפקט ציטופאתי.

תוצאות ראשוניות:

**טבלה 1:** תוצאות מבחני האכלה – אחוזי יבחושות רוויות דם, מספר היבחושות שעובדו ביום 0, אחוזי היבחושות ששרדו עד ליום העיבוד.

% יבחושות ששרדו עד יום העיבוד (מס' שורדות/סה"כ)*		יום העיבוד לאחר האכלה	מספר יבחושות שעובדו ביום 0		% יבחושות רוויות דם (מס' רוויות דם/סה"כ)		מספר המבחן
<i>C.imicola</i>	<i>C.oxystoma</i>		<i>C.imicola</i>	<i>C.oxystoma</i>	<i>C.imicola</i>	<i>C.oxystoma</i>	
100 (1/1)	41 (9/22)	16	3	3	66 (4/6)	42 (25/59)	1
16 (1/6)	15 (7/46)	16	3	2	45 (9/20)	27 (48/130)	2
100 (2/2)	77 (17/22)	11	-	-	100 (2/2)	59 (22/37)	3
16 (1/6)	51 (23/45)	3	5	11	46 (11/24)	40 (56/139)	4

\* כולל יבחושות אשר לא התאוששו מההרדמה שבוצעה לאחר ההאכלה לצורך מיון היבחושות.



CPAE חיוביים לאפקט ציטופאתי (מס'חיוביים/סה"כ)		יום העיבוד לאחר האכלה
<i>C.imicola</i>	<i>C.oxystoma</i>	
63 (7/11)	71 (15/21)	0
100 (1/1)	43 (10/23)	3
100 (2/2)	24 (4/17)	11
50 (1/2)	38 (6/16)	16

### דינו:

התפרצות של נגיף ה-EHDV שארעה באוגוסט 2006 במשקי בקר לחלב ולבשר בישראל גרמה לנזקים כלכליים משמעותיים, מה שעורר את הצורך להתחקות אחר דרך העברת הנגיף. הודגם כבר כי יבחושים הינם נשאים פוטנציאלים של הנגיף, אולם כיום עדיין לא ידוע מיהו הוקטור הפוטנציאלי בישראל. החשוד העיקרי כוקטור פוטנציאלי של הנגיף הינו *C. imicola* אולם לא ניתן לפסול כחשודים מיני יבחושים נוספים המצויים בישראל.

מטרת המחקר הינה לנסות ולזהות את הוקטורים הפוטנציאלים של הנגיף בישראל. לצורך כך, בוצעו לכידות שדה של יבחושים וניסיונות הדבקותם על-ידי האכלות בדם פרה רווי בנגיף. אז, יבחושות רוויות דם גודלו לפרקי זמן אשר נקבעו מראש, עובדו לקבלת תרחיף נגיף חופשי, והתרחיף שימש להדבקת תרביות תאים. התאים המודבקים הודגרו ונוטרו אחר הופעת אפקט ציטופאתי.

לכידות השדה כללו יבחושים מהמינים *C. oxystoma* ו-*C. imicola* (מין הנכלל ב-*C. schultzeigp*), כאשר המין העיקרי שנלכד היה *C. oxystoma*. עבור כל לכידה בוצעה האכלה בדם פרה רווי בנגיף ובתום ההאכלה בוצע מיון להפרדת יבחושות רוויות דם והמשך גידולן. התוצאות הראשוניות מדגימות אחוז אכילה ממוצע של 53%, אחוז גבוה בהסתמך על נתונים מעבודות קודמות ועל האכלות שהתבצעו על-ידינו עם דם נקי. גידול היבחושות בתנאי מעבדה הינו אתגר מורכב, הדורש כיול דקדקני של מערכת הגידול ומעקב הדוק אחר שמירת תנאי המערכת. כיול המערכת התבסס על מידע מהספרות המקצועית ועל הניסיון שלנו במהלך שנות המחקר. תנאי הגידול הטובים ביותר אליהם הצלחנו להגיע בשלב זה הניבו אחוז שרידות לא גבוה, שבגידולים רבים היה נמוך מ-50%, כאשר אחוז השרידות ירד עם משך הגידול. עם זאת, מתוך סך כל הגידולים שבוצעו (הנתונים המוצגים הינם מדגם ראשוני) הצלחנו להשיג מספר יבחושות ששרדו עד לעיבוד, אשר יעמוד בדרישות הסטטיסטיות בנוגע להצלחת ההדבקה.

לאחר הגידול היבחושות עובדו לצורך קבלת תרחיף המכיל נגיף חופשי. תרחיפים אלו שימשו לניסיון הדבקה תאי CPAE, כאשר המטרה הייתה קבלת אפקט ציטופאתי. ידוע כי על מנת שהנגיף יוכל להדביק ולגרום לתמותת התאים, עליו להיות חי בזמן ההדבקה. הנחת היסוד שלנו היא כי במידה ויתקבל אפקט ציטופאתי, נוכל להניח בסבירות גבוהה כי לא רק שהיבחושות הודבקו בנגיף, אלא כי הנגיף שרד בהן עד למועד העיבוד. תאים אשר הודבקו עם תרחיף שהופק מיבחושות ביום ההאכלה (יום 0) הדגימו אחוז גבוה של באריות תאים החיוביות לאפקט ציטופאתי (68%), מה שתומך בהצלחת הדבקה היבחושות בנגיף, אולם לא הושגה הדבקה של 100%. אחוז הבאריות בהן נראה אפקט ציטופאתי היה נמוך יותר

כאשר הודבקו בתרחיף שהופק מיבחושות שגודלו לאחר ההאכלה, ועמד על 45%, 32% ו-38% (יבחושות מימים 3, 11 ו-16 אחרי האכלה, בהתאמה). למרות הירידה באחוז האפקט הציטופאתי, הוא עדיין הוא אינו מבוטל. ישנה האפשרות כי בחלק מהיבחושות שהודבקו ושרדו עד ליום העיבוד קיימת השפעה של ריכוז הנגיף בו הודבקו על יכולתו לשרוד ואף להתרבות בהן. בהמשך ביצענו הדבקות עם ריכוזי נגיף גבוהים יותר. הנתונים עדיין אינם זמינים, אולם אנו מקווים להדגים כי הדבקה בריכוז גבוה יותר תניב אחוז גבוה יותר של אפקט ציטופאתי.

השלב הבא בעבודתנו הינו זיהוי נוכחות של הנגיף במדיום הגידול של התאים המודבקים, ע"י RT-PCR. אנו מצפים כי דגימות מדיום גידול של תאים בהם חל אפקט ציטופאתי יהיו חיוביות לנוכחות הנגיף, בעוד שדגימות מדיום של תאים בהם לא חל אפקט ציטופאתי יהיו שליליות לנוכחות הנגיף. במידה והתוצאות יהיו כמצופה, אז נוכל להסיק כי בסבירות גבוהה התאים מתו בעקבות הדבקותם בנגיף חי. על בסיס זאת ניתן יהיה להניח כי היבחושות הודבקו ע"י הנגיף והנגיף שרד בהן את משך ההדגרה. בעבודה הנכחית הצלחנו לבנות מערכת הכוללת לכידות שדה של יבחושים מהמינים *C. oxystoma* ו-*C. imicola*, הדבקותם בנגיף ה-EHDV, וגידולם בתנאי מעבדה. בהסתמך על אחוז האפקט הציטופאתי שנראה לאחר הדבקות התאים עם תרחיף שהופק מיבחושות יום 0, ניתן להסיק כי שיטת הדבקות היבחושות בעלת יעילות גבוהה. ייתכן ובהדבקות הבאות בריכוזי וירוס גבוהים יותר יתקבלו אחוזי הדבקה גבוהים יותר. נתוני השרידות של היבחושות אמנם נמוכים, אך לאור הזמן והניסיונות הרבים שהוקדשו לכיול המערכת, ייתכן ולא ניתן להגיע להסתגלות מלאה של פרטי שדה לתנאי המעבדה. דרך עדיפה הייתה לבצע את המחקר עם אוכלוסיית מעבדה אשר עברה הסתגלות לתנאי המעבדה, אולם עד כה לא ידוע על הצלחת גידול מינים אלו כאוכלוסיות מעבדה. התוצאות הראשוניות מתרבויות התאים מחשידות כי הנגיף EHDV מדביק ושרוד ביבחושות מהמינים *C. oxystoma* ו-*C. imicola*. את האישוש אנו מצפים לקבל מתוצאות ה-RT-PCR שנבצע בהמשך. בהינתן ויתקבלו התוצאות להן אנו מצפים, נוכל לטעון כי היבחושות הודבקו בנגיף, הנגיף שרד בהן את תקופת ההדגרה, וכי ניתן לומר בסבירות גבוהה כי מדובר בוקטור הפוטנציאלי של נגיף ה-EHDV בישראל. לאור המספרים הנמוכים של *C. imicola* אשר נלכדו, יתכן ולא יתאפשר לנו להסיק מסקנות בעלות תוקף סטטיסטי לגבי מין זה. מנגד, מספר הפרטים שנלכדו מהמין *C. oxystoma* מאפשר הסקת מסקנות בעלות תוקף סטטיסטי לגבי המין. על-מנת לטעון כי אכן מדובר בוקטור, יש להדגים הדבקה של בקר ע"י יבחושים הנגועים בנגיף. שלב הכרחי טרם ביצוע מחקר שכזה הינו זיהוי הוקטור הפוטנציאלי של הנגיף, מטרה שאנו מקווים להשיג בעבודה הנכחית. מלבד קידום הידע אודות הוקטור הפוטנציאלי של נגיף ה-EHDV בישראל, במידה ויתקבלו תוצאות חיוביות לגבי *C. oxystoma*, הדבר יהיה הישג ראשון מסוגו בקנה מידה עולמי שכן עד כה לא ידוע על היות מין זה וקטור פוטנציאלי של EHDV.

- Abdy, M. J., E. E. Howerth, et al. (1999). "Experimental infection of calves with epizootic hemorrhagic disease virus." Am J Vet Res **60**(5): 621-6.
- Aradaib, I. E., M. M. Sawyer, et al. (1994). "Experimental epizootic hemorrhagic disease virus infection in calves: virologic and serologic studies." J Vet Diagn Invest **6**(4): 489-92.
- Boorman, J. (1986). "Presence of bluetongue virus vectors on Rhodes." Vet Rec **118**(1): 21.
- Bowen, R. A. (1987). "Serologic responses of calves to sequential infections with epizootic hemorrhagic disease virus serotypes." Am J Vet Res **48**(10): 1449-52.
- Braverman, Y., M. Rubina, et al. (1981). "Pathogens of veterinary importance Isolated from mosquitoes and biting midges in Israel." Insect science application **2**: 157-161.
- Du Toit, R. M" (1944) .The transmission of blue tongue and horse sickness by *Culicoides*." Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry **19**: 7-16.
- Howerth, E. W., C. E. Greene, et al. (1988). "Experimentally induced bluetongue virus infection in white-tailed deer: coagulation, clinical pathologic, and gross pathologic changes." Am J Vet Res **49**(11): 1906-13.
- Iwata, H., S. Manabe, et al. (2001). "The complete nucleotide sequences of L3 and S7 segments of Ibaraki virus encoding for the major inner capsid proteins, VP3 and VP7." J Vet Med Sci **63**(1): 73-8.
- Maclachlan, N. J. and B. I. Osburn (2004). Epizootic heamorrhagic disease of deer. Infectious Diseases of Livestock. J. A. W. Coetzer and R. C. Tustin. New-York, Oxford University Press. **2**: 1227-1230.
- Mehlhorn, H., V. Walldorf, et al. (2007). "First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe." Parasitol Res **101**(1): 219-28.
- Meiswinkel, R., G. J. Venter, et al. (2004). Epizootic heamorrhagic disease of deer. Infectious Diseases of Livestock. J. A. W. Coetzer and R. C. Tustin. New-York, Oxford University Press. **1**: 93-136.
- Mellor, P. S., J. Boorman, et al. (2000). "Culicoides biting midges: their role as arbovirus vectors." Annu Rev Entomol **45**: 307-40.
- Mellor, P .S., D. M. Jennings, et al. (1985). "Culicoides imicola: a bluetongue virus vector in Spain and Portugal." Vet Rec **116**(22): 589-90.
- Mellor, P. S., R. Osborne, et al. (1984). "Isolation of bluetongue and related viruses from *Culicoides* spp. in the Sudan ".J Hyg (Lond) **93**(3): 621-8.

- Mohammed, M. E. and P. S. Mellor (1990). "Further studies on bluetongue and bluetongue-related orbiviruses in the Sudan." Epidemiol Infect **105**(3): 619-32.
- Paweska, J. T., G. J. Venter, et al. (2005). "A comparison of the susceptibility of *Culicoides imicola* and *C. bolitinos* to oral infection with eight serotypes of epizootic haemorrhagic disease virus." Med Vet Entomol **19**(2): 200-7.
- Saegerman, C., D. Berkvens, et al. (2008). "Bluetongue epidemiology in the European Union." Emerg Infect Dis **14**(4): 539-44.
- Savini, G., M. Goffredo, et al. (2005). "Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: Ceratopogonidae) in Italy." Vet Rec **157**(5): 133-9.
- Uren, M. F. (1986). "Clinical and pathological responses of sheep and cattle to experimental infection with five different viruses of the epizootic hemorrhagic disease of deer serogroup." Aust Vet J **63**(6): 199-201.
- Walker, A. R. and F. G. Davies (1971). "A preliminary survey of the epidemiology of bluetongue in Kenya." J Hyg (Lond) **69**(1): 47-60.
- Yadin, H., J. Brenner, et al. (2008). "Epizootic haemorrhagic disease virus type 7 infection in cattle in Israel." Vet Rec **162**(2): 53-6.