

דו"ח סופי לתכנית מחקר – 705-0020-07

**בחינת יעילות ופרוטוקול חיסון בנגיף אבעבועות צאן מוחלש זן RM65 למניעת**

**קטרת העור בבקר**

מוגש להנהלת מועצת החלב ע"י

ד"ר אייל קלמנט ביה"ס לרפואה וטרינרית ע"ש קורט, הפקולטה ע"ש סמית

לחקלאות, מזון וסביבה, האוניברסיטה העברית

ד"ר חגי ידין החטיבה לוירולוגיה – מכון קמרון, השירותים הוטרינרים

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)*

Hagai Yadin

*Kimron Veterinary institute, P.O.B. 12, 50250 Bet Dagan,*

*Israel. E-mail: [yadinh@int.gov.il](mailto:yadinh@int.gov.il)*

פברואר 2009

הממצאים במחקר זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר:



## **Abstract**

Lumpy skin disease (LSD) is a disease of cattle caused by a capripox virus of the family Poxviridae. The most prominent clinical sign of LSD is the appearance of typical skin lesions (lumps). Others characteristic of the disease are fever, enlarge lymph nodes, and lethargy. Although mortality is relatively low (about 10%), it causes severe economic damages as a result of defective skin, decrease in milk production, weight loss, and infertility. LSD is enzootic in most of Africa's states. In Israel, the disease was first diagnosed in 1989 at Peduim (south of Israel). It has since occurred in 2006 at Ein-zurim and in 2007 in number of farms surrounding Gaza strip. The latest outbreaks in Israel emphasize the importance of finding an efficient method for preventing LSD and raises doubts regarding the efficacy of the existent vaccine; Because of the antigenic resemblance between lumpy skin disease virus and the other pox viruses, there are some vaccines based on attenuated strains of sheep-pox virus. After the outbreak in 2006, all the cattle in southern of Israel area were vaccinated by RM-65 sheep-pox vaccine. Apart of two cows affected in two herds close to the first outbreak, no other herds were affected. The outbreak on 2007, which occurred in vaccinated herds, creates doubts regarding the vaccine efficacy. Some researches had shown that effective vaccines against LSD induce antibody reaction even though the titers are not high. Although it is accepted that the immune reaction against LSD is mainly cell mediated, we assumed that a connection can be found between the antibody titers in the serum and protection from the disease. We assume that association would allow us to estimate the vaccine efficacy.

## **Results:**

Lumpy skin disease virus and sheep-pox virus were isolated from the skin sample and vaccine respectively. Examination of the two isolations in electron microscopy showed that both contain a virus which equally reproduces in the cells.

The results of antibody levels within blood samples from the infected and vaccinated herds did not succeed to support the connection between antibody levels and protection from the disease. Our findings show that vaccination by RM-65 vaccine induces a very slight antibody reaction if any at all, and the high antibody levels in the infected herds are attributed to the natural exposure for the virus.

## תקציר

קטרת העור (Lumpy skin disease) היא מחלה נגיפית, הנגרמת על-ידי נגיף ממין Capripox, ממשפחת ה-Poxviridae, ופוגעת בבקר. הסממן הקליני הבולט ביותר של המחלה הוא הופעת גושים תחומים על העור (קטריות). בין היתר תתכן הופעת חום גבוה, קשרי לימפה מוגדלים, וכיבים בריריות. למרות שקטלניות המחלה נמוכה יחסית (כ-10% לערך), היא גורמת לנזקים כלכליים קשים בשל פגיעה בעור, תפוקת חלב ירודה, ירידה במשקל, חוסר פוריות ותמותה. קטרת העור אנזואוטית בכל מדינות אפריקה. המחלה התפרצה לראשונה בישראל ב-1989, בפדויים שבדרום הארץ, ולאחר מכן התרחשו התפרצויות בישראל גם ב-2006, בעין-צורים, וב-2007, במספר ישובים מסביב לרצועת עזה. ההתפרצויות שאירעו לאחרונה בישראל הדגישו את החשיבות במציאת אמצעים יעילים למניעת קטרת העור והעלו ספקות לגבי יעילות התרכיב הקיים בהגנה מפני קטרת העור. בשל הדמיון האנטיגני הרב בין נגיף קטרת העור לנגיפי ה-Capripox האחרים, קיימים מספר תרכיבים המבוססים על זנים מוחלשים של אבעבועות צאן. בהתפרצות קטרת העור ב-2006 חוסן כל אזור הדרום בתרכיב אבעבועות צאן RM-65, ונדמה היה כי התרכיב בלם את ההתפשטות למשקים נוספים. אולם, ההתפרצות הגדולה ב-2007 אשר ארעה במשקים מחוסנים מעמידה בספק את יעילותו של התרכיב. מספר מחקרים הראו כי תרכיבים יעילים כנגד קטרת העור משרים תגובה נוגדנית גם אם לא גבוהה. למרות שמקובל לחשוב כי התגובה החיסונית כנגד קטרת העור היא מתווכת תאית בעיקרה, שיערנו כי ימצא קשר בין רמות הנוגדנים בדם לבין הגנה מפני המחלה וכי הדבר יאפשר את הערכת יעילותו של התרכיב.

### תוצאות:

נגיף קטרת העור ונגיף אבעבועות הצאן מהתרכיב RM-65 בודדו מרקמת עור ומהתרכיב בהתאמה. בחינה של הבידודים במיקרוסקופ אלקטרוני העלתה כי שניהם מכילים נגיף שהתרבה בצורה שווה בתאים. תוצאות בדיקת רמת הנוגדנים בנסיובים מהמשקים הנגועים והמחוסנים לא הצליחו לתמוך בקיום קשר בין רמת הנוגדנים לבין הגנה מפני המחלה.

### מסקנה:

לסיכום, ממצאינו מראים כי חיסון בתרכיב האמור משרה תגובה נוגדנית קלה בלבד אם בכלל וכי את רמות הנוגדנים הגבוהות במשקים הנגועים ניתן בעיקר לשייך לחשיפה טבעית לנגיף. הסיבה לחוסר יעילותו של התרכיב צריכה להיחקר בהמשך.

## מבוא:

קטרת העור (Lumpy skin disease) היא מחלה נגיפית הנגרמת על-ידי נגיף ממין ה-Capripoxvirus, ממשפחת ה-poxviridae, ופוגעת בבקר (Carn, 1993). שלושת זני ה-Capripox הידועים הם ה-Sheeppox (פוגע בכבשים), Goatpox (עיזים), ו-Lumpy skin disease virus (בקר).

המחלה מאופיינת בהופעת גושים תחומים על העור (קטריות) בקוטר הנע בין 0.5 ל-5 ס"מ. במקביל תתכן הופעת חום גבוה, קשרי למפה מוגדלים, וכיבים על הריריות, בעיקר סביב הפה. המחלה יכולה להתבטא בצורה אקוטית, סאב-אקוטית וכרונית. במקרים רבים התחלואה היא תת-קלינית ובאחד המחקרים אף נמצא כי רק 40-50% מחיות שהודבקו במהלך ניסוי פיתחו נגעים עוריים (Weiss, 1968). הופעת הקטריות מתרחשת בדרך כלל במהלך 48 השעות מרגע עליית החום. המופע יכול להיות נקודתי, כמספר קטריות בלבד, או מפושת בכל הגוף. אחוז התחלואה בהתפרצויות יכול לנוע בין 3% ל-85%. קטלניות המחלה היא כ-10% לערך (Carn, 1993).

למרות שקטלניותה נמוכה יחסית, המחלה גורמת לנזקים כלכליים קשים בשל פגיעה בעור (פגיעה בטבחה), תפוקת חלב ירודה, ירידה במשקל, חוסר פוריות ותמותה. פרות הרות עלולות להפיל, וחוסר הפוריות עלול להמשך מספר חודשים (Weiss, 1968). בשל כך ובשל פוטנציאל ההדבקה הגבוה שלה, שייכת קטרת העור לרשימת המחלות המחייבות דיווח של ה-OIE (OIE, 2004).

קטרת העור זוהתה לראשונה בצפון זמביה ב-1929. בתחילה העריכו כי התופעה היא תגובה אלרגית לעקיצות חרקים (MacDonald, 1931) או צמחים (Le Roux, 1945). ב-1945 התרחשה התפרצות בדרום-אפריקה, שם קיבלה המחלה את שמה קטרת העור (Lumpy skin disease). כמו כן הודגמה העברה של הגורם המזהם על ידי הזרקת תרחיף של קטרית לפרה (Thomas, 1945). משם התפשטה המחלה צפונה לקניה (1957), ולמערב אפריקה, עד שזוהתה במצרים ב-1988, באיסמעליה ובאל-עריש. כיום המחלה אנזואוטית בכל מדינות אפריקה שמדרום למדבר סהרה (OIE, 2004). בשנת 1989, הופיעה המחלה לראשונה בישראל, במושב פדויים שבנגב המערבי (Yeruham et al., 1995). ההתפרצות בארץ התרחשה מספר חודשים לאחר ההתפרצויות באיסמעליה ובאל-עריש. המחלה פגעה נקודתית רק בפדויים וגררה השמדה מוחלטת של כל העדרים במושב. ההשערה הרווחת באשר לסיבת ההתפשטות של המחלה לישראל היא כי הווקטור הוסע על ידי רוחות ממצרים (Yeruham et al., 1995). מאז נעלמה המחלה מישראל והופיעה שוב רק לאחר 17 שנה, ב-2006 בקיבוץ עין-צורים המצוי 24.5 ק"מ מצפון לרצועת עזה. כתוצאה מן ההתפרצות הוצאו מן העדר 207 פרות (מעל 30% מן העדר) והנזקים הכלכליים נאמדו במיליוני שקלים. בשנה זו פגעה המחלה בצורה נקודתית בקיבוץ עין צורים, ללא התפשטות לעדרים אחרים, למעט 2 פרות בודדות בשפיר ובכפר וורבורג. נראה היה כי ההתפרצות חלפה, אך ביוני 2007 המחלה תקפה בשלישית והפעם בעדרים מחוסנים. תחילה

הופיעה המחלה בעלומים, לאחר מכן באור-הנר, קודם בעדר הבקר לבשר ולאחר מכן התפשטה גם לעדר הבקר לחלב. אחר-כך חלו התפרצויות בסדרי גודל שונים בחוות השקמים וניר-עם בעדרי בקר לבשר, ובארז, בעדר הבקר לבשר ומספר שבועות לאחר מכן גם בעדר הבקר לחלב. מקרים ספוראדיים התרחשו גם ביד-מרדכי ודורות. מדיווחים לא רשמיים עולה כי המחלה התפרצה באזור בית-חאנון שברצועת עזה כחודש עד חודשיים לפני ההתפרצות בישראל. לאור זאת, קיים החשש כי המחלה הגיע לישראל מרצועת עזה וזאת על רקע חוסר פיקוח מאורגן על הכנסת בקר לרצועה ועל השמדת בקר נגוע.

קיימים מספר תרכיבים להגנה מפני קטרת העור, הנחלקים לכאלו המבוססים על זנים מוחלשים שונים של קטרת העור, ולאחרים המבוססים על נגיף אבעבועות הצאן, זאת בשל הדמיון האנטיגני הרב בין נגיף קטרת העור לנגיפי ה-Capripox האחרים (Tulman et al., 2002). בנוסף לא ניתן להבחין באמצעות נוגדנים מנטרלים בין זני ה-Capripox viruses השונים (Kitching et al., 1986). בעבר הראו כי חיסון בנגיף אבעבועות צאן מקנה הגנה בפני הוקעה עם נגיף אלס של קטרת העור (Capstick 1961). שימוש בנגיף זה בקניה בשנים 1958-1959 הראה כי הוא אינו גורם לתופעות לוואי משמעותיות. לעומת זאת, שימוש בנגיף קטרת העור מזן Neethling מוחלש, ומזן KS-1 Capripox גרמו לתופעות לוואי מקומיות קשות המתבטאות בהופעת תסמינים של המחלה (Carn, 1993). אי-לכך, עקב ההתפרצות בישראל ב-2006, שארעה בתקופה בה העדרים לא היו מחוסנים, החלו השירותים הווטרינרים בחיסון נרחב בתרכיב אבעבועות צאן מוחלש מזן RM-65 (המיוצר על-ידי חברת אביק), בכל אזור הדרום עד קו בארות יצחק. התפשטות המחלה ב-2006 נבלמה ככל הנראה בעזרת המדיניות שנקטה אשר כללה הוצאה מהעדר של כל פרה נגועה. כן ייחסו את בלימת המחלה לחיסון. למרות זאת, כל העדרים בהם מתפרצת המחלה ב-2007 היו מחוסנים, כאשר מפתיעים בייחוד הממצאים באור-הנר בה התפרצה המחלה בעדר שחוסן אך חודשיים לפני כן, ובארז בעדר שחוסן חודש וחצי בלבד לפני ההתפרצות. לפיכך קיים החשש כי התרכיב הניתן כיום ו/או פרוטוקול החיסון אינם מאפשרים הגנה מספקת לאחר חשיפה לנגיף. לאחר ההתפרצות ב-2007, החל שימוש בתרכיב המבוסס על אותו נגיף (זן RM65) אולם עקב זכייה במכרז הוחלף היצרן והתרכיב בו נעשה שימוש כיום הינו תרכיב JOVIVAC™ של חברת JOVAC™ הירדנית.

### **מטרת המחקר:**

בדיקת נוכחות נגיף בתרכיב RM-65, על-ידי פיתוח מערכת בידוד נגיף ומתרכיב וזיהוי הנגיף במיקרוסקופ אלקטרוני. כמו-כן, בדיקת התגובה הנוגדנית לנגיף קטרת העור ונגיף אבעבועות הצאן המוחלש במספר משקים בזמנים שונים לאחר החיסון.

## שיטות וחומרים

### 1. אוכלוסיית המחקר

התפרצות של מחלת קטרת העור החלה בעדר החלב בעלומים שבדרום הארץ בתאריך ה-9.6.07, כשנה לאחר ההתפרצות בעין-צורים ב-2006. כשבועיים לאחר מכן, החלה התפרצות נוספת באור-הנר, ב-3 עדרי הבקר לבשר ובעדר החלב. באמצע יולי, החלו התפרצויות נוספות גם בחוות השקמים, ניר-עם וארז, בעדרי הבקר לבשר שבהם, ורפת החלב בארז. כמו-כן אירעו התפרצויות נקודתיות גם ביד-מרדכי ובדורות, במהלך אוגוסט ונובמבר בהתאמה (טבלה מס' 1).

עקב ההתפרצות בעין-צורים ב-2006, כל העדרים בהם ארעה ההתפרצות ב-2007 הם עדרי מחוסנים (תרכיב RM-65, חברת "אביקי"), בתקופה של שמונה חודשים עד חודש לפני ההתפרצות. מרגע גילוי ההתפרצות בכל עדר התבצע מעקב אחר התפשטות המחלה בעדר. כל פרה שהראתה סימנים קליניים בודדה, והושמדה בדרך-כלל באותו היום. כמו-כן, כל עדר (למעט ארז) חוסן שוב בעת גילוי המחלה בעדר, ללא קשר למועד החיסון האחרון של המשק (טבלה מס' 1).

טבלה מס' 1: משקים נגועים בקטרת העור בהתפרצות 2007

שם היישוב	תאריך מקרה ראשון	סוג עדר	גודל עדר לפני ההתפרצות	מספר פרות נפגעות	אחוז פרות נפגעות	תאריך חיסונים אחרונים
עלומים	9.6.07	בקר לחלב	547	45	8%	דצמבר, 2006 + בעת גילוי ההתפרצות
אור הנר	24.6.07	בקר לבשר	196	127	64.8%	05/04/2007
	2.7.07	עגלי פיטום שחור לבן	60	17	28.33%	05/04/2007
	4.7.07	בקר לחלב	500	43	8.6%	14/11/06 + בעת גילוי ההתפרצות בעלומים
חוות השקמים	19.7.07		270	27	10%	אפריל 2006+
ניר עם	26.7.07	בקר לבשר	256	98	38.3%	
ארז	27.7.07	בקר לבשר (מרעה צפוני)	223(מאוחד)	101	45.3%	+ 08/01/07
	2.8.07	בקר לבשר (מרעה דרומי)	עם המרעה הדרומי	39	7.5%	18/06/07+ 16/04/07 לא מחוסן שוב בעת גילוי ההתפרצות
13.8.07	עדר בקר לחלב	520				
יד מרדכי	9.8.07	בקר לבשר	900	9	1%	יוני 2006 (בעת ההתפרצות בעלומים)
דורות	1.11.07	בקר	800	4	0.5%	יולי 2006 + 3 ימים לפני ההתפרצות

רמות הנוגדנים נבדקו ב-3 משקים:

משק עין צורים ב-2006 – 158 פרות נדגמו שבועיים לאחר מתן חיסון וחודש לאחר תחילת ההתפרצות.

משק עלומים – חצי שנה לאחר חיסון ו-3 ימים לאחר תחילת ההתפרצות נדגמו 191 פרות

משק אור-הנר – חודשיים לאחר חיסון ו-3 ימים לאחר תחילת ההתפרצות נדגמו 56 פרות

## 2. בידוד הנגיף מקטרית ומתרכיב

**הכנת הרקמה** - בידוד הנגיף התבצע לפי פרוטוקול מהמעבדות הרפרנטיות ב-Pirbright. רקמת הקטרית נחתכה לפיסות קטנות בעזרת סכין סטרילית, ולאחר מכן נכתשה במכתש ועלי סטריליים. לרקמה הכתושה הוספו 6 ml של PBS (Phosphate buffered saline) עם קלציום ומגנזיום, המכיל ג'נטמיצין (0.1 mg/ml), אמפיצילין (0.05 mg/ml) ואמפוטריצין B (5 ug/ml). לאחר מכן התערובת הועברה למבחנה, ושהתה לילה ב-4°C. בשלב הבא עברה הרקמה סוניקציה ל-30 שניות על מנת ליצור חרירים בממברנת התאים דרכם ייצא הנגיף, וסרכוז של 3000 rpm ל-10 דקות. הנוזל העליון הועבר לכלי אחר, ועבר סינון דרך פילטר של 0.45 מיקרומטר.

**מיהול התרכיב** - לתוך בקבוקון של תרכיב אבעבועות צאן RM-65 חי מוחלש הוזרקו 1 ml מים סטריליים (DDW). ניתן לבצע את ההדבקה מיד לאחר מיהול התרכיב. הבקבוקון נשמר ב-4°C. **הדבקת התאים** - ההדבקה בוצעה בתאי Lamb testis cells (ATTC) (OA3.Ts cell line), שגודלו על Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) המכיל בופר HEPES, 10% Foetal calf serum (FCS), פניצילין-סטרפטומיציין (100 IU/ug per ml), וג'נטמיצין (0.05 mg/ml). מפלאסק של 50cm<sup>2</sup> (המכיל 30 ml מדיום), שהתאים בו ממלאים כ-50% מהמרבד, נשפך חצי מהמדיום של התרבית (כ-15 ml). התאים הודבקו עם 0.5 ml של תמיסת הרקמה המסוננת, או של תרכיב החיסון המהול. תרבית התאים שהתה שעתיים באינקובטור 37°C, ולאחר מכן נשטפה עם PBS ללא קלציום ומגנזיום. לאחר השטיפה הוסף לתרבית DMEM חדש שתכולתו זהה לזה ששהו בו התאים לפני ההדבקה, פרט ל-FCS, שריכוזו 2% בלבד. הורדת ריכוז ה-FCS מעכבת את גדילת התאים וחלוקתם, ומאפשרת לתרבית התאים להישאר חיונית עד הופעת האפקט הציטופתי של הנגיף. הפלאסק נצפה במשך כל יום לאחר ההדבקה ב-Inverted microscope לאיתור אפקט ציטופתי של הנגיף. האפקט יכול להופיע בין 5 ימים ל-14 יום לאחר הדבקה.

**קצירת הנגיף** - התאים נקצרו כאשר האפקט הציטופתי הופיע בכ-90% מהתאים בתרבית. בשלב ראשון נעטפו קצוות בקבוקי תרבית הרקמה ב-Parafilm על מנת למנוע זליגה של הנגיף החוצה. בקבוקי התרבית הוקפאו (ב-80°C) והופשרו (באינקובטור 37°C) 3 פעמים בכדי לשחרר את התאים מהמשטח ולגרום לפיצוץם (ניתן לנער קלות את הפלאסק כדי לזרז את התהליך). לאחר מכן הועבר תוכן בקבוקי הרקמה למבחנות 50 ml, ועברו סוניקציה ל-30 שניות בסוניקטור על מנת להוציא את הנגיף שנשאר בתוך התאים השלמים. בשלב הבא עברו מבחנות ה-50 ml צנטריפוגה ל-10 דקות ב-300 rpm, הנוזל העליון נאסף מהן (מחולק למבחנות או לאפנדורפים של 1.5 ml), ונשמר ב-20°C לטווח קצר וב-80°C לטווח ארוך.

### 3. מיקרוסקופ אלקטרוני חודר (TEM - Transmission Electron Microscopy)

**הכנת הרקמה ותרכיב החיסון** – הכנת רקמת הקטרית והתרכיב התבצעה באופן זהה להכנתם לצורך בידוד הנגיף.

**הדבקת התאים** – תאי OA3.Ts הודבקו באופן זהה להדבקת התאים לבידוד הנגיף, פרט לכך שההדבקה התבצעה על פלאסק גדול של  $75 \text{ cm}^2$  (מכיל 70 ml מדיום). הדבר הכרחי על מנת לקבל כמות מספקת של תאים ליצירת חתכים למיקרוסקופ האלקטרוני.

**קצירת התאים** – בשונה מתהליך הקצירה בבידוד נגיף, בו אנו מעוניינים בנגיף נקי יחסית ללא התאים מסביבו, בחתכי המיקרוסקופ האלקטרוני אנו מעוניינים לצפות בנגיף בתוך התאים. על כן בתהליך הקצירה הוקפאו והופשרו הפלאסקים (ב- $80^{\circ}\text{C}$  וב- $37^{\circ}\text{C}$  בהתאמה) רק פעם אחת (אחרי שנעטפו ב-parafilm על מנת למנוע זליגה). לאחר מכן גורדו התאים ממשטח הפלאסק בעזרת Policeman, והתוכן נשפה למבחנת 50 ml (מפלאסק גדול נוצרות שתי מבחנות). המבחנות עברו צנטריפוגה ל-7 דקות במהירות 5500 rpm, והנוזל העליון נשפך. התאים אמורים לתת פלט נאה של מספר מילימטרים.

**פיקסציה של התאים ל-TEM** – השלבים הבאים בוצעו במעבדה למיקרוסקופ אלקטרוני - לאחר שפיית הנוזל ממבחנות ה-50 ml, הוסף לכל מבחנה 250 ul של גלוטראלדהיד 3-5% (ב-0.1M בופר פוספט, PH 7.2). התאים מורחפים, וכל שתי מבחנות שהגיעו מאותו בקבוק רקמה מאוחדות לאפנדורף אחד המכיל 500 ul של גלוטראלדהיד. האפנדורפים עברו סרוז של 13,000 rpm למשך דקה, והגלוטראלדהיד נשפך. פלט התאים לאחר האיחוד אמור להיות כחצי סנטימטר ויותר. בשלב הבא כל אפנדורף הורחף מחדש עם 100 ul של גלוטראלדהיד, והמבחנות שהו שעתיים ב- $4^{\circ}\text{C}$ . לאחר שהייה נשטפו התאים בבופר פוספט, הורחפו עם אוסמיום 1% (1%  $\text{OsO}_4$  בבופר פוספט) ושהו ב- $4^{\circ}\text{C}$  ללילה.

לאחר השהיית הלילה נשטפו התאים 5 פעמים בבופר פוספט. לאחר כל שטיפה עוברות המבחנות צנטריפוגה ל-10 דקות. השלב הבא הוא תהליך הייבוש – הדגימות נשטפות עם אתנול בריכוזים עולים – 25%, 50%, 75% ו-100%. לאחר כל שטיפה עוברות המבחנות צנטריפוגה של 20 דקות. בשלב הבא עוברות המבחנות שתי שטיפות עם פרופילן-אוקסיד 100%. בשלב הבא מתחיל תהליך הקיבוע (Embedding) – השהייה ראשונה ל-30 דקות עם פרופילן-אוקסיד ו-Epon ביחסים 3:1 בהתאמה. לאחר מכן העלאת ריכוז ה-Epon להגעה ליחס 1:1 עם הפרופילן אוקסיד, והשהייה ל-30 דקות. בשלב הסופי מעלים את ריכוז ה-Epon ל-100%, ומשהים ללילה. לאחר ההשהייה מוכנסות הדגימות לחימום ב- $65^{\circ}\text{C}$  ל-24 שעות. הדגימות עוברות חיתוך ב-Ultramicrotome. עובי כל חתך כ-50nm.



#### 4. מערכת ה- (SNT) Serum Neutralization Test

מערכת ה-SNT הועמדה לפי פרוטוקול מהמעבדות הרפרנטיות ב-Pirbright, בשילוב עם פרוטוקול מהמכון הווטרינרי שנכתב ע"י ד"ר בוריס גלמן.

**מיהול וכיול רמת הנגיף** – המיהול והכיול בוצעו על נגיף שבודד מקטרית או מ-Lymph node. צד אחד של פלטת 96 באריות בעלת תחתית U סומן בעמודות מ-1 ל-6. העמודות הנותרות בפלטה שימשו כביקורת תאים. בוצעו מהולים עשרוניים (מ- $10^{-1}$  עד  $10^{-6}$ ) באופן הבא; בשלב ראשון חולקו 180 ul של מדיום תאים נקי (DMEM המכיל בופר HEPES) לכל הבאריות. בשלב השני הוספו 20 ul של נגיף ממבחנת הבידוד לעמודה הראשונה בלבד (מיהול  $10^{-1}$ ). מעמודה זו מועברים 20 ul לעמודה הבאה (מיהול  $10^{-2}$ ) עד לעמודה מס' 6. לאחר מכן מועברים 50 ul מכל בארית של פלטה זו, לפלטת 96 באריות בעלת תחתית שטוחה, שסומנה בצורה זהה לפלטה הקודמת. לכל הבאריות הוספו 150 ul תאי Lamb testis (ATTC, OA3.Ts cell line), שגודלו על Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) המכיל בופר HEPES, Foetal calf 10%, serum (FCS), פניצילין-סטרפטומיצין (100 IU/ug per ml), וגינטמיצין (0.05 mg/ml). התאים נותקו מהמרבד על ידי Trypsin-EDTA, והורחפו ביחס 1:2. הפלטות הוכנסו לאינקובטור  $37^{\circ}\text{C}$  ונבדקו לאפקט ציטופתי של הנגיף במשך 12 יום לאחר ההדבקה. תוצאות הטיטרציה להגעה ל-100 יחידות נגיף ( $10^{-2}$ ), 50% הדבקה ב-50 ul (Tissue culture infected)  $100\text{TCID}_{50}/50\text{ul}$  מחושבות על פי נוסחת Spearman-Kärber (dose 50 per 50ul):

$$X_0 - d/2 + d \cdot (\sum r/n)$$

כאשר  $X_0$  הוא ערך ה- $\text{Log}_{10}$  של המיהול הנמוך ביותר שהראה אפקט ציטופתי בכל הבאריות (למשל מיהול 4-). הערך  $d$  הוא אינטרוואל ה- $\text{Log}$  של המהולים (בדרך-כלל  $\log$  שלם, 1, או חצי  $\log$ ). הערך  $n$  הוא מספר הבאריות שיש בכל מיהול.  $r$  הוא מספר הבאריות החיוביות שיש בכל מיהול. הערך  $r/n$  הוא הפרופורציה של מספר הבאריות החיוביות מכל מיהול, מתוך מספר הבאריות הכולל שיש בכל מיהול. הערך  $\sum r/n$  הוא סכום הפרופורציות הללו, כאשר הערך הראשון בו מתחילים לסכום הוא המיהול בו עדיין יש 100% אפקט ציטופתי ( $n = r$ , ועל-כן הערך הראשון תמיד שווה ל-1). מהמיהול שמתקבל (למשל  $10^{-4.5}$ ) מפחיתים את המיהול הרצוי של הנגיף ( $10^{-2}$ , 100 יחידות) על מנת לדעת בכמה צריך למהול את הנגיף כדי להגיע ל- $100\text{TCID}_{50}/50\text{ul}$ .

**מערכת ה-Serum neutralization** - בדיקת נטרול הסרום בוצעו בפלטות 96 באריות בעלות תחתית שטוחה. הסרום נמהל על פני 8 באריות (ממיהול  $2^1$  עד  $2^8$ ), בדופליקטים – בתחילה הוספו לכל הבאריות 50 ul DMEM (המכיל HEPES). לאחר מכן לכל הבאריות בשורה הראשונה הוספו 50 ul מדגימת כל סרום. מהשורה הראשונה הועברו 50 ul לשורה השנייה, וכן

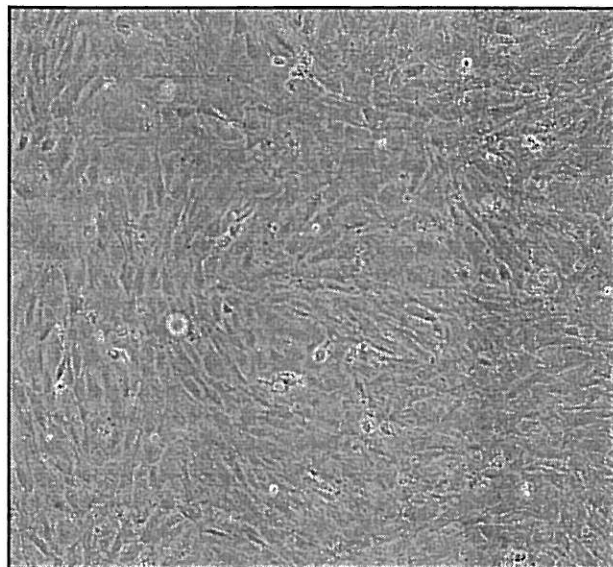
הלאה עד לשורה האחרונה של המיחול. הבדיקה הכילה בקורת חיובית (סרום חיובי ממכון Pirbright) ובקורת שלילית (Foetal calf serum). לכל הבאריות הוספו 50 ul של נגיף מכויל ל-100 יחידות TCID<sub>50</sub>, והפלטות הוכנסו לאינקובציה ב-37°C לחצי שעה, על מנת לאפשר נטרול של הנגיף על ידי הנוגדנים במידה וקיימים. לאחר האינקובציה הוספו לכל הבאריות 150 ul תאי Lamb testis (OA3.Ts cell line, ATTC), שגודלו על Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) המכיל בופר HEPES, 10% Foetal calf serum (FCS), פניצילין-סטרפטומיצין (100 IU/ug per ml), וגינטמיצין (0.05 mg/ml). התאים נותקו מהמרבד על ידי Trypsin-EDTA, והורחפו ביחס 2:1.

בנוסף לביקורת החיובית והשלילית של הסרום, לכל בדיקת נטרול סרומים התווספה פלטה נוספת של ביקורת תאים (cell control), וטיטור הנגיף (על מנת לוודא שאכן ב-50 ul היו 100 יחידות נגיף). בפלטה זו נמהל הנגיף בשלושה מהולים עשרוניים (מ-10<sup>-1</sup> עד 10<sup>-3</sup>). הפלטות הוכנסו לאינקובציה ב-37°C ונבדקו לאפקט ציטופתי עד 12 יום לאחר ביצוע הבדיקה.

## תוצאות

### 1. בידוד הנגיף מקטרית ומהתרכיב

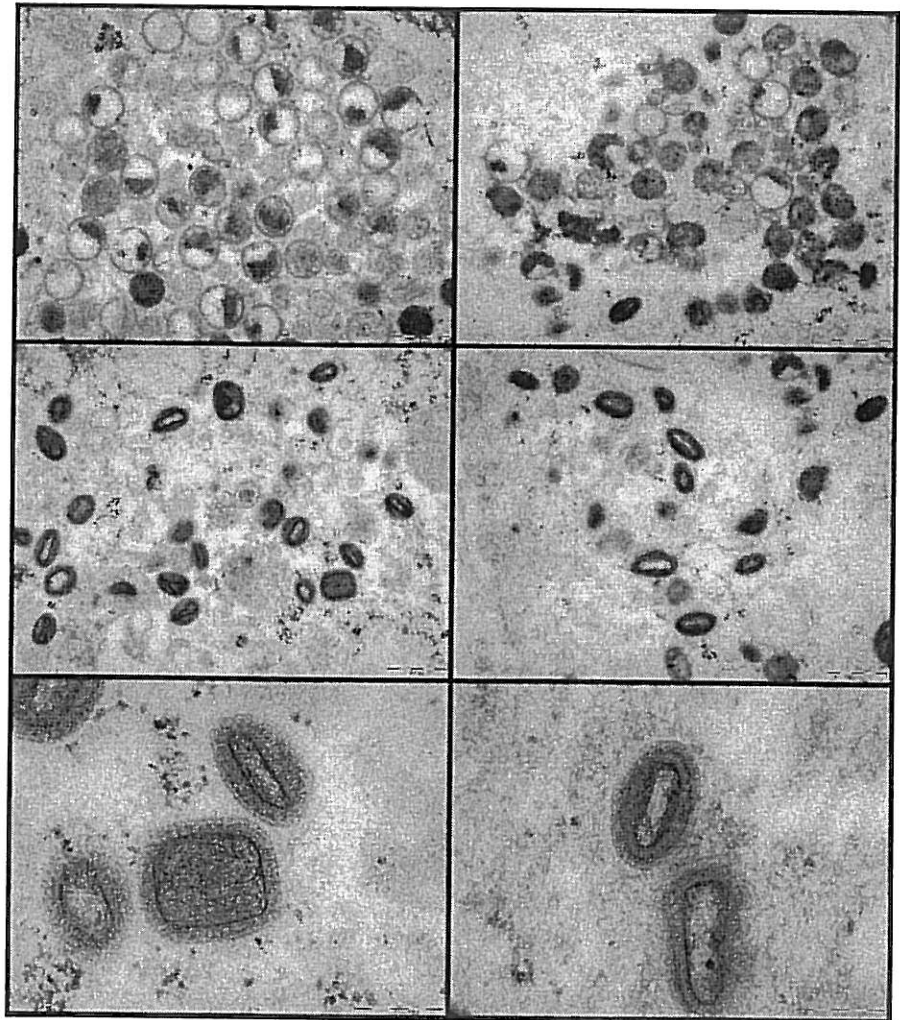
הנגיף בודד מקטרית של פרה מעלומים ומהתרכיב. לניסוי התבצעו 2 חזרות, ובכל אחת מהן ביקורת שלילית של תאים בלבד (איור מס' 1). האפקט הציטופתי של רוב נגיפי Pox- בכלל, ונגיף ה-LSD בפרט הוא התנפחות של התאים, בשל התרבות הנגיף בציטופלזמה. האפקט הציטופתי של נגיף אבעבועות הצאן היה שונה במעט מהאפקט של נגיף קטרית העור – התאים התנפחו לצורה עגולה יותר בהדבקה בתרכיב, לעומת הדבקה עם קטרית.



איור מס' 1: תרבית תאי OA3.Ts – Negative control

## 2. זיהוי הנגיף במיקרוסקופ אלקטרוני

הנגיף זוהה במיקרוסקופ אלקטרוני בבידוד מקטרית ומתרכיב החיסון (איור מס' 3). בשני הבידודים נראה הנגיף זהה לחלוטין, ובכל שלבי התפתחותו: בצורת חלקיקים לא בוגרים (IV-immature particle virus) ב-"viral factory", ובצורה הבוגרת יותר בציטופלזמה ללא המעטפת (intra-cellular naked virus -INV). נגיפים שייצאו מתא זה להדבקת תאים אחרים, ללא הריסת התא הנוכחי, ייעטפו במעטפת נוספת הנוצרת ממבראנת התא ממנו הם יוצאים. לא ניתן להבדיל בין נגיף קטרת העור ונגיף אבעבועות הצאן במיקרוסקופ האלקטרוני, מכיוון שהם זהים לחלוטין מבחינה מורפולוגית.

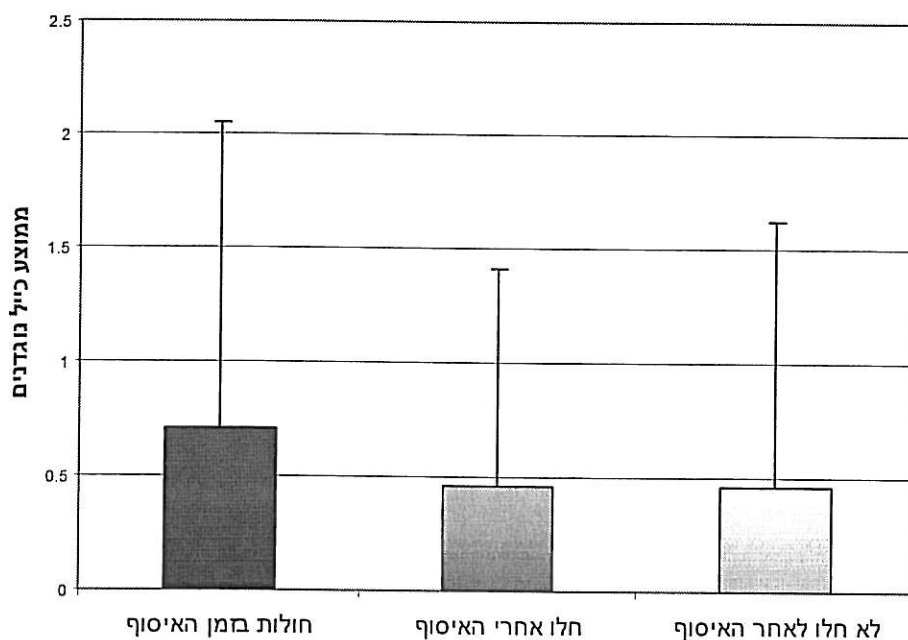


איור מס' 3: שלוש התמונות השמאליות – נגיף אבעבועות הצאן שבודד מתרכיב החיסון RM-65. שלוש התמונות מימין – נגיף קטרת העור שבודד מקטרית של פרה נוגעה מעלומים (2006). בשתי התמונות העליונות ניתן לראות נגיפים ב-Viral factory, אלו הם Inclusion bodies, בהם מתרבה הנגיף. ניתן לראות את הממבראנה העוטפת את החומר הנגיפי, ולעיתים אינה שלמה לגמרי. בשתי התמונות האמצעיות מופיעים intra-cellular naked virus (INV) – נגיפים בוגרים, (העטופים בממבראנה אך לא במעטפת תא), שמצויים בציטופלזמה. צורתם הופכת מעגולה לפחושה יותר, תוך כדי קבלת צורות שונות בחתכים. בתמונות התחתונות ניתן לראות הגדלה של נגיפים אלו. גודל הנגיפים נע בין 250 nm ל-320 nm.

### 3. תוצאות Serum Neutralization של דגימות ממשקים נגועים:

#### 3.1 עין צורים, רפת חלב

עין צורים הוא המשק בו ארעה התפרצות קטרת העור ב-2006, 17 שנה לאחר ההתפרצות בפדויים. משק זה והמשקים בסביבה לא היו מחוסנים. יום לאחר גילוי המחלה, ב-22.6.06, חוסן העדר בתרכיב אבעבועות צאן (RM-65). בתאריך 2.7.06, כ-10 ימים לאחר גילוי המחלה בעדר (הפרה הראשונה הראתה סימנים קליניים ככל הנראה כבר בתחילת יוני), נאספו 156 דגימות דם מפרות ברפת. 17 פרות מתוכן הראו סימנים קליניים ביום הלקיחה. מתוך 139 הפרות שלא הראו סימנים קליניים למחלה, 13 פרות חלו בשלבים מאוחרים יותר. שאר הפרות לא הראו סימנים קליניים לכל אורך תקופת ההתפרצות. מתוך 17 הנסיובים שנאספו מפרות שהראו סימנים קליניים בזמן הלקיחה, 4 הדגימו כייל נוגדנים לנגיף. מתוך 13 הפרות שלא הראו סימנים קליניים למחלה ביום הלקיחה, אבל הראו סימנים כאלו בשלב מאוחר יותר, 3 פרות הדגימו כייל לנגיף. מתוך 126 הפרות שלא הראו סימנים קליניים למחלה כלל, 20 פרות הדגימו כייל לנגיף. לא נמצא הבדל בכייל הנוגדנים בין שלוש קבוצות הפרות (איור מס' 4). כייל הנוגדנים מתפלג בין קבוצות הפרות בצורה דומה יחסית.



איור מס' 4: שלוש הקבוצות מהן נלקחו דגימות דם מעין צורים – פרות חולות בזמן לקיחת הדגימה, פרות שנהיו חולות בשלבים מאוחרים, פרות שלא הראו סימנים קליניים של המחלה. לא נמצא הבדל מובהק ברמת הנוגדנים בין 3 הקבוצות.

### 3.2 עלומים, רפת חלב

עלומים הוא המשק הראשון בו התפרצה קטרת העור ב-2007, ב-9 ליוני. העדר חוסן בתרכיב אבעבועות צאן (RM-65) כחצי שנה לפני ההתפרצות. שלושה ימים לאחר גילוי ההתפרצות, ב-12.6.07, נאספו 191 דגימות דם מפרות ברפת. 4 פרות מתוכן הראו סימנים קליניים ביום הלקיחה. 10 פרות מתוכן לא הראו סימנים קליניים ביום הלקיחה, אך הראו סימנים קליניים מספר ימים מאוחר יותר. שאר הפרות לא הראו סימנים קליניים לאחר הלקיחה. כמו-כן, בתאריך 18.6.07, 6 ימים לאחר הלקיחה הראשונה, נאספו 5 דגימות דם מפרות בעלות סימנים קליניים (מ-3 מהן נאסף דם גם בלקיחה הקודמת). דגימת דם נוספת נלקחה מפרה בעלת סימנים קליניים בתאריך 24.6.07. סך-הכול נאספו 197 דגימות דם, מהן הופרד הסרום. מתוך 191 הנסויים שנאספו ב-12.6.07, רק 2 פרות הראו כייל נוגדנים לנגיף קטרת העור, ושתיהן פרות שהראו סימנים קליניים למחלה (מתוך ה-4 באותו התאריך). לא נמצא כייל נוגדנים בפרות שלא הראו סימנים קליניים, או הראו סימנים קליניים מאוחר יותר. מתוך 5 הנסויים שנאספו בתאריך 18.6.07 מפרות שהראו סימנים קליניים, 2 הראו כייל נוגדנים לנגיף. מאותן 2 פרות נלקחה דגימה גם בתאריך הקודם, בו הן עדיין לא הראו כייל נוגדנים. הפרה שממנה נלקחה דגימה ב-24.6.07 הראתה כייל נוגדנים לנגיף. בטבלה הבאה מפורט הכייל של הפרות החיוביות:

טבלה מס' 2:

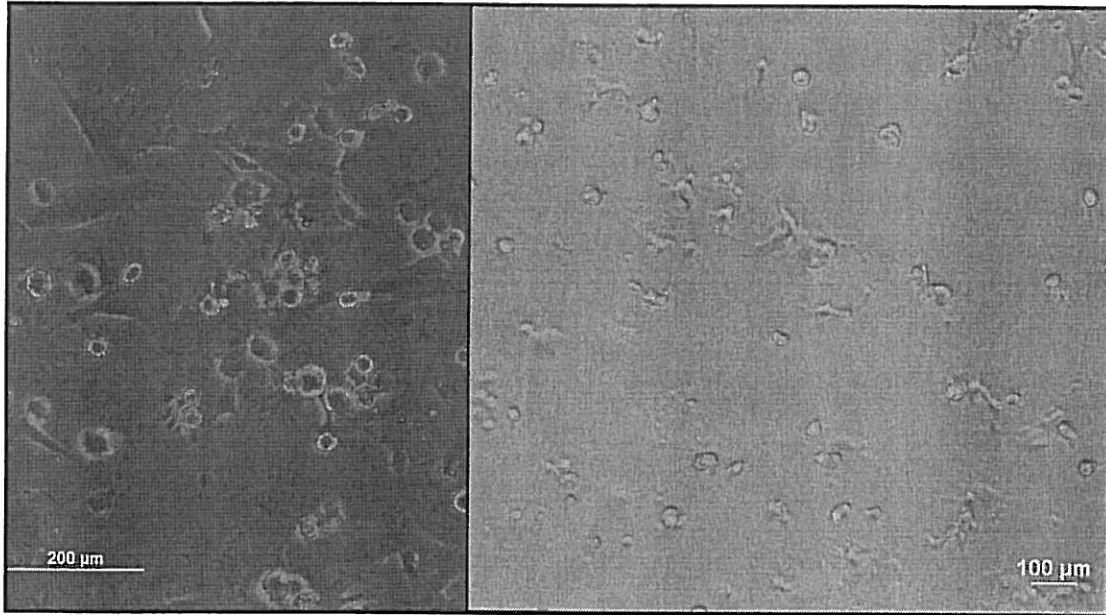
תאריך לקיחה	מספר דגימות	מס' דגימות מפרות חולות	כייל נוגדנים של פרות חולות
12.6.07	191	4	6, 3
18.6.07	5	5	2, 1.5
24.6.07	1	1	4.5

### 3.3 אור-הנר, עדר בקר לבשר

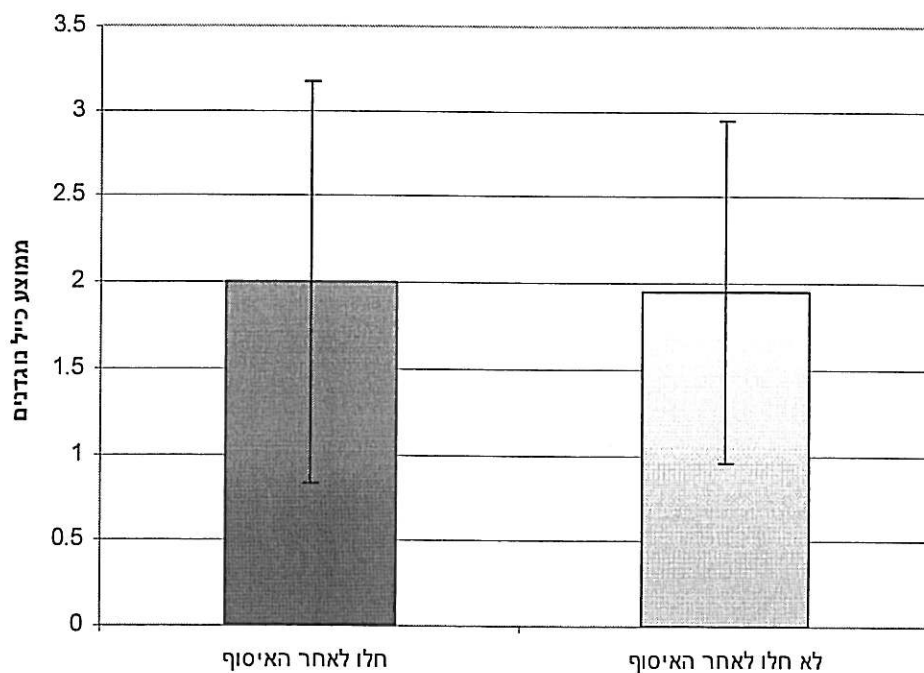
אור-הנר הוא המשק השני בו התפרצה מחלת קטרת העור ב-2007, ב-24 ליוני. המשק חוסן בתרכיב אבעבועות צאן כחודשיים בלבד לפני ההתפרצות. המשק מכיל שני עדרי בקר לבשר, עגלי פיטום, ורפת חלב.

שלושה ימים לאחר גילוי ההתפרצות בעדר הבקר לבשר הראשון, בתאריך ה-27.6.07, נאספו 56 דגימות דם מפרות בעדר. 20 פרות מתוכן הראו סימנים קליניים בזמן הלקיחה – 19 מהן סימנים קליניים קשים, ו-1 קלים. מתוך 36 הפרות שלא הדגימו סימנים קליניים ביום לקיחת הדגימות, 16 פרות הדגימו סימנים למחלה מאוחר יותר, ו-20 פרות לא הדגימו סימנים למחלה לאורך כל תקופת ההתפרצות. מתוך 20 הנסויים שנאספו מפרות שהראו סימנים קליניים למחלה ביום הלקיחה, 1 הדגימה נוגדנים למחלה (בעלת הסימנים הקליניים הקלים), ברמת כייל 1. 19 הנסויים שנלקחו מפרות בעלות הסימנים הקליניים הקשים הדגימו אפקט ציטוטוקסי לתאי ה-OA3.Ts לאחר יום אחד (איור מס' 5), ולכן לא ניתן היה למדוד להן רמת נוגדנים בסרום.

מתוך 36 הנסיונים של הפרות ללא הסימנים קליניים ביום הלקיחה 31 פרות הדגימו כייל נוגדנים לנגיף, לעומת 5 שלא הדגימו כלל. ההבדלים בכייל הנוגדנים בין הפרות שהדגימו סימנים קליניים למחלה לאחר לקיחת הדגימות, לאלו שלא הדגימו סימנים קליניים לאחר מכן לא נמצאו מובהקים (איור מס' 6). כמו כן לא נמצאו הבדלים בין שתי הקבוצות בשכיחות הפרות היחסית שהדגימו כייל נוגדנים מסוים. רוב הפרות נמצא סביב כייל של 2.5-3 (איור מס' 30).



איור מס' 5: אפקט ציטוטוקסי שהודגם ב-19 הפרות שהראו סימנים קליניים קשים לקטרת העור ביום איסוף דגימות הדם. משמאל ומימין, אפקט של 2 פרות שונות לאחר 24 שעות הדבקה של תאי OA3.Ts בסרום. ניתן לראות שמרבד התאים עוכל לחלוטין. האפקט אינו דומה לאפקט הציטופתי של נגיף קטרת העור, המתבטא בניפוח התאים, ובעיכול המצע רק לאחר כ-12 ימים.



איור מס' 6: גרף המחלק את קבוצת הפרות שלא הראתה סימנים קליניים לקטרת העור ביום איסוף הדגימות ל-2 קבוצות – פרות שהראו סימנים קליניים (חלו לאחר האיסוף) ולא הראו סימנים קליניים (לא חלו לאחר האיסוף) בשלבים מאוחרים יותר של ההתפרצות. ניתן לראות כי אין הבדל מובהק בממוצע כיוול הנוגדנים בין שתי הקבוצות.

## דיון ומסקנות

### בדיקת נגיף קטרת העור ונגיף אבעבועות צאן בתרכיב

ממצאי ההתפרצות מראים כי התרכיב ככל הנראה אינו יעיל בהגנה בפני קטרת העור. זאת לנוכח שיעור ההתקף הגבוה שנצפה במשקים המחוסנים. על כן בדקנו את נגיפי קטרת העור ואבעבועות הצאן מבידודים של קטריות והתרכיב בהתאמה. לשם כך הוקמו מערכת בידוד נגיף מרקמה ומתרכיב, ומערכת זיהוי הנגיף במיקרוסקופ אלקטרוני. בשלב הבא, נבדקה התגובה הסרולוגית של פרות משטחי ההתפרצות ב-2006 ו-2007. כמו-כן, התקבלו תוצאות ראשוניות של ניסוי בדיקת יעילות התרכיב בעדר שלא היה נגוע במחלה (בארות יצחק). לשם בדיקת התגובה הסרולוגית הוקמה מערכת Serum neutralization.

**בידוד הנגיף** – גידול הנגיף מהתרכיב והדגמתו במיקרוסקופ האלקטרוני הראו כי התרכיב מכיל נגיף. הנגיף בודד הן מרקמת קטרית של פרה נגועה במחלה, והן מתרכיב RM-65. בשלב הבא הוכנו חתכים למיקרוסקופ אלקטרוני. בחתכים אלו נצפו הנגיפים מבידוד הקטרית והתרכיב. בשני הבידודים, נצפו הנגיפים בכמות גבוהה מאוד בציטופלזמה של התאים, בכל שלבי התפתחותם. לא ניתן להבדיל בחתכים אלו בין נגיף קטרת העור לנגיף אבעבועות הצאן, מפני שהם זהים לחלוטין מבחינה מורפולוגית. הדבר נכון לרוב נגיפי האבעבועות – לרובם מורפולוגיה זהה, ולא ניתן להבדיל ביניהם על סמך המיקרוסקופ האלקטרוני. תוצאות אלו מעידות כי חוסר יעילותו של הנגיף אינה נובעת מהיעדרותו של הנגיף מהתרכיב, או מאי-יכולתו להתרבות בציטופלזמה וליצור אפקט ציטופתי. במחקרים קודמים נמצא כי חיסון בנגיף אבעבועות צאן מוחלש מקנה הגנה בפני הוקעה עם נגיף אלים של קטרת העור (Capstick 1961). אחד ההסברים האפשריים לחוסר יעילותו של התרכיב נעוץ בהתאמת יתר של התרכיב לתאי התרבית. נגיף שעובר העברות רבות על תאי תרבית, הופך להיות מותאם להם, ותוקף אותם ביעילות רבה. לעיתים מלווה תהליך זה בירידה באלימות כלפי תאים של המאחסנים אחרים אליהם הוא בעצם מיועד. הסבר אפשרי נוסף לחוסר אפקט של תרכיב הוא אחזקה לא נכונה של בקבוקוני התרכיב. ב-1961 הראו Capstick and Coackley כי חשיפה לקרני שמש ישירות, או שהייה באור יום גורמת לאינאקטבציה של הנגיף, ופוגעת בכיוול התרכיב. כמו כן הם הראו כי אחזקה של התרכיב בבקבוקים כהים מונעת ירידה זו בכיוול (Capstick 1961). למרות זאת, בקבוקי התרכיב RM-65 משווקים בבקבוקונים שקופים. כמו-כן, הזרקה של מינון נמוך מידי, או כמות קטנה מידי של תרכיב (לעיתים בשל חוסר שיתוף פעולה של הפרה), עלולה להקטין את האפקט שהוא אמור לייצר.

**ניתוח סרולוגיה של משקים** – נשאלה השאלה מהי רמת התגובה החיסונית שמשרה התרכיב. ידוע כי הגנה מפני נגיף קטרת העור ונגיפי אבעבועות הצאן היא מתווכת תאית (cell-mediated) (Carm, 1993). בנוסף, תחלואה נקודתית בקטרת העור או חיסון בתרכיב גורמת לעלייה מעטה בלבד של רמות הנוגדנים (Kitching, 1992). אולם, הנחתנו הייתה כי רמת הנוגדנים תהווה סמן לקיום תגובה חיסונית הולמת. בדיקת רמת הנוגדנים במשק בארות יצחק, אשר לא נחשף למחלה

וחוסן בתרכיב RM-65 אשר נשמר כיאות, מראה כי לאחר חודש ימים התפתחה רמה נמוכה של נוגדנים, ולאחר מתן בוסטר רמת הנוגדנים עלתה במעט, אולם לא ברור מה הקשר בינם לבין הגנה מפני המחלה. בשל העובדה כי בישראל לא ניתן כרגע לבצע מבחני הוקעה עקב אי-קיום של מתקן מתאים, נעשה נסיון לאסוף נסיונים מבקר, עם הידיעה על ההתפרצויות במספר משקים, מתוך הנחה כי יהיה קשר בין רמת הנוגדנים לבין הגנה מפני המחלה. בדיקת נטרול הנסיונים (Serum neutralization) נערכה ב-3 משקים שנפגעו בקטרת העור – עין-צורים (2006), משק לא מחוסן, עלומים ואור-הנר (2007), משקים מחוסנים). בשלושת המשקים נאסף נסיון מפרות, אשר התפלגו ל-3 קבוצות; פרות שהראו סימנים קליניים בזמן לקיחת הדם, פרות ללא סימנים קליניים בזמן לקיחת הדם, אך הראו סימנים קליניים מאוחר יותר, ופרות שלא הראו סימנים קליניים לאורך כל תקופת ההתפרצות. רמת הנוגדנים לנגיף קטרת העור נמדדה בכל אחת מהקבוצות במשקים השונים. הממצאים משני המשקים המחוסנים – עלומים ואור-הנר – לא הצליחו לתמוך בקיום קשר בין רמת הנוגדנים לבין הגנה מפני המחלה. בעלומים, רוב הפרות לא הראו כייל כלל, והפרות החיוביות היחידות היו פרות שהראו כבר סימני מחלה. באור-הנר, הראו פרות רבות כייל נוגדנים גבוה גם אם לא היו סימפטומטיות ביום איסוף הנסיון, אולם לא נצפה קשר בין גובה הכייל ובין הגנה מפני המחלה, מאחר ושיעור התחלואה לאחר מכן מבקר בעל כייל, ובקר ללא כייל, היה זהה. ממצאים אלו הם בהסכמה עם ממצאי מחקר הוקעה לאחר חיסון בתרכיב RM-65 שבוצע בישראל לאחר ההתפרצות בפדויים (Brenner, 1992). בו לא נמצא קשר בין רמת הנוגדנים לבין המצב האימוני של העגלים שחוסנו לאלו שלא חוסנו. בניסוי זה התבצעה הוקעה ל-6 עגלים, 4 מהם מחוסנים בתרכיב אבעבועות צאן RM-65, ו-2 מהם לא מחוסנים. בבדיקת נטרול הסרום שבוצעה לנסיונים של העגלים המחוסנים, נמצא כי לכל העגלים כייל נוגדנים ברמות דומות יחסית, למעט עגל אחד בקבוצה שחוסנה, שלא פיתח רמת נוגדנים כלל (ייתכן שלא הודבק כיאות). כמו-כן, קבוצת הביקורת שלא חוסנה, הראתה כייל נוגדנים דומה לקבוצת הניסוי. העובדה כי הכייל בקבוצה הלא מחוסנת היה דומה לכייל הנוגדנים בפרות שחוסנו, מראה כי ייתכן והכייל בפרות שחוסנו נובע מן ההדבקה עצמה. אולם המסקנה ממחקר זה בניגוד למחקר הנוכחי, הייתה כי התרכיב מקנה הגנה חיסונית מסוימת, עקב העובדה ש-2 מתוך 4 עגלים שחוסנו לא פיתחו סימנים קליניים לקטרת העור לאחר הדבקה בנגיף. מכל האמור לעיל עולה כי החיסון בתרכיב האמור משרה תגובה נוגדנית קלה בלבד, אם בכלל, וכי את רמות הנוגדנים הגבוהות ניתן בעיקר לשייך לחשיפה טבעית לנגיף. ממצא זה הוא מעניין לאור העובדה כי ניסויים קודמים הדגימו עליה בכייל הנוגדנים רק כ-9-6 ימים (בממוצע 7.5) לאחר הופעת הקטריות (Tuppurainen et al., 2005). בדיקת ה-Serum neutralization, לפי מחקר זה, עלולה שלא לגלות עליה ברמת הנוגדנים אם הסרום נאסף פחות משבוע לאחר הופעת הקטריות. לעומת זאת, במחקר הנוכחי נמצאו פרטים רבים (בעיקר באור-הנר) בעלי כייל גבוה, טרם פיתוח סימנים קליניים למחלה, או שלא פיתחו סימנים קליניים כלל. ההסבר לכך, יכול להיות תגובת בוסטר חזקה ומהירה הקורית עקב חשיפה טבעית על רקע של חיסון קודם, שכן באור-הנר, חוסן העדר כחצי שנה, וגם חודשיים לפני ההתפרצות במשק ב-2007. ממצא חשוב נוסף במחקר הוא קיומה של הדבקה תת-קלינית בשיעור גבוה (85% מהפרות שלא פיתחו סימנים קליניים באור-הנר הראו כייל חיובי לקטרת העור). ממצא זה הוא בהסכמה עם ממצאים קודמים שפורסמו בעבר, הגורסים כי קיימים מקרים רבים של הדבקה תת-קלינית



בקטרת העור (Weiss, 1968). את העובדה כי כייל הנוגדנים בפרות שלא פיתחו סימנים קליניים מגיע מהחשיפה למחלה, ולא מהחיסון ניתן לראות גם מתוצאות משק עין-צורים, שאינו מחוסן, בו 13.5% מהפרות שלא הראו סימנים קליניים למחלה הראו כייל נוגדנים חיובי. ממצאינו במחקר זה עולים בקנה אחד עם הבנת מצב החיסון וזמן המחלה של המשקים בעת הדגימה. בעין-צורים, נלקחו הדגימות שבועיים לאחר התפרצות המחלה. לפי הניסוי בבארות יצחק, שבועיים לאחר החיסון בתרכיב עדיין אין יצירה של נוגדנים, ועל כן כל הנוגדנים הנצפים בעין-צורים הם כתוצאה מהחשיפה לנגיף, כולל חשיפה תת-קלינית. בעלומים, משק שחוסן חצי שנה לפני ההתפרצות, רמות הנוגדנים היחידות שמוצגות הן של חיות בעלות סימנים קליניים. ממצא זה מראה כי אין השארות של נוגדנים חצי שנה לאחר החיסון, והדבר תואם את רמות הנוגדנים הנמוכות שנמצאו בבארות יצחק לאחר חצי שנה. כמו-כן, אין הרבה חיות המראות חשיפה תת-קלינית, מפני שתאריך לקיחת הדגימות קרוב לתאריך גילוי המחלה. באור-הנר, משק שחוסן חצי שנה, וגם חודשיים לפני ההתפרצות, נצפות רמות גבוהות של נוגדנים בכל החיות. ממצא זה תואם את העובדה שהמחלה באור-הנר התגלתה בשלבים מתקדמים, בעת שרבים מבני הבקר נחשפו כבר לנגיף. כמו-כן, התגובה כאמור יכולה להיות תגובת בוסטר חזקה לחיסון שנערך חודשיים לפני ההתפרצות, ועל כן חיות רבות שנחשפו פיתחו כייל נוגדנים יחסית גבוה. בסיכומו של דבר, ממצאי המחקר מצביעים על-כך שהתרכיב אינו משרה רמת נוגדנים נאותה אשר תהווה סמן להגנה מפני המחלה. את התגובה החיסונית לתרכיב יש לבחון ככל הנראה באמצעות פיתוח תבחין לזיהוי תגובה תאית, אשר עדיין לא נערך בארץ, ובכך יעסוק המשך המחקר.

## רשימת ספרות:

- Brenner, J. D., D. Avraham, A. Samina, I. Peleg, B.A. 1992. Experimental infection with local lumpy skin disease virus in cattle vaccinated with Sheep pox vaccine. Vet. Med. 47:17-21.
- Capstick, P. B., Coackley, W. . 1961. Protection of cattle against Lumpy skin disease (I & II). Res. Vet. Sci 2:362-374.
- Carn, V. M. 1993. Control of capripoxvirus infections. Vaccine 11(13):1275-1279.
- Kitching, R. P., Hammond J.M. . 1992. Poxvirus, infection and immunity. Encyclopedia of immunology 3:1261-1264.
- Kitching, R. P., J. M. Hammond, and D. N. Black. 1986. Studies on the major common precipitating antigen of capripoxvirus. J Gen Virol 67 ( Pt 1):139-148.
- Le Roux, P. L. 1945. Notes on the probable cause, prevention and treatments of pseudo-urticaria and associated septic conditions in cattle. Northern Rhodesia Department of animal health, Newsletter:1-4.

- MacDonald, R. A. S. 1931. Pseudo-urticaria of cattle. Northern Rhodesia  
Department of animal health. Annual Report 1930:20-21.
- OIE. 2004. Lumpy Skin Disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for  
Terrestrial Animals, OIE
- Thomas, A. D., Mare, C.v.E. 1945. Knopvelsiekte. J. of sou. Afr. Vet. Med. Ass  
16:36-43.
- Tulman, E. R., C. L. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, J. H. Sur, N. T. Sandybaev, U. Z.  
Kerembekova, V. L .Zaitsev, G. F. Kutish, and D. L. Rock. 2002. The genomes  
of sheeppox and goatpox viruses. J Virol 76(12):6054-6061.
- Tuppurainen, E. S., E. H. Venter, and J. A. Coetzer. 2005. The detection of lumpy  
skin disease virus in samples of experimentally infected cattle using different  
diagnostic techniques. Onderstepoort J Vet Res 72(2):153-164.
- Weiss, K. E. 1968. Lumpy skin disease virus. Vir. Mon. 3:111-131.
- Yeruham, I., O. Nir, Y. Braverman, M. Davidson, H. Grinstein, M. Haymovitch, and  
O. Zamir. 1995. Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. Vet Rec  
137(4):91-93.