

מס' המחקר	נושא המחקר
848-0298-08	פיתוח תרכיב כנגד קדחת שלושת הימים.

שמות צוות החוקרים

מס' סדורי	שם החוקר/ת
חוקר ראשי	ידין חגי
1	גלמן בוריס
2	פסטרנק רוסלן
3	ברנר יעקב
4	בומברוב וליזר

מוסד המחקר של החוקר הראשי: המכון הווטרינרי ע"ש קמרון, בית דגן

סוג הדו"ח ותקופת המחקר:

שנתי	ביניים	מסכם	התחלת המחקר	סיום המחקר
		X	2007	2008

מקורות מימון עבור מיועד הדו"ח:

שם מקור המימון	קוד מקור המימון	הסכום שנתקבל עבור תקופת דיווח זה
הנהלת ענף הבקר	02-0021	120,000 ש"ח

ת ק צ י ר (אין לחרוג מגבולות המסגרת)

קדחת שלושת הימים זו מחלה נגיפית בבקר המועברת על ידי יתושים ויבחושים. המחלה מופיעה בישראל מידי מספר שנים באופן בלתי צפוי ובלתי חזוי וגורמת לנזקים כלכליים המתבטאים בירידה משמעותית בתנובת החלב. המחלה מסתכמת נמשכת בדרך כלל כ- 3 עד 8 ימים (10, 3), מלווה לעיתים בהפלות בסדר גודל של 2.5% ותמותה בשיעור של 4% (6). בשנים 1999, 2000 ו- 2001 הופיעה המחלה בישראל באופן רציף. בשנים 2002 ו- 2003 לא נרשמו מקרים חדשים של המחלה, אך ניתן היה לשער כי המחלה תלווה את משק החלב גם בעתיד ואכן בתחילת קיץ 2004 הופיע המחלה מחדש. מקרים ראשונים נרשמו ביישובים מצפון לרצועת עזה ובהמשך התפשטה המחלה בכל הדרום ואף ליוטבתה. משם עברה המחלה צפונה לאורך מישור החוף ובספטמבר נרשמו מרבית המקרים בעמק הירדן. ב- 2008 חזרה והופיעה המחלה במתכונת במהלך דומה לאירועי 2004. כמחלה נגיפית ניתן לפקח על הופעתה על ידי הדברת המעביר או חיסון הפונדקאי, קרי, הבקר. סכום תוצאות שנים קודמות: בעבודה זו, הוצע לפתח תרכיב מבידוד מקומי של נגיף קדחת שלושת הימים על בסיס נגיף מומת ולבצע את בדיקות הבטיחות והיעילות המחייבות לגבי תרכיבים כנ"ל. בניסיונות ראשונים גודל הנגיף בתרביות תאי VERO בנפח של מספר ליטרים ולאחר אינאקטיבציה נערכו ניסיונות ריכוז האנטיגן. חיסון ניסיוני של עופות עם אצווה של אנטיגן מרוכז, נתן כיייל נוגדנים משביע רצון. בהמשך, נערכו ניסיונות חוזרים לריבוי הנגיף לאחר התאמה לתאי BHK ובדיקת הכייל בתרביות תאי VERO. הנגיף עבר אינאטיבציה באמצעות בטה-פרופיולקטון ותהליך ריכוז בשיטת האולטרא פילטרציה. פורמולציה של תרכיב סופי הוכנה בשמן מינרלי כאמולסיה כפולה. בדיקות בטיחות מעבדה עברו בהצלחה. ניסיון חיסון ראשון בוצע ב- 2004. התוצאות נראו מבטיחות, הקבוצה אשר קיבלה חיסון כפול הראתה עלייה בכייל הנוגדנים בכל הפרטים עד חודשיים לאחר החיסון השני. חיסון בודד הביא לעלייה בכייל הנוגדנים רק במחצית מהפרטים בקבוצה. ב- 2005 ו- 2006 נערכו ניסיונות חיסון חוזרים באחד ממשקי בקעת הירדן. ניסיונות אלה הוכיחו את יעילות התרכיב בהקניית רמת נוגדנים המקובלת כמספקת הגנה ונמשכה לאורך זמן, עד תום תקופת פעילות מעביר המחלה עם כניסת החורף. ב- 2007 יצאנו למבצע חיסון ומעקב נרחב ב- 11 משקים בבקעה ובעמק הירדן. התוצאות החיוביות בעת השימוש בתרכיב חזרו על עצמן, מבצע זה חזר על עצמו ב- 2008 מלווה הוקעה טבעית של התפרצות המחלה בשדה. התפרצות זו לוותה במעקב אפידמיולוגי אשר הניב תוצאות המצביעות על יעילות תרכיב של 50% לפחות. צמצום נזקי המחלה באמצעות עלות חיסון מצדיקה בהחלט את הוצאה ונתונים אלה מהווים תחזית מבטיחה לחיסון ככלי יעיל להתמודדות עם המחלה.

אישורים

חוקר ראשי:

מנהל החטיבה

מנהל המכון

פיתוח תרכיב כנגד קדחת שלושת הימים

ידין חגי, בוריס גלמן, יעקב ברנר, אייל קלמנט*, אורלי עזיז בוארון*.

תוכן עניינים

2	1. מבוא.....	2
2	1.1. רקע מדעי	2
3	2.1. תרכיבים כנגד קדחת שלושת הימים.....	3
3	3.1. תאור הבעיה בישראל	3
4	2. מטרת המחקר	4
5	3. שיטות חומרים ותוכנית עבודה	5
8	4. תוצאות	8
12	5. דיון ומסקנות	12
13	6. ספרות	13
15	7. תקציר בעברית	15
16	8. תקציר באנגלית	16

*הערה: התוצאות המוצגות בדו"ח הנ"ל מהוות חלק מעבודת הדוקטורט של אורלי עזיז בוארון בהנחייתו של ד"ר אייל קלמנט. עבודה זו בוצעה בשיתוף פעולה מלא בין המכון הוטרינרי אשר פיתח את התרכיב וביה"ס לרפואה וטרינרית אשר רכז וערך את תוצאות הבדיקות בשטח.

1. מבוא

1.1. רקע מדעי

Bovine Ephemeral Fever (BEF) אשר שמה בעברית קדחת שלושת הימים או קדחת קיקיונית, נגרמת על ידי נגיף דמוי קליע השייך למשפחת Rhabdoviridae. גנום הנגיף בנוי מגדיל בודד בעל RNA שלילי עם קפסיד בעל חמישה חלבונים מבניים (12).

נגיף ה-BEF רגיש ל-pH נמוך, לטמפרטורה גבוהה ולאטמוספירה החיצונית. כתוצאה מנתונים אלה שרידות הנגיף באוויר מחוץ לגוף הפונדקאי, מאד נמוכה אך נתונים אלה חסרי משמעות מאחר והנגיף מועבר רק על ידי חרקים. הנגיף רגיש מאד לחומצה לקטית הנוצרת בשרירים עם מות החיה ועובר באמצעותה אינאקטיבציה. לכן, הפרשות גוף ורקמות חסרי חשיבות בהעברת המחלה. בין בידודי נגיף ה-BEF לא נמצאו הבדלים אנטיגניים או שינויים באימונוגניות למרות שסקר האפיטופים מצביע על שינויים כל שהם. יחד עם זאת Dr. Toby St George מוסר באינפורמציה אישית כי נגיפים קרובים כמו Kimberley ו- Adelaide River עלולים לגרום לתמונת מחלה הדומה ל-BEF.

נגיף קדחת שלושת הימים מועבר על ידי יבחושים ויתושים מסוגים שונים (2). הדרך בה שורד הנגיף את תקופת החורף איננה ברורה, אך בכל מקרה בדיקות באוסטרליה הוכיחו כי הנגיף איננו חורף בבקר. כבשים אינן חולות קלינית ב-BEF ואין כל הוכחה סרולוגית כי עוברות זיהום תת קליני (5). לגבי עזים קיים דיווח בודד כי נושאים נוגדנים מנטרלים (16). האפשרות להעברה או נשאות על ידי עופות בר מקומיים או נודדים לא מדווחת בספרות.

הסימנים הקליניים של המחלה הם: ירידה חדה בתנובת חלב, טמפרטורה גבוהה עד 42 מעלות, ריור מוגבר והפרשות ריריות מהנחיריים. רעידות שרירים, קשיי תנועה, רביצה, קשיי בליעה, צליעה על רגל אחת או יותר ובד"כ המחלה עוברת לאחר שלושה ימים. שיעור התמותה נמוך עד 4% והפלות בסדר גודל של 2.5%. נזקי המחלה מתבטאים בעיקר בהפסד חלב ותמותה (6).

נגיף קדחת שלושת הימים פוגע באנדוטייל של כלי הדם הקטנים ובמיוחד אלה של המפרקים ומעטפות הגידים (7). התגובה הדלקתית מאופיינת בעלייה של פי 2-4 ברמת הפיברינוגן בפלסמה. כתוצאה יש הצטברות של נוזל עשיר פיברין במפרקים ובחלל הבטן, הפליאורה והפריקרד והפרשות מריריות העיניים והאף (7, 15, 17).

תופעה משנית היא אלקלוזיס כתוצאה מנפילת רמת הקלציום בפלסמה הגורמת גם לתופעות שיתוק הגפיים (8). תופעות המחלה הקשה נובעות מתכונת הנגיף להמריץ יצירת אינטרפרון ברמות מאד גבוהות. בשעה שהבהמה קודחת מחום שווה הנגיף בלאוקוציטים ובמיוחד בנאוטרופילים (11), (17).

2.1. תרכיבים כנגד קדחת שלושת הימים.

תרכיבים חיים כנגד BEF נחשבים כאימונוגנים חלשים (T.D. St. George מידע אישי), דבר המחייב שניים או יותר חיסונים כדי ליצור רמת חסינות והגנה מוגבלת. גם משך תקופת ההגנה המוקנית עם החיסון קצרה ומוגבלת לעונה אחת.

באוסטרליה, יפן ודרום אפריקה פיתחו תרכיבים חיים ממויירים ותרכיבים מומתים בנוסף נבדק תרכיב על בסיס גליקופרוטאין G של מעטפת הנגיף (12).

התרכיב החי האוסטרלי הינו אנטיגן מיובש בהקפאה המעורבב באדג'ובנט לפני השימוש. תרכיב זה הוכנס לשימוש בשלהי שנות השמונים ונותן הגנה טובה למדי. תצפיות שדה הראו כי בתוך עדר בקר מחוסן מספר ראשי בקר עלולים לפתח סימני מחלה בצורה קלה. אך חריפות ומשך הסימנים מתון בהרבה לעומת בקר בלתי מחוסן.

תרכיב מומת כפי שמתואר בספרות הנו תכשיר בו המרכיב הנגיפי עבר ריבוי בתרבויות תאים ולאחר תהליך אינאקטיבציה הוכנס כאנטיגן לתרחיף באדג'ובנט, כספונין, אלומיניום הידרוקסיד, דקסטרן (14), (13) או שמן מינרלי (9, 1,4,5) כל זאת לשיפור התגובה החיסונית. תרכיבים אלה לפי הספרות נותנים הגנה לפרק זמן של כ- 6 חודשים. רמת ההגנה איננה כשל התרכיב החי אך התרכיב נוח יותר לשימוש כי אין בו את הסיכונים של שארית אלימות הקיימת בתרכיבים חיים.

בניסיונות הוכח כי נוגדנים הנוצרים בעקבות המחלה או החיסון מקנים עמידות בפני המחלה (14).

3.1. תאור הבעיה בישראל

בישראל הופיעה קדחת שלושת הימים מידי מספר שנים באופן בלתי צפוי ובלתי חזוי. התפרצויות המחלה מתרחשות בחודשי הקיץ והסתיו – תקופת פעילות החרקים המעבירים, והם מהווים כנראה מאגר לנגיף בחודשי החורף.

המחלה תוארה בישראל כבר בשנת 1930- ומאז כל מספר שנים אירעו גלי התפרצויות. ההתפרצויות האחרונות בישראל הופיעו ב- 1999, 2000 ונמשכה גם בשנת 2001. התפרצות מחלה משך שלוש שנים באופן רצוף הן בארץ והן (לפי מידע אישי) בארצות השכנות, מצרים וירדן, מצביעה על האפשרות כי המחלה הפכה אנדמית באזורנו.

אכן, בתחילת קיץ 2004 מוקדם מהצפוי לפי אירועים קודמים, הופיעה הקדחת הקיקיונית מחדש. בתחילת יוני נרשמו מקרים קליניים ראשונים ביישובים מצפון לרצועת עזה ולאחר מכן התפשטה המחלה בכל אזור הדרום ואף ביוטבתה. משם עברה המחלה צפונה לאורך מישור החוף ובתחילת ספטמבר נרשמו מרבית המקרים בעמק הירדן.

בתחילת קיץ 2008 פרצה מחלת קדחת שלושית הימים בדרום שפלת החוף, צפונית לרצועת עזה והתפשטה בכל אזור המרכז ולקראת סוף הקיץ והסתיו הופיעה בעמק הירדן והיוותה הוקעה טבעית לחיסון הניסיוני שניתן מספר חודשים קודם לכן. לאחרונה ביולי 2009 הופיעה המחלה בדרום מישור החוף ובנגב המערבי ומשם התקדמה לצפון הארץ.

בישראל המחלה גורמת לנזקים כלכליים המתבטאים בירידה משמעותית בתנובת החלב משך 10-3 ימי המחלה ועד להחלמה. נתונים מעודכנים מסקר שנערך בארץ לגבי הנזקים הכלכליים של BEF מצביעים על הפסד של 380 ק"ג חלב לפרה שחלתה, תמותה בשיעור של 4%, הפלות בסדר גודל של 2.5% והכפלה של מרכיב התרופות בעדר החולה (18).

למניעת קדחת שלושית הימים באזורים אנדמיים משתמשים:

- חומרים דוחי חרקים.
 - מניעה באמצעות חיסון בתרכיב מומת או חי.
 - הטיפול במחלה הוא בעיקר טיפול תומך המסייע להתגבר על הסימנים הקליניים בלבד.
- בעקבות הנזקים הכלכליים הנגרמים על ידי קדחת שלושית הימים למשק החלב בישראל בעשור האחרון והסכנה להמשך התפרצויות המחלה בשנים הבאות, הוצע לפתח תרכיב על בסיס נגיף מומת מבידוד בישראל. פתוח התרכיב מבידוד מקומי הוצע בעקבות האכזבות מיבוא תרכיב מומת מאוסטרליה. עקב חוסר עמידות התרכיב בבדיקות היעילות קרא יצרן התרכיב להחזרת שני משלוחים עוד לפני הגיעם לישראל.
- מההתפרצות בשנת 2000 התקבלו כעשרה בידודי נגיף ממשקים שונים. בידודים אלה עברו ריבוי והתאמה לתאי VERO ונבדקו לכייל נגיף. הבידוד מקיבוץ יקום עם הכייל הגבוה ביותר משמש כיום כחומר מזרע לייצור תרכיב לאחר שנבחן בבדיקות קודמות גם לגבי תכונותיו האימונוגניות.

2. מטרת המחקר

תכניות המחקר הראשוניות התרכזו בפתוח וייצור התרכיב.

התכנית הנוכחית מטרתיה היו:

1. ניסיונות חיסון ובדיקות סרולוגיות בעגלות לאחר חיסון אחד ושניים לבדיקת יעילות סרולוגית של התרכיב ובדיקת ההשפעה של חיסון חוזר לאחר שנה על יעילות התגובה הסרולוגית.
2. בתכנית 2007 ייצור כמות תרכיב המספקת לחיסון למעלה מעשרה משקי חלב. חיסון ניסיוני ב- 11 משקים הממוקמים באזורים המועדים למחלה, כבקעת הירדן, עמק הירדן ועמק החולה.
3. בתכנית 2008 חיסון חוזר באותם משקי עמק ובקעת הירדן שהשתפו בחיסון - 2007, תוך ניסיון להערכת יעילות החיסון.

3. שיטות חומרים ותוכנית עבודה.

3.1. הכנת הרכיב:

1. נגיפי מחלת קדחת שלושת ימים אשר בודדו בארץ הועברו מספר העברות (5) בתרביות תאי VERO והותאמו מהעברה החמישית לתאי BHK במרבד ולאחר מכן לתאי BHK בתרחיף. 2. לאחר כל העברה נבדק כייל הנגיף בתאי Vero מספר פעמים בטיטרציה חוזרת. 3. הבידוד מ"יקום 2000" עם הכייל הגבוה ביותר נבדק לגבי כייל המזרע וזמן האסיף האופטימלי. 4. מהנתונים שנתקבלו בסעיף 3 נזרעו בקבוקי גידול ובקבוקי גלגול והאיסוף שימש כחומר מזרע. 5. חומר המזרע שימש להדבקת תאי BHK במרבד ובתרחיף. בהתאם לכייל שהתקבל הוחלט להמשיך בקו זה של גידול במרבד. 6. בתרביות מרבד תאים הוכן נגיף בנפח של כ- 3 ליטר - להכנת תרכיב ניסיוני. 7. נגיף זה עבר אינאקטיבציה על ידי פורמלין, אזידירינים או (BPL) Beta Propio Lactone וניבדק לבטיחות בתרביות תאים במטרה למצוא את החומר המתאים ביותר לאינאקטיבציה. 8. האנטיגן (מסע' 7) עבר תהליך ריכוז באמצעות אמוניום סולפט. השקעת חלבון באמצעות אמוניום סולפט 50% למשך לילה תוך ערבול בקירור, סירכוז הרחפת המשקע במים מזוקקים בנפח הקטן פי 10 מהנפח המקורי ודיאליזה בשרוול מול PBS, או ריכוז באמצעות PEG 6000, ספיחה לתמיסת PEG (Polyethylenglycol) השקעת ה- PEG בסירכוז מהיר והרחפה בנפח הקטן פי 10-20 מהנפח המקורי. 9. האנטיגן שהוכן ב- 2007 רוכז באמצעות מערכת ממברנות של אולטרא פילטרציה. מאנטיגן המרוכז, הוכן תרכיב ניסיוני 1 מ"ל למנה, באמולסיה שומנית של ISA-206 הידוע כאדיובנט מעולה לתרכיבים וירליים לבקר. האנטיגן זה עבר פורמולציה ושימש כתרכיב ניסיוני בשנת 2007 - 2008.

3.2. תאור ניסיונות 2007:

ניסיונות החיסון בוצעו ב- 11 משקים הממוקמים לאורך הבקעה ועמק הירדן.

טבלה 1: רשימת המשקים והרופאים שביצעו את החיסון:

שם המשק	הרופא המחסן
שדה אליהו	יוסט דוכס (חקלאית)
עין הנציב	
דפנה	שריר בני (חקלאית)

עמיר	
איילת השחר	
כפר בלום	
שער הגולן	
יבניאל (קרמר)	אברמסון משה (חקלאית)
שדמות מחולה	ידין חגי וברנר יעקב (מכון)
	רם אבי (חקלאית)
עין גב	אלפרט ניר (חקלאית)
גלגל	אברמוביץ' איציק (חקלאית)

בכל משק חוסנו כל הפרות הנושאות מספר זיהוי זוגי פעמיים בהפרש של חודש בין מתן אחד למשנהו, תוך הנחייה להחליף מחט בין בעל חיים אחד למשנהו ולבצע את ההזרקה תוך שרירית בצוואר בטמפרטורה של $20 - 25^{\circ} C$. הבקר בעל המספרים האי זוגיים נשאר כבקורת בלתי מחוסנת. כל עדר חולק חולק לשלוש קבוצות גיל אשר מהן נלקחו דגימות דם על פי המפתח הבא:

A - עגלות בגילאי 6 – 12 חודשים.

B - עגלות בהריון.

C - מבכירות ובוגרות.

מועדי איסוף דגימות הדם היו: בזמן 0 – חיות בלתי מחוסנות ומספרים זוגיים לפני חיסון.

זמן 1 – דגימות חודש לאחר חיסון ראשון. זמן 2 – חיות מחוסנות, חודש לאחר חיסון שני.

זמן 2C ביקורת – חיות בלתי מחוסנות (מספרים אי זוגיים) חודשיים לאחר תחילת הניסיון, בדיקה זו נעשתה לצורך זיהוי חדירה או אי חדירה של מחולל המחלה למשק. מכל קבוצה בכל לקיחה נלקחו 10 - 15 דגימות סך הכל נבדקו 1470 דגימות.

בדיקה סרולוגית:

הנסיובים נבדקו בשיטת סתירת הנסיוב (Serum neutralization, SN)

מבחן זה בוצע בפלטות מיקרו עם 96 בארות, בהליך סטנדרטי.

הפלטות הודגרו באינקובטור Co_2 משך 3 ימים. תוצאות ה – SN נקראו תחת מיקרוסקופ תרבויות.

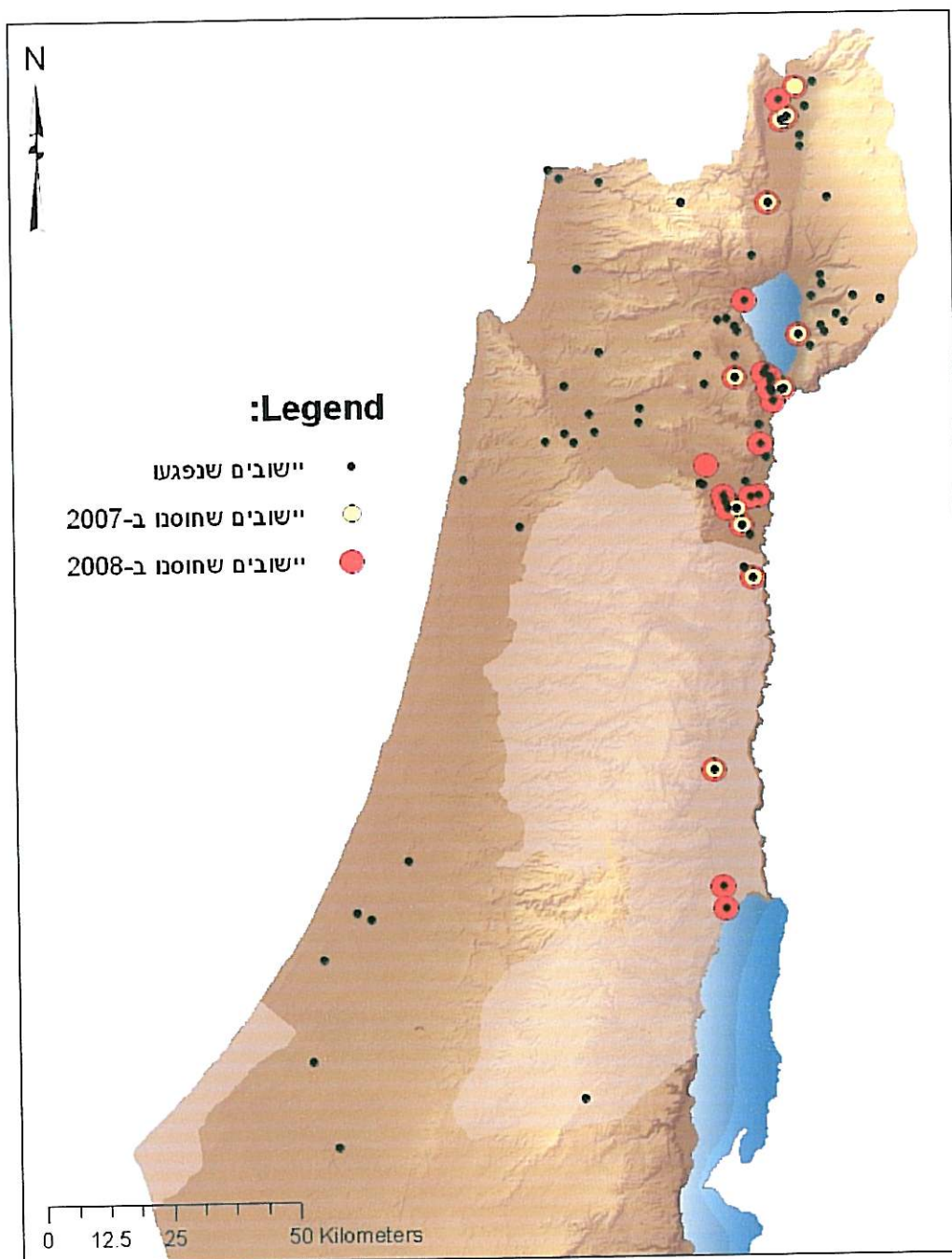
כייל הנסיוב חושב כמיהול הנסיוב הגבוה ביותר שעדיין עכב את הופעת ה – CPE (אפקט ציטופטי) שנגרם על ידי הנגיף. נסיוב ידוע שימש כבקורת חיובית.

מטרת הבדיקות הסרולוגיות :

1. אפיון התגובה החיסונית לתרכיב.

2. הגדרת היקף ומספר בעלי החיים המחוסנים המגיבים והלא מגיבים לאחר חיסון ראשון ולאחר חיסון שני.
 3. פיזור כייל הנוגדנים הבסיסי בזמן 0 – חיות בלתי מחוסנות ומספרים זוגיים לפני חיסון. זמן 1 – דגימות חודש לאחר חיסון ראשון. זמן 2 – חיות מחוסנות, חודש לאחר חיסון שני. זמן 2C ביקורת – חיות בלתי מחוסנות.
 4. אנליזה של פיזור כייל הנוגדנים בקבוצות השונות בעקבות החיסון הראשון והשני.
 5. בדיקת היחס בין התגובה לחיסון הראשון והשני.
- 3.3. תאור ניסיונות חיסון 2008:
- בעקבות התוצאות הסרולוגיות המעודדות שהתקבלו מניסוי התרכיב בשנת 2007 בוצע בשנת 2008 חיסון ניסיוני בשדה בקנה מידה נרחב תוך שימוש באותו תרכיב.
- 19 ישובים חיסנו את מחצית העדר,
7 ישובים חיסנו את כל העדר.
- התפרצות המחלה חודשים ספורים לאחר מכן אפשרה לבחון את יעילות התרכיב במניעת המחלה. בנוסף, במספר ישובים חוסנו העדרים במהלך ההתפרצות.
- תרשים 1. מציג את הישובים שחוסנו במהלך ניסויי 2007/8 על רקע הישובים שנפגעו מהמחלה בהתפרצות 2008.
4. שיטות סטטיסטיות:
- הסיכון היחסי ורווח הסמך של 95% חושבו באמצעות תוכנת WINPEPI. מובהקות התוצאות נבחנה באמצעות מבחן Chi בריבוע. הצגת המפות בוצעה באמצעות התוכנה ARCVIEW 9.3.

תרשים 1. מפת המשקים שנפגעו מק"ב- 2007 והמשקים שחוסנו ב- 2007 וב- 2008.



5. סיכום התוצאות

תוצאות 2007

ממוצע כייל הנוגדנים לפני חיסון, חודש לאחר חיסון ראשון, לאחר חיסון שני ובקבוצה

לא מחוסנת מוצג בטבלה לעי"ל וברישום 1. תחתיו.

טבלה 2.

Time 2C	Time 2	Time 1	Time 0	
298	387	380	401	מס' בדיקות כולל
0	357	243	0	מס' חיוביים
0.03	6.52	2.07	0.10	ממוצע כייל Lg2
0.35	1.84	2.62	0.74	סטיית תקן

התוצאה מבוטאת כממוצע מעריכי Lg2 בבדיקת SN.

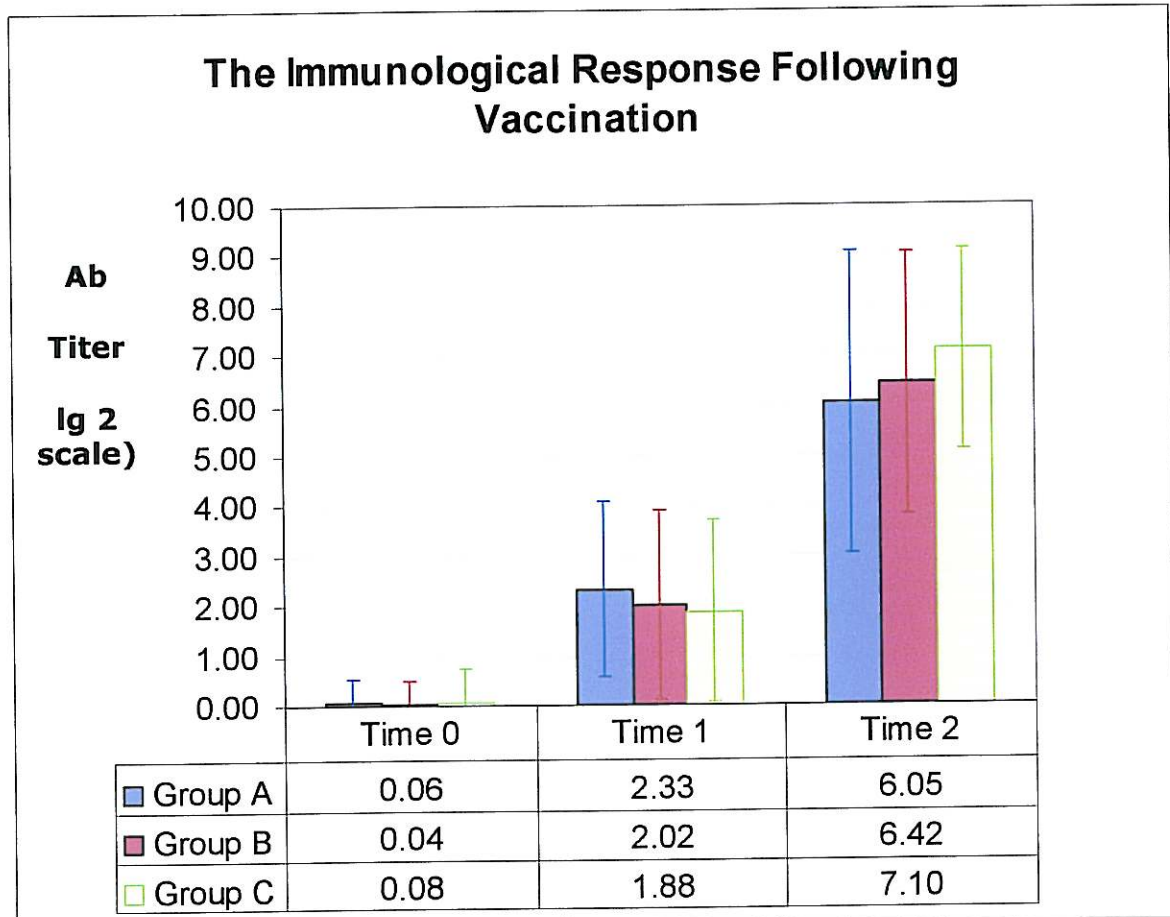
זמן 0 - ממוצע כייל נוגדנים לפני חיסון.

זמן 1 - ממוצע כייל נוגדנים חודש לאחר חיסון.

זמן 2 - ממוצע כייל נוגדנים חודשיים לאחר חיסון ראשון וחודש לאחר חיסון שני.

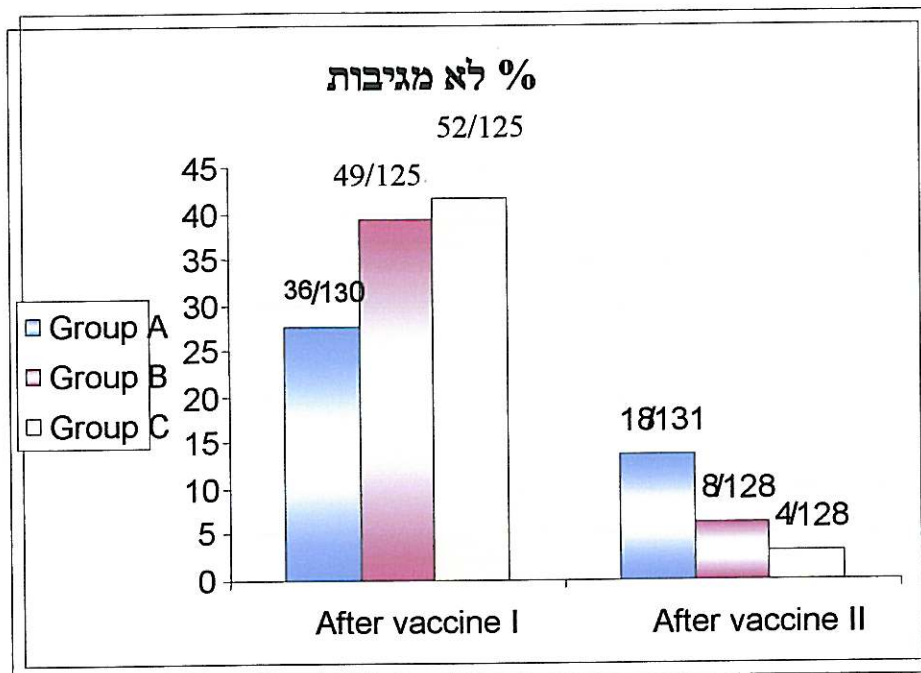
זמן 2C - ממוצע כייל נוגדנים של קבוצה לא מחוסנת, חודשיים לאחר תחילת ניסיון החיסון.

רישום 1.



קבוצה A - עגלות 6 - 12 חודש, קבוצה B - עגלות בהריון, קבוצה C - מבכירות.
 התוצאות מצביעות כי רמת הנוגדנים לאחר חיסון אחד היא ברמת תגובה נמוכה אך בעלייה לעומת רמתם השלילית לחלוטין לפני חיסון. כחודש לאחר חיסון שני רמת הנוגדנים היא למעלה מכפולה לעומת חיסון ראשון.

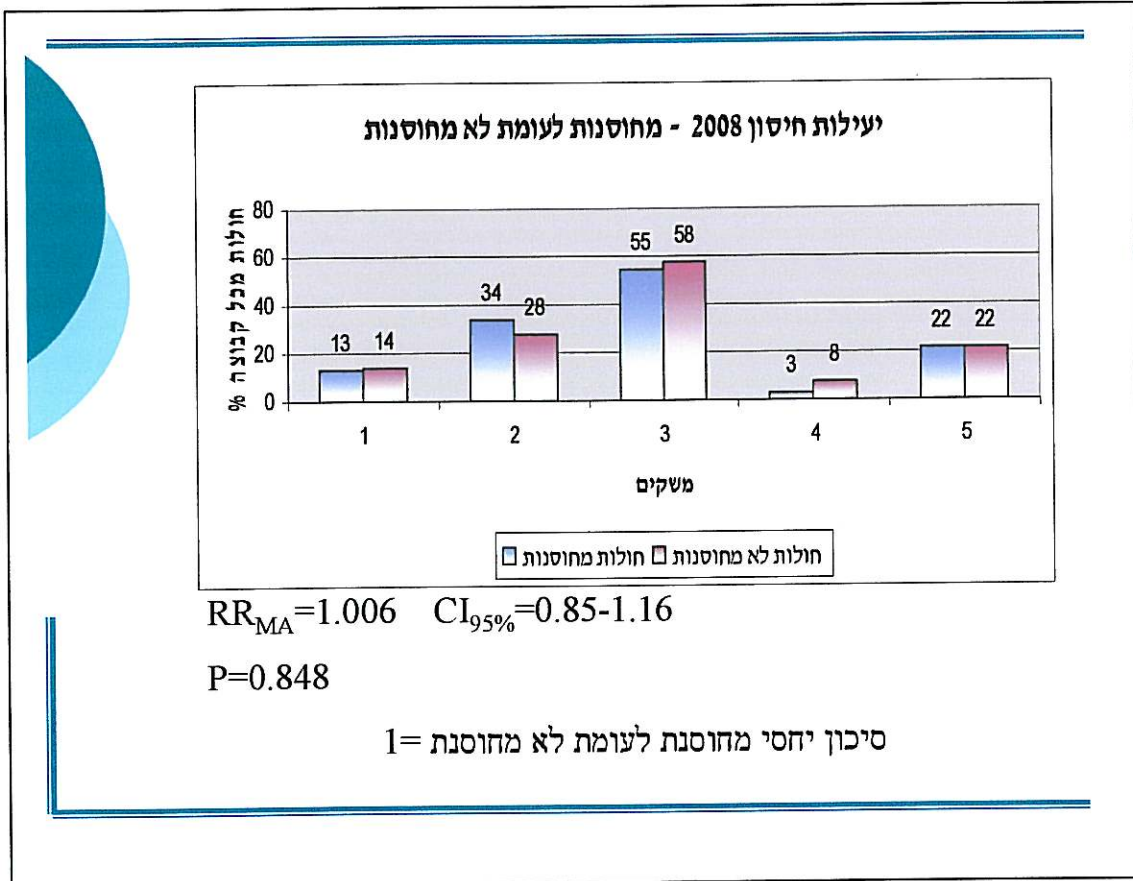
2. רישום



בתגובה חיסונית של עדר ובהגנה המוקנית לעדר, המעריך בעל המשמעות הרבה ביותר הוא מספר בעלי החיים שאינם מגיבים לחיסון, או מספר המגיבים לעומת הלא מגיבים. יש לראות איך לגרום לצמצם את מספרם של אלה האחרונים. לאחר חיסון שני, מספר הלא מגיבים מצטמצם בפקטור 2, 6 או 12. אך בדיקת יעילות מעשית של התרכיב תהיה עם הופעת המחלה בשדה. בשנת 2008 איתרע המזל ופרצה מחלת קדחת שלושת הימים גם באזורי המשקים המחוסנים וכך ניתן היה לבדוק את איכות ויעילות החיסון של מחוסנות לעומת לא מחוסנות, את יעילות חיסון הדחף לאחר חודש, את יעילות החיסון החוזר לאחר שנה ואת השפעת החיסון על צמצום נזקי ההפסדים בחלב, כל זאת במשקים שחוסנו ב - 2007 וב - 2008. המעקב אחר יעילות החיסון בוצע כחלק מעבודת הדוקטורט בבית הספר לרפואה וטרינרית של גב' אורלי עזיז-בוארון. בנושא קדחת קיקיונית.

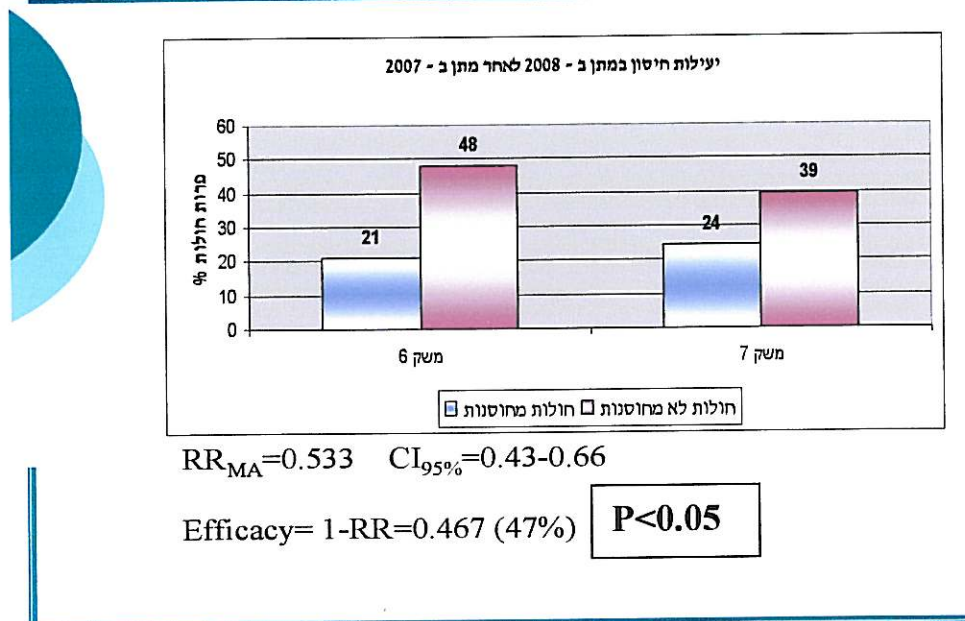
רישום 3א.

רישום 3א ו-3ב. מסכם את נתוני התחלואה ב- 7 משקים, הנתונים מצביעים על העובדה כי % החולות



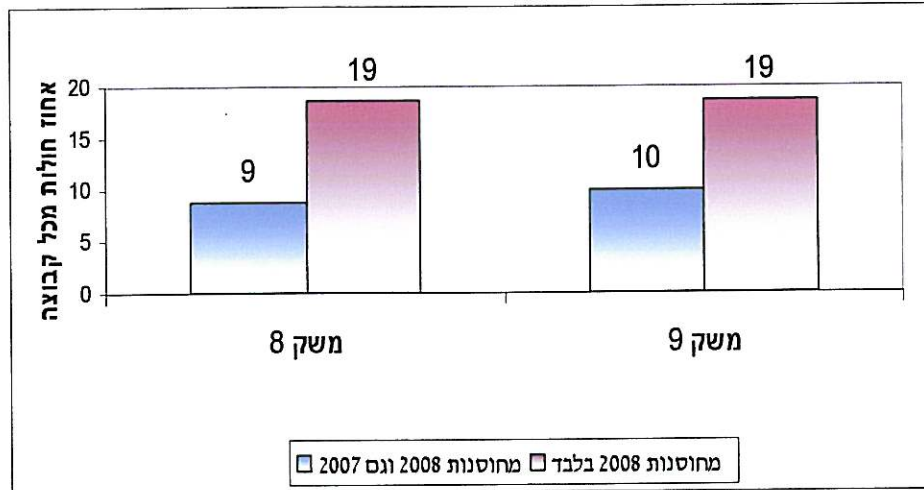
בקבוצת המחוסנות היה נמוך בחלק מהמשקים מ- % החולות בקבוצת הלא מחוסנות. מסקנה זו נכונה לגבי 4 משקים משק 3, 4, 6 ו-7 בהם אחוזי החולות מקרב המחוסנות היה נמוך משמעותית. משקים 6 ו-7 בהם בוצע חיסון עוקב משך שנתיים מציגים את התוצאות היותר טובות.

רישום 3ב.



חיסון הדחף במשקים 8 ו-9 מסוכם ברישום 4, נמצא כי חיסון כפול מביא לצמצום מספר החולות ב- 50% לעומת הקבוצות המחסנות פעם אחת בלבד.

רישום 4. יעילות חיסון 2008, מחוסנות פעמיים לעומת פעם אחת.



$$RR_{MA}=0.5 \quad CI_{95\%}=0.34-0.73$$

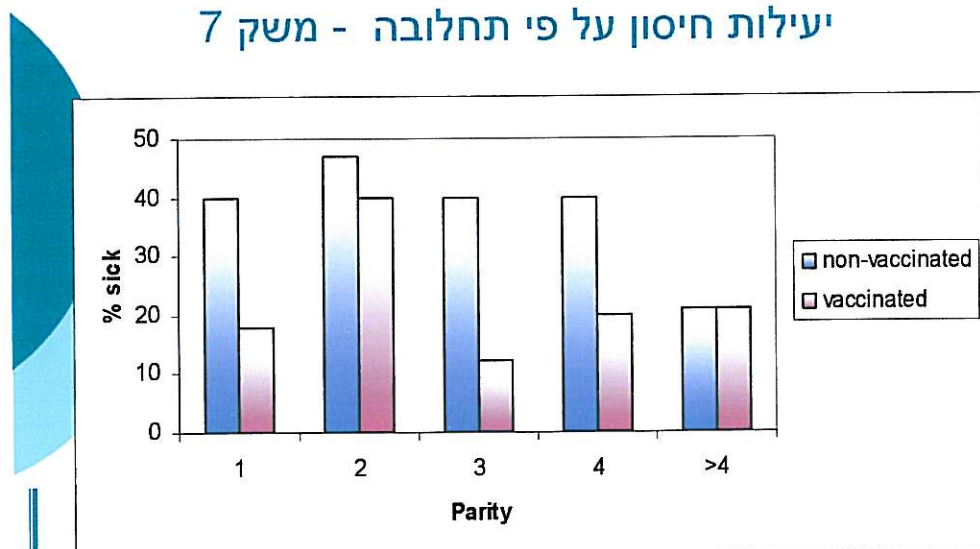
$$P<0.0001$$

סיכון יחסי מחוסנת (2007 וגם 2008) לעומת מחוסנת ב- 2008 בלבד = 0.5

יעילות החיסון ביחס לגיל הפרות המצוין כמספר התחלובה נבדק במשק 7. הנתונים מראים כי גיל הפרה אינו גורם משפיע על תוצאות החיסון. נראה כי מספר החיסונים והעובדה כי חוסנו או לא בשנה קודמת הם הגורמים לצמצום ניכר של מספר החולות בקרב המחסנות (רישום 5).

רישום 5.

יעילות חיסון על פי תחלובה - משק 7



P-value (adjusted for parity) = 0.001

מסקנות

1. התרכיב מעורר תגובה חיסונית הומורלית, ותגובה משמעותית ברורה לחיסון הדחף.
2. לא הובחנו הבדלים בתגובה החיסונית בין קבוצות הגיל השונות.
3. כייל הנוגדנים לאחר חיסון שני עולה מדרגה באופן משמעותי לעומת חיסון ראשון. כייל נוגדנים $2^{6.5}$ לעומת 2^9 .
4. במהלך שנת 2008 בוצעו ניסיונות חיסון בהיקף דומה לשנה קודמת, 12 משקים. נתונים שהתקבלו מניסיונות אלה בעקבות התפרצות המחלה גם במשקים המחוסנים העידו על יעילות התרכיב בצמצום ממדי הנזק.

ספרות

1. Cameron, C.M., Barnard, B.J.H., Erasmus, E. & Botha, W.J.S., 1987. Antibody response in cattle to oil emulsion rabies and Ephemeral fever vaccines. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 54, 157-158.
2. Davies, F.G., & Walker, A.R., 1974. The isolation of ephemeral fever virus from cattle and Colicoides midges in Kenya. The Veterinary Record, 95, 63-64.
3. Davis, S.S., Gibson, D.S. & Clark, R., 1984. The effect of bovine ephemeral fever on milk production. Australian Veterinary Journal, 61, 128-129.
4. Della-Porta, A.J. & Snowdon, W.A., 1979. An Experimental inactivated virus vaccine against bovine ephemeral fever. I. Studies of the virus. Veterinary Medical Association, 45, 240.
5. Snowdon, W.A., 1970. Bovine Ephemeral fever: The reaction of cattle to different strains of ephemeral fever virus and the antigenic comparison of two strains of virus. Australian Veterinary Journal, 46, 258-266.
6. St. George, T. D., 1986. The epidemiology of bovine ephemeral fever in Australia and its economic effect. In: St. George, T. D., Kay, B.H. & Blok, J., (eds). Proceedings of the Fourth Symposium on Arbovirus Research in Australia, Brisbane, Australia 6-9 May 1986. Canberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.

7. St. George, T. D., Uren, M.F. & Zakrzewski, H., 1986. The pathogenesis and treatment of bovine ephemeral fever. In: St. George, T. D., Kay, B.H. & Blok, J., (eds). Proceedings of the fourth Symposium on Arbovirus Research In Australia, Brisbane, Australia 6-9 May 1986. Canberra: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
8. Theiler, A., 1908. Stiff sickness or three day sickness of cattle. Reports of the Government Veterinary Bacteriologist, 1906-07, 22-23.
9. Theodoridis, A., Boshoff, S.E.T. & Botha, M.J., 1973. Studies on the development of a vaccine against bovine ephemeral fever. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 40, 77-82.
10. Theodoridis, A., Giesecke, W.H. & Du Toit, I.J., 1973. Effect of ephemeral fever on milk production and reproduction of dairy cattle. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 40, 83-91.
11. Uren, M.,F., 1992. Bovine ephemeral fever, pathology, virology, serology. Australian standard diagnostic techniques for animal diseases.
12. Uren, M.,F., Walker, P.J., Zakrzewski, H., St. George, T.D. and Byrne, K.B., 1994. Effective vaccination of cattle using the virion G protein of bovine ephemeral fever virus as an antigen. Vaccine, 12, 845-850.
13. Vanselow, B.A., Walthall, J.C., Abetz, I., 1995. Field trials of ephemeral fever vaccines. Veterinary Microbiology, 46, 117-130.
14. Vanselow, B.A., Abetz, I., Trenfield, K., 1985. A bovine ephemeral fever vaccine incorporating adjuvant Quail A: A comparative study using adjuvants Quail A, aluminium hydroxide gellant dextarn sulphate. Veterinary Record 117, 37-43.
15. Van Der Westhuizen, B., 1967. Studies on bovine ephemeral fever. I. Isolation and preliminary characterization of a virus from natural and experimentally produced cases of bovine ephemeral fever. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 34, 29-40.
16. Young, E. & Van den Heever, L.W., 1969. The African buffalo as a source of food and by-products. Journal of the south African Veterinary Medical association, 40, 83-88.
17. Young, P.L. & Spradbrow, P.B., 1985. Transmission of virus from serosal fluids and demonstration of antigen in neutrophils and mesothelial cells of cattle infected with bovine ephemeral fever. Veterinary Microbiology, 10, 199-207.

18. Yeruham, I., Van Ham, M., Bar, D., Tiomkin, D., 2002. Bovine Ephemeral fever - economic aspects of 1999 outbreak in the Jordan Valley. In pres.

פיתוח תרכיב כנגד קדחת שלושת הימים

קדחת שלושת הימים זו מחלה נגיפית בבקר המועברת על ידי יתושים ויבחושים. המחלה מופיעה בישראל מידי מספר שנים באופן בלתי צפוי ובלתי חזוי וגורמת לנזקים כלכליים המתבטאים בירידה משמעותית בתנובת החלב, משך ימי המחלה. בדרך כלל תקופת המחלה מסתכמת ב- 3 עד 8 ימים (10, 3), המחלה מלווה לעיתים בהפלות בסדר גודל של 2.5% ותמותה בשיעור של 4% (6). בשנים 1999, 2000, ו- 2001 הופיעה המחלה בישראל באופן רציף. בשנים 2002 ו- 2003 לא נרשמו מקרים חדשים של המחלה, אך ניתן היה לשער כי המחלה תלווה את משק החלב גם בעתיד ואכן בתחילת קיץ 2004 הופיע המחלה מחדש. בתחילת יוני נרשמו מקרים ראשונים ביישובים מצפון לרצועת עזה ובהמשך התפשטה המחלה בכל הדרום ואף ביוטבתה. משם עברה המחלה צפונה לאורך מישור החוף ובספטמבר מרבית המקרים נרשמו בעמק הירדן. ב- 2008 הופיעה המחלה שוב במתכונת דומה לאירועי 2004. כמחלה נגיפית ניתן לפקח על הופעתה על ידי הדברת המעביר או חיסון הפונדקאי, קרי, הבקר.

סיכום תוצאות שנים קודמות: בעבודה זו, הוצע לפתח תרכיב מבידוד מקומי של נגיף קדחת שלושת הימים על בסיס של נגיף מומת ולבצע את בדיקות הבטיחות והיעילות המחייבות לגבי תרכיבים כנ"ל. בניסיונות ראשוניים גודל הנגיף בתרביות תאי VERO בכמות של מספר ליטרים ונערכו ניסיונות ריכוז אנטיגן לאחר אינאקטיבציה. חיסון ניסיוני של עופות עם אצווה חדשה של אנטיגן מרוכז, נתן כייל נוגדנים משביע רצון.

בהמשך, נערכו ניסיונות חוזרים לריבוי הנגיף לאחר התאמה לתאי BHK ובדיקת הכייל בתרביות תאי VERO. הנגיף עבר אינאקטיבציה באמצעות בטה- פרופיולקטון ותהליך ריכוז בשיטת האולטרא פילטרציה. פורמולציה של תרכיב סופי הוכנה בשמן מינרלי כאמולסיה כפולה. בדיקות בטיחות מעבדה עברו בהצלחה. ניסיון חיסון ראשון בוצע ב- 2004. התוצאות נראו מבטיחות, הקבוצה אשר קיבלה חיסון כפול הראתה עלייה בכייל הנוגדנים בכל הפרטים עד חודשיים לאחר החיסון השני. חיסון בודד הביא לעלייה בכייל נוגדנים רק במחצית מהפרטים בקבוצה. ב- 2005 ו- נערכו 2006 ניסיונות חיסון חוזרים באחד ממשקי בקעת הירדן. ניסיונות אלה הוכיחו את יעילות התרכיב בהקניית רמת נוגדנים המקובלת כמגינה ונמשכה לאורך זמן, עד תום תקופת פעילות מעביר המחלה עם כניסת החורף.

ב - 2007 יצאנו למבצע חיסון ומעקב נרחב ב - 11 משקים בבקעה ובעמק הירדן. התוצאות החיוביות בעת השימוש בתרכיב חזרו על עצמן, מבצע זה חזר על עצמו ב - 2008 מלווה הוקעה טבעית של התפרצות המחלה בשדה. התפרצות זו לוותה במעקב אפידמיולוגי אשר הניב תוצאות המצביעות על

יעילות תרכיב של 50% לפחות. צמצום נזקי המחלה באמצעות עלות חיסון מצדיקה בהחלט את ההוצאה ונתונים אלה מהווים תחזית מבטיחה לחיסון ככלי יעיל להתמודדות עם המחלה.

Abstract

Development of a local Israeli vaccine against Bovine Ephemeral Fever.

Bovine Ephemeral fever (BEF) is a cattle arbo viral disease transmitted by mosquitoes. During the last decades the disease has appeared every few years in unexpected and unpredictable times causing economic damage expressed by significant drops in milk production. Duration of the disease is 3 – 8 days, some times accompanied by abortion of about 2.5% of the herd while mortality may be up to 4%.

Previous outbreaks in Israel were recorded in 1990-1991 and 1999-2001. In 2004 the disease appeared again in May, earlier then expected, with first cases in the south coast region spreading along the coast to the north and the center of the country and in September outbreaks appeared in the Jordan valley. Even in the dry area of the south Arava valley BEF was identified and isolated. As a non-contagious vector-transmitted viral arbo disease it can be controlled by vector eradication or host vaccination.

This work proposed the development of an inactivated BEF vaccine, comprising a local isolate accompanied by all vaccine control procedures.

In the first trails, BEF virus was adapted to Vero cells cultivated to several liter cultures and after an inactivation process a concentration step was introduced. Preliminary vaccination of cattle failed but experimental immunization of chickens with a new vaccine batch produced satisfied antibody level.

Later repeated experiments were performed for adaptation of the BEF virus to BHK cell cultures. Different parameters influencing virus growth were tested. Ultrafiltration concentrated antigen was formulated as vaccine in double oil emulsion adjuvant. Safety assay of this batch was successful.

The first results of calf vaccination with the first batch of vaccine were promising while extensive vaccination campaign in 2005 and 2006 provided reliable serological results. In the present reporting year of 2007 the field trial was expanded to 11 dairy farms in the Jordan valley. The serological results of these trials proved again the serological efficacy of the vaccine.