

חקירת האפידמיולוגיה של קדחת קיקיונית בישראל – הצעה מחודשת

אייל קלמנט – ביה"ס לרפואה וטרינרית העוסק במחקר של נגיפי ארבו. דוא"ל –
eyal.klement@gmail.com
אורלי עזיז בוארון – ביה"ס לרפואה וטרינרית

תקציר:

רקע: קדחת קיקיונית (ק"ק) היא מחלה ייחודית לפרות ולבופאלו הנגרמת ע"י נגיף ממשפחת ה-*Rhabdoviridea*. ככל הנראה, הנגיף מועבר ע"י יתושים (*Culicidae*) או יבחושים (*Ceratopogonidae*), ולכן המחלה נפוצה בעיקר באזורים טרופים וסוב-טרופים באוסטרליה, אפריקה ואסיה, והתפרצויות שלה מתרחשות בעיקר בעונות החמות או עונות המעבר. המחלה היא בעלת מופע חריף וקצר ומתבטאת ב-2-3 גלי חום, בירידה חדה בתנובת חלב, בצליעה והליכה נוקשה ובמקרים רבים גם ברביצה. שיעורי התחלואה בעדר עלולים להיות גבוהים מאד (עד 80%) אולם שיעור התמותה הוא נמוך ולרוב אינו עולה על 1%-2%. בישראל אירעו מספר התפרצויות של ק"ק בין השנים 1990-1991, 1999-2001 וב-2004. כמו-כן, קיימת היארעות ספוראדית של המחלה במקומות שונים בארץ אך לא ברור מה היקפה.

מטרה: מטרת העבודה המוצעת היא לברר את האפידמיולוגיה של ק"ק בארץ ולאתר גורמי סיכון לנגיעות בנגיף במצב אנזואוטי ואפיזואוטי.

תיאור המחקר: בוצע סקר סרולוגי לחשיפה לנגיף הקדחת הקיקיונית. 1155 דגימות סרום אשר נאספו בין 2006 ו-2007 וכן 962 דגימות סרום מחיות בר נדקו בשיטת ניטרול הסרום (SN). בנוסף נאספו יבחושים ויתושים ליד מוקדי התפרצות ב-2008 וב-2009. כמו-כן נבדקה התגובה החיסונית וכן הבטיחות של תרכיב מומת אשר יוצר במכון הוטרינרי. לבסוף נבדקה מועילות תרכיב בעת התפרצות בתנאי שדה בשנת 2008.

תוצאות: כל העגלות אשר נבדקו נמצאו שליליות לנגיף. מספר מועט של פרות נמצאו חיוביות. כולן מאתרים שהיו נגועים בעת ההתפרצות של ק"ק ב-2004. מתוך חיות הבר שנבדקו נמצאו 4 ג'מוסים חיוביים לנגיף, 3 צבאים ו-2 יחמורים כחיוביים סרולוגית לנגיף. חיסון פעמיים בתרכיב הביא לפיתוח תגובה חיסוני תשהתבטאה בכייל ממוצע של 2^8 אשר ירד בהדרגה עד 2^4 בתוך 4 חודשים. החלשות התגובה החיסונית שנצפתה בפרות שחוסנו 3 ו-4 פעמים היתה איטית באופן מובהק מזו שנצפתה בחיות שחוסנו רק פעמיים. חקירת התפרצות ק"ק שארעה ב-2008 הראתה כי חיות שחוסנו לפחות 3 פעמים הראו הגנה של לפחות 50% לעומת פרות של חוסנו או פרות שחוסנו פעמיים. בנוסף הוקמה מערכת להאכלת יתושים וכן נלכדו יתושים ויבחושים ליד אתרים בהם ארעה התפרצות.

מסקנות: בעבודה זו נבדקו המאפיינים האפידמיולוגיים של תחלואה בקדחת קיקיונית. נמצא כי הנגיף אינו אנדמי בארץ בין התפרצויות בבקר או בחיות בר. תרכיב מומת אשר פותח במכון הוטרינרי נבדק ונמצא בטוח, אימונוגני ובעל יעילות של 50% לאחר 3 הזרקות. כן הוקמה מערכת להאכלת יתושות ונלכדו יתושות ויבחושות ליד אתרי התפרצות.

Abstract:

Background: Bovine ephemeral fever is a unique cattle and buffalo disease caused by a virus of the family *Rhabdoviridae*. The virus is transmitted by biting insects, probably *Culicoides* or mosquitoes. Therefore, the disease is mostly apparent in tropical and subtropical regions. The clinical signs of the disease include mostly prexia and sometimes recumbency. Importantly, the disease causes loss in milk production and may therefore cause significant economical losses. In Israel has occurred during 1990-1, 1999-2001, 2004 and the disease reappeared in 2008.

Aim: To determine the factors influencing the epidemiology of BEF in Israel and to identify the risk factors for infection by BEFv.

Study description: A serological assay was performed in order to identify the endemic exposure to BEFv. 1155 serum samples collected during 2006-2007 were tested during the suggested study. These samples were tested by the serum neutralisation assay. In addition, 962 samples of wild life were sampled as a part of this and an adjunct study. In addition, *Culicoides* and mosquitoes were captured near affected farms and tested for the presence of BEFv. Additionally, an inactivated vaccine tested in the veterinary institute was tested for safety and immunogenicity and for efficacy in farms that were affected during 2008.

Results: None of the calves tested in the sero-survey were positive for BEFv. Only a few cows were tested positive for BEF. All of them were bred in regions previously affected by BEF. Of the wild animals tested only gazelles, buffaloes and fallow deer were positive for BEFv antibodies indicating only low scale infection in these animals. The vaccine elicited titers of 2^8 of neutralising antibodies which declined 2^4 in 4 months. Waning in the antibody levels in cows vaccinated 3 and 4 times was slower than in cows that were vaccinated only twice. Outbreak investigation of the BEF outbreak which occurred in 2008 showed that the vaccine was 50% effective in preventing disease only if administered at least 3 times. Cows vaccinated only twice were not protected from morbidity. Additionally a system for feeding mosquitoes was developed in the lab and RT-PCR was developed in order to identify BEFv in the *Culicoides*.

Conclusions: The epidemiology of BEF was investigated in this study. It was found that BEFv is probably not endemic in cattle in Israel and not in wild animals. An inactivated vaccine developed in KVI was shown to have 50% effectiveness in preventing disease. A system for feeding mosquitoes was established.

1. רקע ומטרות המחקר

קדחת קקיונית (ק"ק) היא מחלה ייחודית לפרות ולבופאלו הנגרמת ע"י נגיף ממשפחת ה-*Rhabdoviridea*. מטרת העבודה שנערכה בשנתיים האחרונות ועסקה בנגיף זה, הייתה לברר את האפידמיולוגיה של ק"ק בארץ ולאתר גורמי סיכון לנגיעות בנגיף במצבים אנוזאוטיים ואפיוזאוטיים. היעדים הספציפיים היו לבדוק את שיעור החשיפה האנוזאוטית לנגיף בקרב בקר לחלב באזורים שונים בארץ, לזהות את מין הווקטור המעביר את המחלה, לאתר גורמי סיכון להדבקה במחלה ולהבין את התפשטותה.

בהתאם לתכנון המחקר בוצע בחלקו הראשון סקר סרולוגי לאיתור חשיפה אנוזאוטית לנגיף ולזיהוי גורמי הסיכון לנגיעות זו וכן בוצע סקר לבירור החשיפה בקרב חיות בר. בעקבות ההתפרצויות שחלו ב-2008 ו-2009 בוצע שוב דיגום של פרות ועגלות ברחבי הארץ וכן בוצעה לכידת יתושים. בימים אלו נבדקים הנסיונים שנאספו ב-2008 והחל מיון היתושים לקראת בדיקתם. בהצעה המקורית נכתב כי במידה ולא ימצאו אזורים נגועים ולא תתרחש התפרצות, השלבים הבאים של המחקר יעסקו בביצוע vector competence studies במעבדה לשם זיהוי של וקטורים פוטנציאליים, כאשר הווקטורים שייבדקו בתחילה יהיו *Culex pipiens* ו-*Culex perexiguus* וכן *Culicoides imicola*. אולם, בשל חשיבות הנושא החלנו בביצוע ניסויים אלו במקביל, למרות התרחשותה של ההתפרצות. לעת עתה הצלחנו להדגים את התרבות הנגיף ביתוש *Culex pipiens* ואנו בשלבי הדגמת הנגיף ביתוש זה בבלוטות הרוק בשיטות מתקדמות יותר. במקביל לזאת בוצע ניתוח מעמיק של יעילות התרכיב הניסיוני לקדחת קקיונית אשר הדגים את יעילותו החלקית במניעת המחלה והיווה נדבך חשוב בקבלת החלטות מעשיות עתידיות. חלק זה לא נכלל בתכנית המקורית אולם הסטודנטית שמומנה באמצעות התכנית חקרה נושא זה עקב הצורך שעלה מן השטח. **עולה אם כן, שלמרות התקדמותינו בכל יעדי המחקר עדיין קיים הצורך בעבודה נוספת על מנת להגשימם באופן מלא.** לצורך כך אנו מעוניינים להמשיך את המחקר ל-3 שנים נוספות.

מטרות המחקר ל-3 השנים הבאות:

1. זיהוי יכולת העברת הנגיף על-ידי היתוש *Culex perexiguus* (אוכלוסיית מעבדה) והיבחוש *Culicoides imicola* (לכידות מהשדה).
 2. זיהוי הנגיף ביבחושים ויתושים שנאספו ליד אתרי התפרצות ב-2008 ו-2009.
 3. אפיון גורמי סיכון לנגיעות במשקי בקר לחלב בישראל.
- בעבר טענו כי המחקר יאפשר שיפור רב בהבנת האפידמיולוגיה של המחלה בישראל ומציאת דרכים עתידיות להתמודדות עמה. ואכן תוצאות המחקר הקודם תרמו באופן משמעותי להבנת ומניעת המחלה, אולם הן מעלות שאלות נוספות החיוניות להתמודדות משמעותית יותר עם התפרצויות נגיף הקדחת הקקיונית. אנו מאמינים כי המשך של המחקר באופן רציף יתרום למציאת פתרונות למיגור המחלה ביעילות רבה יותר.

2. פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו בשנים 2008 - 2010 עפ"י מטרות המחקר המקורי

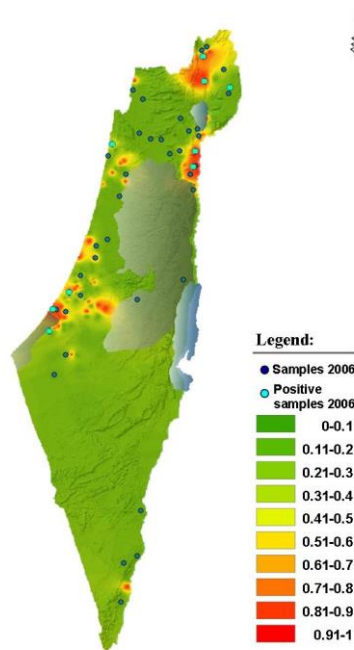
מטרה א': קביעת דינמיקת הופעת הנגיף בישראל – האם הנגיף אנוזאוטי בישראל?

א.1. זיהוי חשיפת עגלות ופרות לנגיף בין ההתפרצויות.

מטרתו של חלק זה במחקר הייתה לזהות חשיפה סרולוגית של עגלות ופרות לנגיף בתקופה בין ההתפרצויות בשנים 2006 ו-2007 (התפרצויות של המחלה ארעו בשנים 2004 ו-2008). הסקר כלל

1155 דוגמאות מבקר לחלב בשנים 2007 ו-2006. עגלות 2007 : 355 דוגמאות מ-43 ישובים, עגלות 2006 : 563 דוגמאות מ-135 ישובים, פרות 2006 : 237 דוגמאות מ-46 ישובים. לא נמצאו דגימות חיוביות בדוגמאות העגלות משנת 2006-2007. 11 דגימות פרות מ-2006 נמצאו חיוביות לנוגדני BCFV וניתוח גיאוגרפי הראה חפיפה בין המשקים החיוביים בסקר ובין משקים שנפגעו בהתפרצות 2004. בדיקת תאריכי הלידה של הפרות החיוביות העלתה כי גילן מתאים לחשיפה בהתפרצות 2004 והנוגדנים הינם ככל הנראה תוצר של חשיפה מוקדמת לנגיף. ניתן להסיק מהסקר כי בשנים שבין ההתפרצויות 2004-2007 לא היה הנגיף אנזאוטי בישראל.

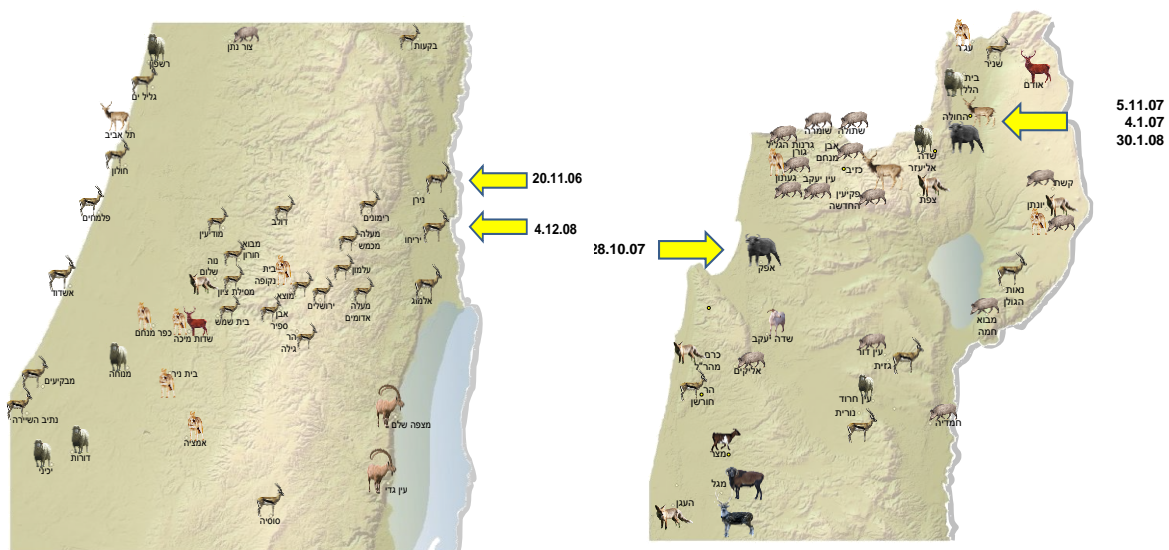
תרשים 1: מיקום הישובים החיוביים מדוגמאות פרות 2006 על רקע מפת התפרצות 2004. (צבע המפה מייצג סיכון להופעת מחלה קלינית ע"פ דיווחי ההתפרצות ב-2004.



א.2. זיהוי חשיפת מע"ג בר לק"ק.

מטרתו של חלק זה במחקר הייתה לזהות חשיפה שכ מעכי-גירה בר כנגיף הק"ק. הסקר ככל כ-962 דוגמאות שנאספו בעשר השנים האחרונות על ידי נציגי רשות הטבע והגנים. הדוגמאות נבדקו בשיטת סרום ניאטרליזציה (SN) לנוכחות נוגדנים.

תרשים 2: המיקום והמועד בו נאספו הדוגמאות החיוביות מחיות בר.



ניתן לראות כי כל הדוגמאות נדגמו בפרק הזמן שבין ההתפרצויות 2004-2009 ומאזורים בהם תועדה מחלה בעבר. באופן לא מפתיע נמצא שיעור גבוה של בופאלו חיוביים לנגיף (13.8%) אולם יחד עם זאת נמצאו גם צבאים (4.4%) וראמים חיוביים (0.7%). מאחר ורוב הדגימות בסקר נלקחו מבע"ח בוגרים יתכן והנוגדנים שנמצאו בדגימות הם תוצאה של חשיפה לנגיף בהתפרצויות עבר. לסיכום, מיקום הדוגמאות החיוביות ומספרן הנמוך מעיד כי חיות בר אינן מהוות מאגר לנגיף בין התפרצויות. לסיכום החלק הראשון, דומה כי קיימת חדירה מחודשת של הנגיף בכל אחת משנות ההתפרצות ונהיר כי הפרות עצמן ומע"ג בר ככל הנראה אינם מהווים מאגר שלו בתקופות שבין ההתפרצויות.

מטרה ב': זיהוי וקטורים פוטנציאליים של הנגיף

1.1. האכלת אוכלוסיות מעבדה של *C. pipiens*

מטרתו של שלב זה הייתה למצוא את התנאים המיטיביים להאכלה של יתושי *C. pipiens* בתערובת דם המכילה נגיף. המטרה היא למצוא את התנאים אשר יאפשרו אכילה באחוז גבוה על ידי היתושות מחד ומאידך יאפשרו את התפתחות הנגיף ביתושה. לשם כך נבנתה מערכת האכלה מלאכותית המאפשרת האכלת היתושות לפרק זמן ממושך תוך כדי שמירת טמפ. הדם המואכל (ראה תמונה).



תרשים 3: מערכת להאכלה מלאכותית של יתושות

- להלן תאור קצר של הניסויים שנעשו על מנת להגיע לפרוטוקול האכלה מיטבי:
1. השפעת מנח הקולונה (מעל או מתחת לכלוב). לצורך כך נערך ניסוי האכלה בשני כלים בתנאים שווים למעט מיקום הקולונה ביחס לכלי. כלי אחד הונח על גבי הקולונה (אכילה מלמטה). השני הונח על גבי שולחן העבודה והוצמדה קולונה הפוכה מעליו (אכילה מלמעלה). בדיקה זו העלתה כי ישנה עדיפות להאכלה מלמעלה 70% (18/26) לעומת 25% (6/24) ($p=0.002$).
 2. קביעת זמן האכלה. במערכות רבות בספרות מתואר זמן האכלה הנמשך כ-30 דק' ועד כ-6 שעי' מטעמי נוחות וגמישות נבדקה יכולת האכלה בפרק זמן של משך הלילה (over night), כ-16 שעי'. הבדיקה העלתה כי בפרק זמן ממושך של משך הלילה נשמרו תנאי המערכת והתאפשרה האכלה ארוכת זמן. כמו כן, האכלה למשך הלילה אפשרה קבלת אוכלוסייה הומוגנית גדולה של נקבות שניזונו באותם תנאים וארוחת דם.
 3. קביעת סוג הממברנה לניסויי האכלה. הניסויים הראשונים שביצענו התבססו על שימוש בממברנת עוף שעל פי הספרות נמצאה כמותאמת ביותר לצורך האכלת יתושים. אולם לשימוש בממברנה זו מגבלות הקשורות בצורך בתכנון מוקדם ובתחזוקה שוטפת של חיות וברמת ההדירות בין ניסויים. בנוסף, בספרות מתועדים גם ניסויי האכלה מלאכותית של יתושים אחרים מהסוג *Culex* בשימוש בפארפילם 'Parafilm' wax membrane. בפרק זה התבצעו שני ניסויים עיקריים:

3.1 ניסוי בו שימשה ממברנת פאראפילם ששופשה על שלו (*quail Coturnix coturnix*) בכדי לספוג את ריחו ואשר נמתחה על הקולונה כך שתהיה דקה יותר. בהמשך התבצע מעקב אחר היתושות שניזונו בכדי לקבוע האם אכילת ארוחת דם בצורה זו מובילה להטלת ביצים כמתרחש בטבע ומאפשרת משך חיים ארוך דיו לביצוע הניסויים המתוכננים בהמשך (כ-14 יום). הבדיקה העלתה כי 94% מהיתושות ניזונו מדם באופן מלא (Engorged) (214/227) בהאכלה בפאראפילם עם ריח שלו, וכי אכילה זו מובילה לשיעור הטלה דומה להאכלה ישירה על גבי חיית מעבדה.

3.2 ניסוי בו נבדקה אפשרות החלפת ריח השלו המשמש כגירוי, בנוכחות Adenosine triphosphate (ATP) המוכר כמעורר פאגוסטימולציה ביתושים. בניסוי התבצעה השוואה בין אכילה דרך ממברנת פאראפילם ללא תוספות, ממברנת פאראפילם עם ריח שלו וממברנת פאראפילם שכיסתה דם פרה בתוספת Adenosine triphosphate (ATP) בריכוז של 0.006M כמומלץ בספרות. **הטבלה הבאה** מסכמת את תוצאות הניסוי אשר הדגימו באופן מובהק כי ניתן לוותר על השריית גירוי שמקורו בחיה בעזרת נוכחות ATP בריכוז 0.006M.

קולונה	יתושות שניזונו	סך היתושות	אחוז אכילה	p-value בהשוואה לקבוצה 2
1. ריח שלו	30	48	63%	0.41
2. תוספת ATP	43	60	72%	-
3. בקורת ללא ריח שלו וללא ATP	23	52	44%	0.004

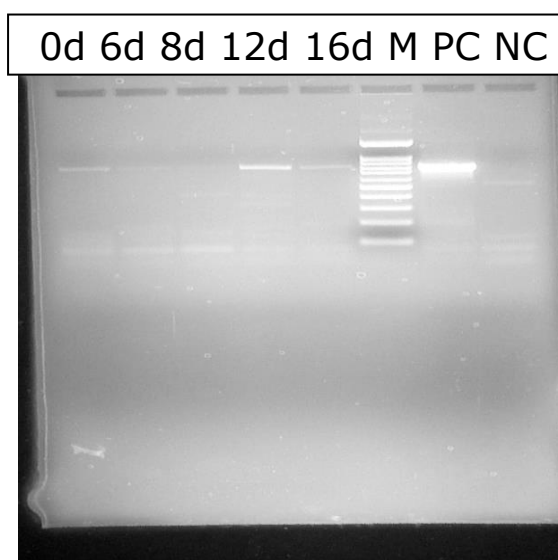
4. קביעת תנאי שימוש בדם נגוע לשם האכלת יתושות. על פי הספרות מומלץ להשתמש בנגיף שלא עבר תהליך של הקפאה והפשרה. בניסוי בו התבצעה ההאכלה במיהולי נגיף שונים נמצא כי ריכוז גבוה של נגיף (יחס 1:1) אינו מתאים לשימוש, הסיבה נעוצה קרוב לוודאי בנוכחות רבה של מרכיבים שאינם ממקור דם המשנים את הרכב הארוחה והגורמים המגרים לאכילה. מיהול עבודה של 1:10 נגיף לדם אפשר קיום מערכת ההאכלה טובה ללא דחייה. תוצאות אלו עלו בקנה אחד עם פרוטוקול מומלץ אשר התקבל באדיבותו של Michael.J.Turell מ USAMRIID (תכתובת אלקטרונית). **תרשים 5:** סיכום הניסויים בשלב ב.1 ואת תוצאותיהם.



2.2. הדגמת התפתחות הנגיף ביתושות לאחר זמני האכלה שונים

מטרתו של שלב זה היא להדגים את התפתחות הנגיף ביתושות שהואכלו בדם מודבק. לאחר התגבשות פרוטוקול ההאכלה התבצע ניסויי ההאכלה בהם הופרדו היתושות שניזונו מדם נגוע להמשך גידול בתנאי לחות טמפרטורה, חושך/אור מווסתים ונדגמו מדי מספר ימים. שתי יתושות שנדגמו בזמנים 0,6,8,12,16 ימים לאחר ההאכלה נכתשו ומהן הופק RNA כפי שתואר לעיל. תוצר ההפקה שימש לתגובת PCR לזיהוי הנגיף ביתושות אלו (תרשים 6):

תרשים 6: הדגמת הנגיף באמצעות PCR, ביתושות בימים 0 עד 16 לאחר ההאכלה



Primer 1: G Gene346F
Primer 2: G Gene1155R
Insert size 809bp
Days post infection

ניתן לראות תוצר בזמן 0 שכמעט ונעלם 6 ו- 8 ימים לאחר ההאכלה ובהמשך ביום 12 והלאה מופיע שוב. תוצאה זו מעידה על נוכחות נגיף וכפי הנראה גם עלייה בכמותו גם לאחר 16 יום מיום ההאכלה.

כאמור, המשך המחקר יכול להיות היתושות והוצאת בלוטות הרוק, שחלות ומעי והקמת מערכת להדגמת הנגיף באמצעות אימונופלוואורסנציה. בכך אנו עוסקים בימים אלו. בהצעה המתחדשת אנו מתכווני ליישם את המערכות הללו ולבצע בדיקות דומות בשני ווקטורים נוספים; היתוש *Culex*

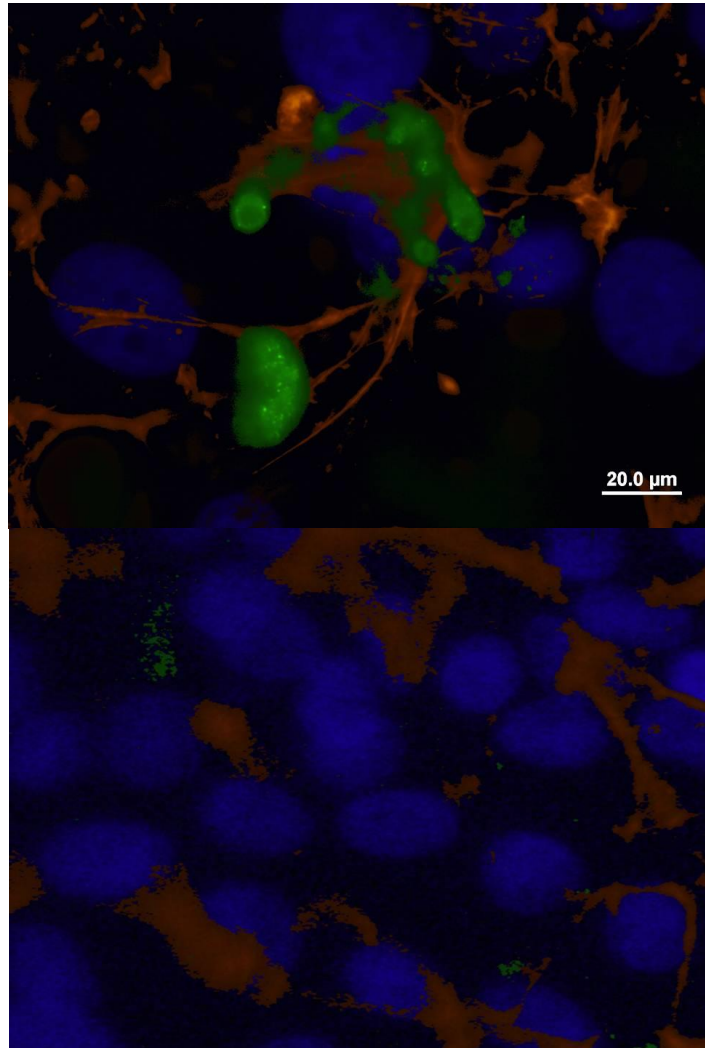
perexiguus (אוכלוסיית מעבדה) והיבחוש *Culicoides imicola* (לכידות מהשדה).

במקביל בוצעה העמדה של שיטת צביעה באמצעות אימונופלוואורסנציה. שיטה זו הועמדה בשלב ראשון על תרבית תאים מודבקים. תאי (Epithelial kidney cells, African green monkey), VERO באדיבות החטיבה לוירולוגיה, המכון הווטרנרי בית דגן הינם תאים רגישים לנגיף BEFV ובהדבקה מתקבל אפקט ציטופטי (CPE). כדי לבסס את שיטת הסימון בעזרת הנוגדנים שנבחרו נזרעו תאי VERO בפלטת 24 באריות על גבי דסקיות זכוכית עגולות. עם השלמת מרבד חד שכבתית (monolayer) של תאים הודבקה התרבית בנגיף שבודד מהתפרצות 2000 מהישוב יקום. בהופעת אפקט ציטופטי הופסקה ההדבקה על ידי הוצאת המדיום ושטיפה ב-PBS. תאי התרבית קובעו ב-4% PFA למשך חצי שעה ובהמשך נשטפו עם PBS שלוש פעמים למשך 10 דקות.

בשלב הבא נעשתה חסימה (blocking) בתמיסת 5% goat serum בתוספת 0.5% Saponin במשך שעה בטמפרטורת החדר. בהמשך הודגרו התאים למשך הלילה ב-4° C עם נוגדן ראשוני. לצורך זה שימש סרום שנאסף מפרות בוגרות לאחר הזרקה תרכיב ניסיוני מומת כנגד הנגיף BEF. הסרום נבדק לנוכחות נוגדנים רב-שבטים מנטרלים בשיטת הסרום נאוטרליזציה ונמהל למיהול עבודה 1:100. בתום ההדגרה נשטפו התאים עם PBS שלוש פעמים למשך 10 דקות.

בהמשך הודגרו התאים עם הנוגדן השניוני DyLight 488-conjugated AffiniPure Goat Anti-Bovine IgG מהול 1:500, למשך שעה וחצי בטמפרטורת חדר.

לאחר ההדגרה נשטפו התאים עם PBS שלוש פעמים למשך 10 דקות. בשלב הבא הודגרו התאים עם Phalloidin במיהול 1:750 ביחד עם DAPI במיהול 1:1000 למשך חצי שעה בטמפרטורת חדר. בתום שלב זה נשטפו התאים עם PBS שלוש פעמים למשך 10 דקות ובסיומם הוצאו הזכוכיות העגולות מהבאר והונחו בהיפוך על זכוכית נושאת בתוספת מדיום הדבקה מקבע (Mounting medium) וכוסו בזכוכית מכסה. לאחר התקשות למשך לילה ב-4° C נצפתה התרבית תחת מיקרוסקופ פלורסנטי. תרשים 7 מתאר את תוצאות הצביעה בתרבית מודבקה.



תרשים 7: A. תרבית תאי VERO מודבקת בנגיף BEFV. B. תרבית לא מודבקת - ירוק צביעה ספציפית לנגיף. אדום – צביעת Phalloidin לאקטין. כחול – צביעת DAPI לגרעיני התא.

3.2. הדגמת הנגיף במיני יתושים ויבחושים שונים לכידות מן השדה

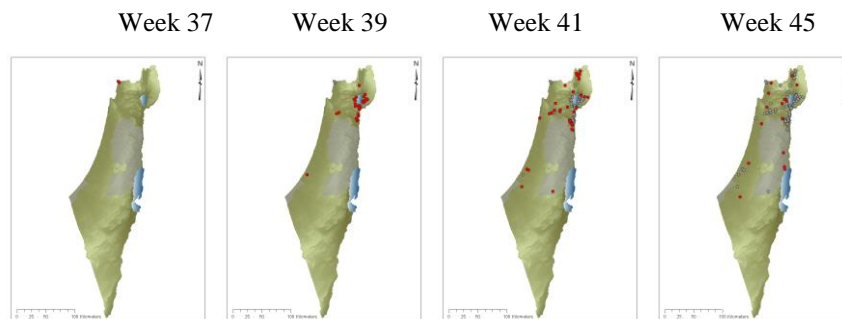
מטרת החלק הזה במחקר הינה לבחון את נוכחות הנגיף במעבירים פוטנציאליים אשר נלכדו בשדה ובכך להדגים חשיפה לנגיף בחרקים אלו. עד כה בוצעו לכידות של יתושים ויבחושים מן השדה ליד מספר ישובים שנפגעו בהתפרצויות. ב- 2008 בוצעו לכידות ליד משקי הבקר לחלב בנווה-אור, אשדות יעקב, עין הנציב וראש הניקרה. ב- 2009 בוצעו לכידות ליד משק הבקר לחלב בזיקים. היתושים והיבחושים שנלכדו עדיין לא נבדקו באמצעות PCR לנוכחות הנגיף. נרצה לבצע בדיקות אלו במהלך מחקר ההמשך המוצע.

מטרה ג': אפיון גורמי הסיכון לחשיפה לנגיף במשקי הבקר לחלב בישראל.

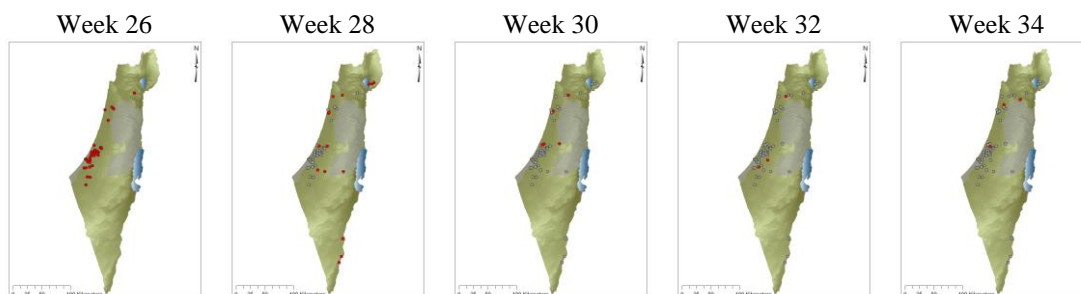
בשלב זה התמקדנו באיסוף המידע הקליני אודות ההתפרצויות, באיסוף דגימות נסיוב מפרות במשקים שדיווחו על תחלואה ובכאלו אשר לא דיווחו. מאמץ נוסף התמקד בהכנת השכבות הגיאוגרפיות ובהכנת מערכת לאחזור מידע לוויני על מנת לאפשר בניית מודל בשלב הבא.

1.1. איסוף הדגימות ותיאור ההתפרצות

לאחר התייעוד הקליני של ההתפרצויות ב- 2008 ו- 2009 נאספו דגימות נסיון ממשקים חולים ולא חולים. דינאמיקת ההתפשטות של המחלה הקלינית תועדה (תרשים 8).
תרשים 8: הודעה על סימנים קליניים אופייניים לק"ק בהתפרצויות ב- 2008 ו- 2009 (ע"פ שבוע בשנה):
2008



2009



ניתן לראות מן התרשים כי ההתפרצויות ב- 2008 מהוות כמעט תמונת ראי האחת של השנייה ושכלל ישובים אשר נפגעו ב- 2008 לא נפגעו ב- 2009. עם זאת הפגיעה ב- 2009 היתה קשה פחות והתבטאה בשיעור נמוך יותר של פרות שנפגעו בכל עדר. אנו מקוים כי באמצעות ניתוח גורמי הסיכון לתחלואה נוכל לאמוד את הסיבות לתופעה זו. נוסף על נתונים אלו נעשו מאמצים רבים, בתייעוד וניתוח יעילות החיסון אשר היה בשימוש בעת ההתפרצות ב- 2008 כפי שנתאר בהמשך.

2.2. איסוף שכבות גיאוגרפיות אקלימיות ויצירת שכבות המבוססות על מידע לוויני

במקביל לאיסוף הנסיובים נאספו וקובצו שכבות גיאוגרפיות לשם ניתוח עתידי באמצעו תכנת GIS. השכבות האקלימיות הקיימות בידינו מכילות מידע אודות מהירות רוח ממוצעת באזורים הנגועים, טמפרטורה מקסימלית ומינימלית חודשית ממוצעת, לחות יחסית חודשים ממוצעת וכמות גשמים ממוצעת. בנוסף יצרנו באמצעות שיתוף פעולה עם ד"ר איתמר לנסקי מן המחלקה לגיאוגרפיה באוניברסיטת בר-אילן שכבות מידע לוויני המכילות 10 פרמטרים מכל אחד מן הנתונים הבאים:

Normalized Difference Vegetation Index - NDVI – מדד המייצג את מצב הצמחיה

Day and night land-surface temperatures - LST (שכבות נפרדות ליום וללילה)

Middle infrared reflectance - MIR – מדד הנמצא בקורלציה ללחות הקרקע.

באמצעות אנליזת פורייה המאפשרת ניתוח מדדים אלו על ידי תיאור המחזוריות הגלית שלהם ב-3 רמות (הרמוניות) ניתן לתאר עבור כל מדד כזה 10 פרמטרים – אמפליטודה ופאזה של כל רמה (6 פרמטרים), מינימום, מקסימום, ממוצע וסטיית תקן. השכבות המתארות את כל הפרמטרים הללו נוצרו כאמור וכעת נותר עוד להעמיד את המודל המקשר בין הממצאים הקליניים והממצאים הסרולוגיים ובין נתוני האקלים הלוויין המתוארים.

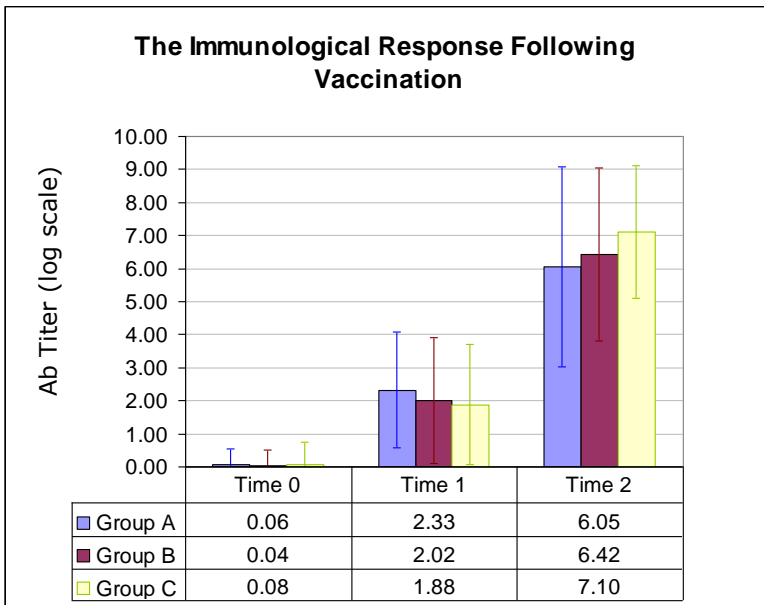
מטרה ד': בדיקת יעילות ניסיוני מומת למחלת הקדחת הקיקיונית*

כאמור, מטרה זו לא נכללה התוכנית המחקר המקורית אולם מאחר וצוות המחקר עסק באופן אינטנסיבי בנושא זה ללא כל מימון נוסף אנו רואים לנכון להביא את התוצאות העיקריות שהושגו. תוצאות אלו איפשרו החלטעה מושכלת לגבי אופן השימוש העתידי בתרכיב.

1.7. בדיקת התגובה החיסונית המושרית על-ידי התרכיב

מטרתו של חלק זה הייתה לבדוק באם התרכיב האמור משרה תגובה נוגדנית משמעותית בקבוצות שונות של פרות בעדר. בניסוי שכלל הזרקת 1מ"ל תרכיב פעמים בהפרש של חודש לחצי עדר 11 משקים נאספו נסיונים ונבדקה רמת נוגדנים מושרית בבדיקת SN. כפי שניתן לראות בתרשים 9 התרכיב הישרה תגובה אימונולוגית משמעותית בכל הקבוצות בעדר. רמות הנוגדנים שנמדדו היו שוות ואף גבוהות מאלו שנמדדו לאחר הדבקה בנגיף (נתונים לא מוצגים).

תרשים 9: רמות נוגדנים מנטרלים לפני הזרקת התרכיב לאחר הזרקה אחת ולאחר שתי ההזרקות.



A – עגלות 6-12 ח'

B – עגלות הרות

C – מבכירות

Time 0 – הזרקה ראשונה

Time 1 – חודש אחרי הזרקה 1

Time 2 – חודש אחרי הזרקה 2

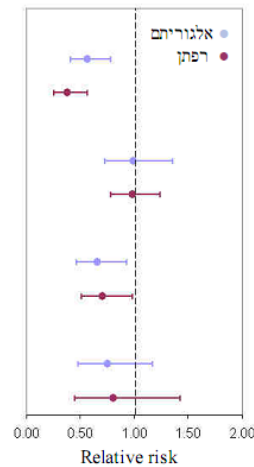
לאחר התוצאות המעודדות הללו בדקנו את יעילות התרכיב במספר משקים אשר חוסנו בפרוטוקולים שונים:

נבדקה יעילותו של חיסון כפול ב- 2008 אל מול אי חיסון
 חיסון כפול ב- 2007 וב- 2008 אל מול חיסון ב- 2008 בלבד
 חיסון כפול ב- 2007 אל מול אי חיסון

המחלה נבדקה ב- 2008 באמצעות דיווח תחלואה על-ידי הרפתן וכן באמצעות אלגוריתם ממוחשב לזיהוי ירידה אופיינית במתן חלב. תרשים 10 מציג את התוצאות במספר משקים עיקריים לאחר חיסון בשני הפרוטוקולים הראשונים. חיסון בפרוטוקול השלישי שנה (לפני ההתפרצות) הראה חוסר יעילות בהגנה מפני המחלה (תוצאות לא מוצגות).

תרשים)

רפת	תחלואה לפי הרפתן	תחלואה לפי האלגוריתם		RR לפי רפתן	RR לפי אלגוריתם		
		+	-				
0708/C משק א'	מחוסנות (n=123)	23	100	36	87	0.37	0.56
	לא מחוסנות (n=113)	57	56	59	54	(0.25-0.56)	(0.40-0.78)
08/0 משק ב'	מחוסנות (n=104)	58	46	43	61	0.98	0.99
	לא מחוסנות (n=112)	64	48	47	65	(0.77-1.23)	(0.72-1.35)
0708/C משק ג'	מחוסנות (n=128)	36	92	33	95	0.70	0.65
	לא מחוסנות (n=169)	68	101	67	102	(0.50-0.97)	(0.46-0.92)
0708/01 משק ד'	מחוסנות (n=120)	18	102	26	94	0.80	0.74
	לא מחוסנות (n=106)	20	86	31	75	(0.44-1.42)	(0.47-1.16)

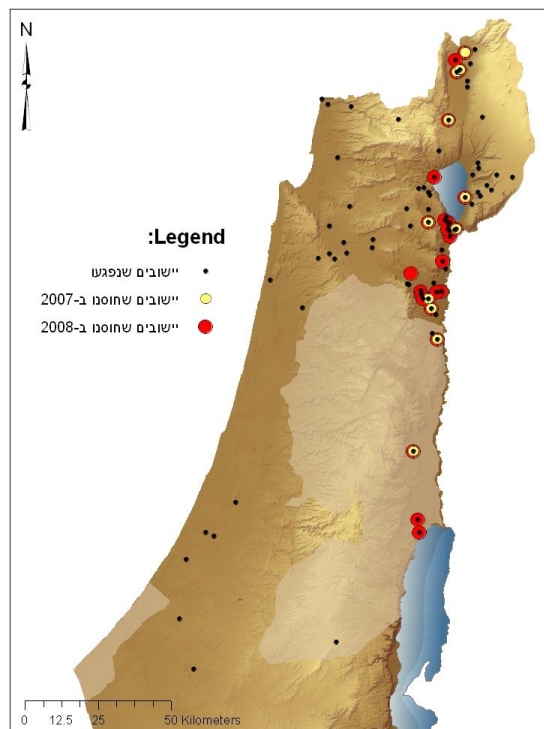
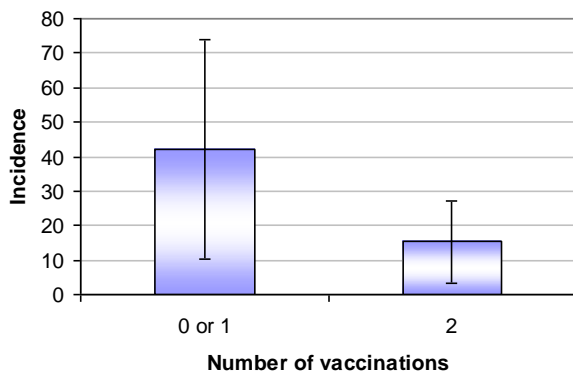


בנוסף נבדקה יעילות החיסון בעדר שלם במהלכה הושו עדרים מחוסנים לעדרים לא מחוסנים באזור עמק הירדן ב- 2008. בנייתו זה הוכללו רק משקים שדיווחו על תחלואה כלשהי כדי להבטיח שהנגיף נכח באזור המשק. תרשים 11 מציג את המשקים שנכללו בנייתו ותרשים 12 את תוצאותיו.

תרשים 11: חיסון משקים לפני התפרצות 2008

תרשים 12: יעילות התרכיב

ברמת המשק



המסקנות העולות מכלל המחקרים האמורים הן כי יעילות החיסון במניעת המחלה היא 50% כאשר הוא ניתן במהלך שנתיים. כלומר, הפרוטוקול המומלץ כרגע הוא מתן שתי מנות בהפרש של חודש ומנה נוספת לאחר חצי שנה עד שנה. ברמת העדר, יעילות התרכיב בפרוטוקול האמור יכולה אף להגיע ל-70%. בכך ניתן כמובן לחסוך הפסדים ניכרים.