

שם ההצעה:

פיתוח מערכת PCR לזיהוי סימולטני של נגיפי לשון הכחולה, דמם אפיזוואטי וקדחת שלוש הימים בזמן אמת

Development and validation of multiplex real-time PCR for simultaneous identification of
Bluetongue, Epizootic Hemorrhagic Disease and Bovine Ephemeral Fever Viruses

חוקרים:

חוקרת ראשית: ד"ר נטליה גולנדר, המכון הווטרינרי

חוקר שותף: פרופ' אייל קלמנט, בית הספר לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, האוניברסיטה העברית

תקציר:

מטרת המחקר הייתה לפתח ולתקף מערכת מולטיפלקס בזמן אמת לזיהוי סימולטני של נגיפי קדחת שלוש הימים (BEFV), לשון כחולה (BTV) ודמם אפיזוואטי (EHDV), וכן לשפר את יכולות האבחון והאפיון הגנטי של נגיפי קדחת שלוש הימים בישראל. במהלך המחקר בוצע פיתוח של מספר מערכות RT-qPCR חדשות, פותחו שיטות חדשות לבידוד נגיפי BEFV, בוצעו ריצופי גנום מלאים של נגיפים שהתגלו בישראל, ואופיינו לראשונה נגיף חדש מהגנוס Ephemerovirus אשר כונה Hefer Valley Virus (HVV). בנוסף, במהלך התפרצות BEF בשנת 2023 בודדו לראשונה בישראל מספר נגיפי BEFV, רוצפו גנומיהם המלאים, והודגם כי ההתפרצות נגרמה על ידי זן חדש הדומה לזנים שתוארו בעבר באי Mayotte. המחקר הוביל לפיתוח תבחינים מולקולריים חדשים בעלי רגישות גבוהה, לפרסום שלושה מאמרים מדעיים בכתבי עת בינלאומיים ולשיפור משמעותי ביכולת האבחון והמעקב אחר נגיפי BEF ו-Ephemerovirus בישראל.

תקציר באנגלית:

The aim of this study was to develop and validate a multiplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of bovine ephemeral fever virus (BEFV), bluetongue virus (BTV), and epizootic hemorrhagic disease virus (EHDV), as well as to improve the diagnostic and genetic characterization capabilities for bovine ephemeral fever viruses in Israel. During the course of the study, several new RT-qPCR assays were developed, novel methods for the isolation of BEFV were established, and full-genome sequencing was performed on viruses detected in Israel. In addition, a previously unknown member of the genus Ephemerovirus was identified and characterized for the first time and was named Hefer Valley virus (HVV). Furthermore, during the 2023 bovine ephemeral fever outbreak, several BEFV isolates were obtained for the first time in Israel, their complete genomes were sequenced, and it was demonstrated that the outbreak was caused by a novel strain closely related to strains previously described on the island of Mayotte. The study resulted in the development of new highly sensitive molecular diagnostic assays, the publication of three scientific articles in international peer-reviewed journals, and a substantial improvement in the ability to diagnose, characterize, and monitor BEFV and other Ephemerovirus infections in Israel.

רקע ומטרות המחקר

נגיפי BEFV, BTV, EHDV ו-BEFV מהווים גורם מרכזי לתחלואה ולהפסדים כלכליים בענף הבקר לחלב בישראל. מכיוון שהביטוי הקליני של שלוש המחלות דומה, נדרש אבחון מעבדתי מהיר ומדויק לצורך קבלת החלטות טיפוליות ואפידמיולוגיות.

מטרות המחקר היו:

1. פיתוח כלים יעילים לבידוד נגיף קדחת שלושת הימים (BEFV).
2. פיתוח מערכת Multiplex RT-qPCR לזיהוי סימולטני של BEFV, BTV ו-EHDV.
3. תיקוף המערכת החדשה מול שיטות האבחון הקיימות.
4. אפיון גנטי של נגיפי BEFV המתפרצים בישראל.
5. שיפור יכולת הזיהוי של נגיפים נוספים מהגנוס Ephemerovirus.

תוצאות עיקריות של המחקר (ראה רשימת מאמים בסוף המסמך לצורך יתר פרוט של כל ממצא):

1. פיתוח ושיפור שיטות לבידוד נגיפי BEFV

בוצעו ניסיונות לבידוד נגיפי BEFV מדגימות שדה באמצעות מספר קווי תאים ובאמצעות פרוטוקול דו-שלבי חדש. במהלך המחקר פותחה שיטה יעילה שאפשרה לראשונה בידוד סדרתי של נגיפי BEFV מהתפרצות 2023 בישראל. באמצעות השיטה החדשה בודדו תשעה נגיפי BEFV מדגימות שדה שנאספו במהלך ההתפרצות הארצית של שנת 2023.

2. פיתוח מערכת Multiplex לזיהוי סימולטני של BEFV, BTV, EHDV

פותחו מספר גרסאות של מערכת Multiplex RT-qPCR המבוססות על מערכות קיימות לזיהוי BTV ו-EHDV יחד עם מערכת חדשה לזיהוי BEFV. בשלבים הראשונים התגלו תופעות של עיכוב הדדי (PCR inhibition) בין מערכות הזיהוי השונות. בעקבות זאת בוצעו שינויים בתכנון הפריימרים והפרובים אשר אפשרו ביטול העיכוב ושיפור ביצועי המערכת. המערכת שפעלה היטב מול נגיפי BEFV מהתפרצויות 2018–2021 וכן מול נגיף עמק חפר (HVV) לא הצליחה לזהות בצורה מספקת את זן BEFV החדש שהתפרץ בשנת 2023. ממצא זה הוביל לפיתוח דור חדש של תבחינים ייעודיים.

3. גילוי ואפיון נגיף עמק חפר (HVV) ⁽¹⁾

בשנת 2022 זוהה לראשונה בישראל נגיף חדש השייך לגנוס Ephemerovirus בדגימת דם מפרה חולבת עם מחלה קשה. ריצוף גנום מלא הראה כי מדובר בנגיף חדש ושונה מכל נגיפי ה-Ephemerovirus שתוארו עד כה. הנגיף קיבל את השם Hefer Valley Virus (HVV). פיתוח מערכות הזיהוי במסגרת המחקר אפשר בהמשך לזהות גם נגיפים המשתייכים לגנוס Ephemerovirus מעבר ל-BEFV בלבד. תגלית זו פורסמה בכתב העת Archives of Virology בשנת 2023.

4. אפיון גנטי של נגיפי BEFV בישראל ⁽²⁾

במסגרת המחקר בוצע ריצוף גנום מלא של נגיפי BEFV שבודדו במהלך ההתפרצויות בשנים 2015, 2018, 2021 ו-2023. האנליזה הפילוגנטית הראתה כי: ההתפרצויות בשנים 2015–2021 נגרמו על ידי זנים מקומיים. התפרצות 2023 נגרמה על ידי זן חדש הדומה לזנים שתוארו באי Mayotte. השונות הגנטית הקיימת בין נגיפי BEFV שבודדו בארץ בשנים שונות משמעותית יותר מכפי שהיה ידוע בעבר. סיווג נגיפי BEFV לפי מיקום גיאוגרפי בלבד אינו משקף עוד את המציאות האפידמיולוגית.

5. פיתוח תבחיני RT-qPCR חדשים לזיהוי כלל זני BEFV (3)

הקושי בזיהוי זן 2023 באמצעות התבחינים הקיימים הוביל לפיתוח שתי מערכות RT-qPCR חדשות המבוססות על אזור הנוקלאופרוטאין (N) השמור יחסית. מערכות אלו נבדקו על 245 דגימות שדה שנאספו מהתפרצויות שונות בישראל וכן מול זנים אוסטרליים ויפניים. התבחינים החדשים זיהו 144 מתוך 147 דגימות חיוביות, הראו רגישות גבוהה יותר מהמערכת הקודמת, זיהו דגימות שנמצאו שליליות במערכת הישנה ואפשרו זיהוי של כלל הזנים הידועים של BEFV.

סיכום והישגים עיקריים

המחקר השיג את מרבית יעדיו ואף הניב תוצאות מדעיות שלא נצפו בתחילת הדרך.

הישגים מרכזיים:

- פיתוח שיטות חדשות לבידוד נגיפי BEFV.
- בידוד ראשון בישראל של נגיפי BEFV מהתפרצות 2023.
- גילוי ואפיון נגיף חדש – Hefer Valley Virus.
- ריצוף גנום מלא של נגיפי BEFV מהתפרצויות שונות בישראל.
- זיהוי הופעתו של זן חדש ("Mayotte-like") בהתפרצות 2023.
- פיתוח מערכות RT-qPCR חדשות בעלות רגישות וסגוליות משופרות.
- פיתוח מערכת לזיהוי נגיפים מהגנוס Ephemerovirus.
- הרחבת הידע על האבולוציה והאפידמיולוגיה של נגיפי BEFV באזור.
- יצירת תשתית לשיפור מערך הניטור והאבחון של מחלות ארבוויראליות בבקר בישראל.

מאמרים שנכתבו בעקבות המחקר הנ"ל:

1. Golender N. et al. Hefer Valley virus: a novel ephemerovirus detected in Israel. Archives of Virology, 2023.
2. Golender N. et al. Bovine Ephemeral Fever Viruses in Israel 2014–2023: Genetic Characterization of Local and Emerging Strains. Pathogens, 2024.
3. Golender N. et al. Development of New Probe-Based Real-Time RT-qPCR Assays for the Detection of All Known Strains of Bovine Ephemeral Fever Viruses. Viruses, 2025.