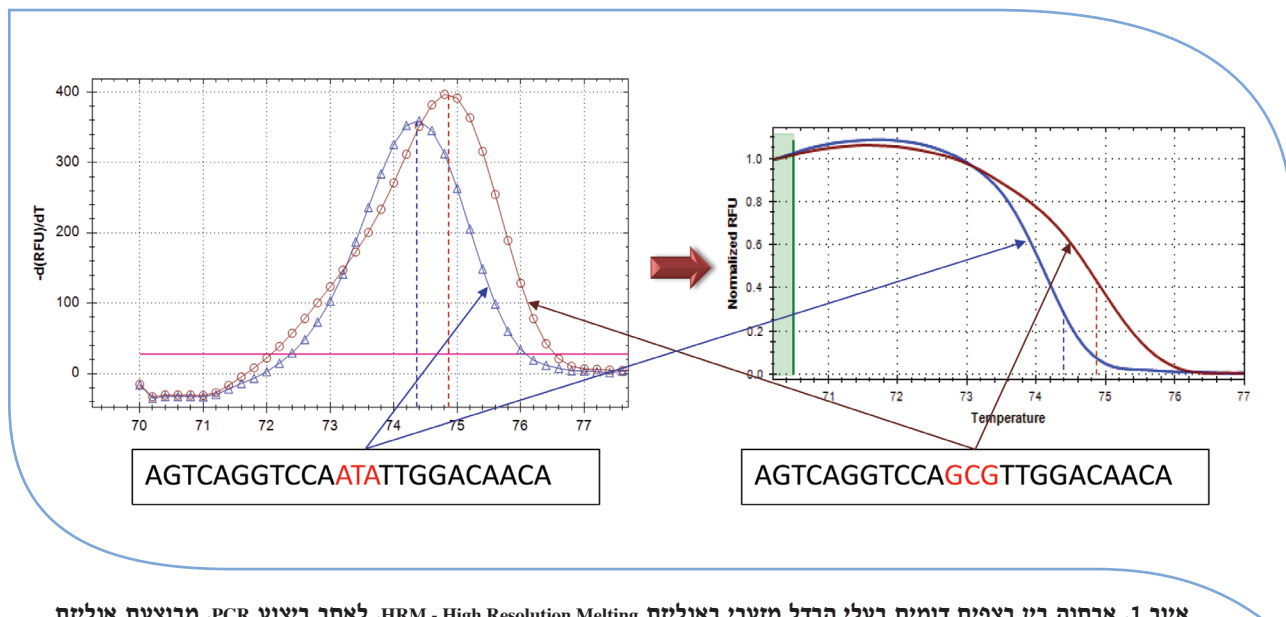






איור 1. אבחנה בין רצפים דומים בעלי הבדל מזערי באנליזת HRM - High Resolution Melting. לאחר ביצוע PCR, מבוצעת אנליזת המסה בהפרדה גבוהה - HRM, בה נמדדת טמפרטורת ההפרדה של תוצרי ה-PCR. הבדלים קטנים מאד ברצפים מתבטאים בשינויים קטנים בטמפ' ההמסה ומאפשרים להבדיל בין רצפים קרובים, ללא צורך בקביעת רצף הדגימות. באמצעות בדיקה זו אפשר להבדיל בין דגימה שמקורה בחיה שחוסנה בתרכיב חי, ובין דגימה מחיה שהודבקה בנגיף האלים.

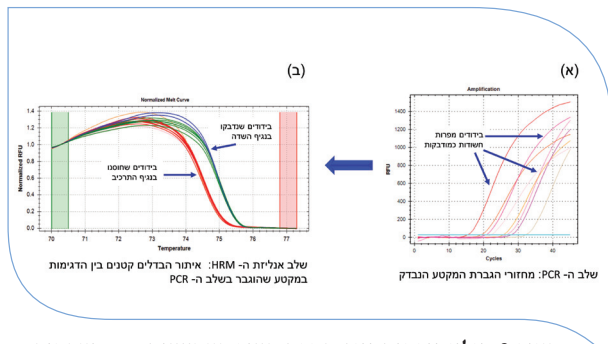
(איור 2). בשלב הראשון, הבדיקה מזהה את נוכחות האזור ובכך מאשרת או שוללת את נוכחות הנגיף בדגימה. בשלב השני, מבוצעת אנליזת HRM אשר מסווגת את הנגיף שזוהה בדגימה וקובעת האם מדובר בזן התרכיב או בזן השדה האלים יותר (איור 3). באמצעות בדיקה זו ניתן כיום לזהות בזמן קצר ובדיוק גבוה, האם החיה הנבדקת חוסנה בתרכיב או נדבקה בזן השדה (Menasherow et al., 2016). הבדיקה גם מאפשר לעקוב אחר שינויים ברצף הנבדק, ולהתאים את מערכת הזיהוי לשינויים שעובר הנגיף.

קדחת שלושת הימים Bovine Ephemeral Fever - BEF

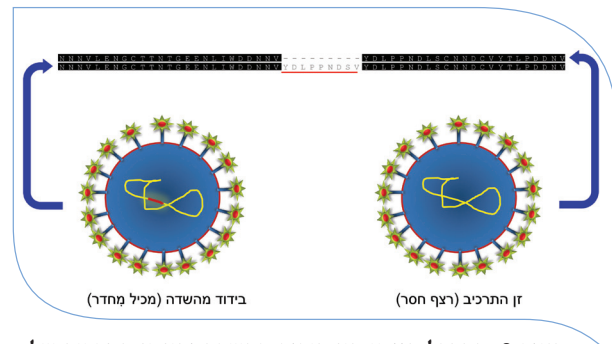
מחלה זו הידועה גם בשם קדחת קיקיונית (ק"ק) נגרמת על ידי נגיף בשם זה ממשפחת ה-Rhabdoviridae, הכוללת גם פתוגנים של צמחים ואת נגיף הכלבת. המחלה נפוצה באוסטרליה, אפריקה, אסיה, המזרח התיכון ואפריקה. הנזק לחיה החולה מאופיין בחום גבוה, התייבשות, שלשול, פגיעה בפוריות והפלות, התקשחות שרירים, פגיעה ביכולת התנועה עד כדי שיתוק, ולעיתים נדירות מוות. הופעת והתפשטות המחלה הובילו למסקנה שהיא מועברת ע"י חרקים מעופפים (יתושים ויבחושים), אולם עד כה לא דווח בספרות המקצועית על הוכחה חותכת לאופן ההעברה או על זיהוי ודאי של מין המעביר. בישראל מופיעה המחלה אחת לכמה שנים, כאשר בשלוש השנים האחרונות זוהו מקרים בכל שנה. בעקבות שכיחות המחלה בישראל בוצע עד לאחרונה חיסון מקיף בזן תרכיב אוסטרלי. כאמור לעיל, נעשה שימוש במספר שיטות לאבחון המחלה, כולל זיהוי באמצעות PCR. החלבון אשר מכתוב את התגובה החיסונית הספציפית לנגיף הוא חלבון G - Glycoprotein G, שממוקם על מעטפת הנגיף ולכן חשוף למערכת החיסון של החיה. הנגיף "מתחמק" ממערכת החיסון של החיה על ידי יצירת שינויים קטנים (מוטציות) במבנה החלבון, כך שנוגדנים שנוצרו כנגד זן "ותיק" לא יפעלו ביעילות כנגד זן חדש, וכך גם קורה שמערכת זיהוי שפותחה כנגד זן ותיק, לא תזהה כראוי זנים חדשים או זנים ממקומות שונים.

מחלת קטרת העור - Lumpy skin disease

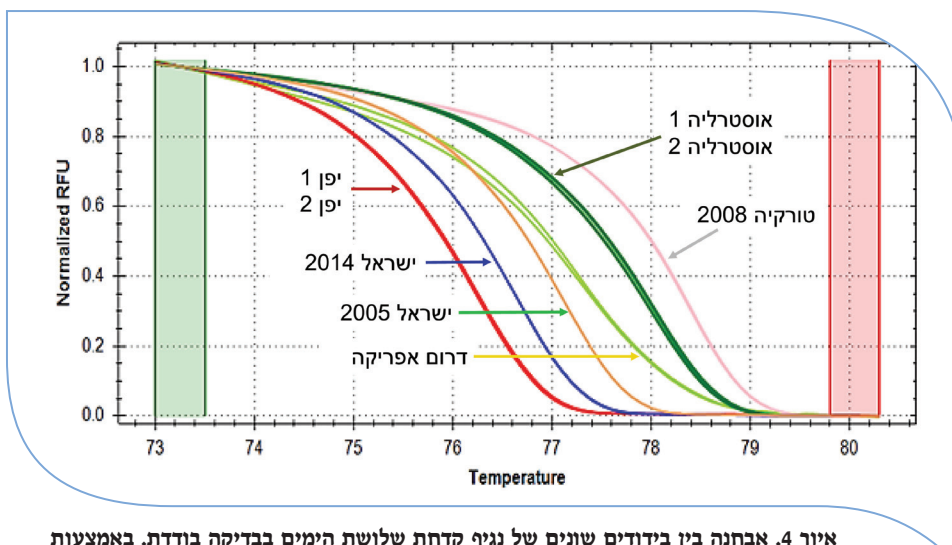
מחלה זו נגרמת על ידי נגיף בשם זה (Lumpy skin disease virus - LSDV) השייך למשפחת נגיפי האבעבועות (Pox viridae). המחלה מאופיינת בהופעת קטריות מוגלתיות (שלפוחיות) על העור, חום, בצקות בגפיים, ירידה חדה בתנובת החלב ובמשקל, ובמקרים נדירים עשויה לגרום למוות. ההתאוששות מהמחלה עשויה לארוך מספר חודשים. התפרצות המחלה גורמת לנזקים כלכליים קשים בשל הפגיעה בתנובת החלב, במשקל החיה ובעור שלה. המחלה התפרצה בישראל בשנים 1989, 2006-2007 וב-2012-2013 (Yeruham et al. 1995, Brenner et al. 2009, Menasherow et al. 2014). לאחר ההתפרצות שהחלה ב-2012 הוחל בחיסון מקיף של בקר לבשר ולחלב, בתרכיב אבעבועות צאן, שהוא נגיף בעל מבנה דומה לנגיף קטרת העור, ולאחר מכן בתרכיב Neethling, שמקורו בזן של נגיף קטרת העור בעל אלימות מופחתת, אשר גורם לעיתים להופעת סימני מחלה קלים בבקר שחוסן. בעקבות ההתפרצויות הראשונות פותחו במכון הווטרנרי מספר מערכות אבחון מולקולריות, הראשונות מסוגן בעולם (Stram et al. 2008, Menasherow et al., 2014). לאחר ההתפרצות האחרונה הוחל בפיתוח מערכת מתקדמת עוד יותר, אשר מאפשרת להבחין בין נגיפי אבעבועות צאן ונגיף קטרת העור, ובין זן התרכיב לזן השדה האלים. מערכת האבחון מבוססת על בדיקת Real-time PCR, המזהה אזור מסוים ברצף הגנטי של הנגיף, כאשר לאחר ביצוע שלב ה-PCR, מבוצעת אנליזת המסה בהפרדה גבוהה - High Resolution Melting - HRM. אנליזת HRM מזהה הבדלים קטנים מאד (עד הבדל של בסיס בודד) ומאפשרת להבחין בין רצפי DNA דומים ללא צורך בבדיקת ריצוף (איור 1). בבדיקה שפותחה במכון הווטרנרי מזהה אזור ייחודי ברצף ה-DNA של הנגיף המקודד לחלבון LSDV127 שנמצא במעטפת הנגיף ושייך לקבוצת חלבוני External Envelop Virion - EEV. חוקרי המכון הווטרנרי מצאו, כי למרות שהמבנה הגנטי של זן התרכיב וזן השדה זהים כמעט לחלוטין, ברצף המקודד לאזור זה יש חלק קטן שקיים בזן השדה האלים ונעדר מזן התרכיב



איור 3. גילוי נוכחות נגיף קטרת העור באמצעות PCR ואבחנה בין שני טיפוסים הנגיף באמצעות אנליזת HRM. בשלב ה-PCR (א) מתבצעת הגברה (שכפול) של מקטע ה-DNA הנבדק. בבדיקה זו מאושרת או נשללת נוכחות הנגיף בדגימה. בשלב ה-HRM (ב) מבוצעת המסה של מקטעי ה-DNA שהוגברו בחלק הראשון, ועל פי מדידת מדויקת של טמפרטורת ההמסה ניתן לזהות לאיזה טיפוס שייכת הדגימה - בידוד שדה או זן התרכיב. הדגימות מפרות שחוסנו בזן התרכיב מראות המסה בטמפ' נמוכה יותר, בעוד שהדגימות מפרות שנדבקו בנגיף השדה עוברות המסה בטמפ' גבוהה יותר. כך ניתן להבדיל במהירות ובדיוק רב בין שני טיפוסים הנגיפים ולקבוע האם הפרה נדבקה או לא.



איור 2. ההבדל הגנטי בין בידוד מהשדה ובין זן התרכיב של נגיף קטרת העור. טיפוסים הנגיפים זהים כמעט לחלוטין, אבל בבידודים ישראלים מהשדה קיים רצף שאינו נמצא בזן התרכיב (זן Neethling). באמצעות בדיקת Real-time PCR ולאחריה אנליזת HRM, ניתן לקבוע האם הדגימה הנבדקת מכילה את הרצף הייחודי לבידודי השדה או לא, וזאת מבלי להזדקק לריצוף הדגימה. באיור מתוארים שני טיפוסים הנגיפים והאזור ברצף ה-DNA שלהם בו קיים החלק שאינו נמצא בזן התרכיב. המחדר שקיים רק בבידודי השדה מסומן באדום בתוך ה-DNA הנגיפי (מסומן בצהוב), באיור המתאר את בידוד השדה (שמאל).



איור 4. אבחנה בין בידודים שונים של נגיף קדחת שלושת הימים בבדיקה בודדת. באמצעות אנליזת HRM בוצעה אבחנה מובדלת בין שישה בידודים שונים של הנגיף, ממקומות שונים ומשנים שונים, ללא צורך בריצוף. הבדלים מזעריים ברצף הגן המקודד לחלבון G של הנגיף מאפשרים לזהות את מקורו בבדיקה אחת מהירה, ללא צורך בביצוע מספר בדיקות נפרדות וללא צורך בפיענוח הרצף של הדגימות.

בחטיבה לוויורולוגיה במכון הווטרנרי פותחה לאחרונה מערכת זיהוי המתבססת על אזורים בגן המקודד לחלבון G. המערכת מאפשרת, בנוסף לגילוי נוכחות הנגיף, להבדיל בין נגיפים ממקורות שונים. בדומה למערכת זיהוי נגיף קטרת העור שתוארה לעיל, גם מערכת זו מבוססת על ריאקציית Real-time PCR ואנליזת HRM. באמצעות הבדיקה שפותחה, זוהו הבדלים בין בידודים שונים של הנגיף: זוהו הבדלים בין בידודים ישראלים משנים שונות, וכן הבדלים בין בידודים ממקומות שונים בעולם (איור 4). בתהליך כיול המערכת, התוצאות של כל בדיקה אומתו על ידי בדיקות רצף לכל אחד מהבידודים, והתוקף שניתן להן

כל זאת, כאמור, ללא צורך בריצוף הדגימות, כפי שהיה נדרש בעבר.

השיטות אשר מתוארות במאמר זה מאפשרות לעובדי המכון הווטרנרי לבצע אבחון מהיר, רגיש, מדויק וזול יותר, ביחס לשיטות אבחון דומות בהן נעשה שימוש. עבודה זו מדגימה כיצד השילוב של עבודת שדה קלינית, עבודת מעבדה ביוכימית-מולקולרית, ופיתוח תוכנה ספציפית, תורמים לשיפור והזלת האבחון וכתוצאה מכך לשיפור השירות הניתן למגדל ולציבור. מעבר לכך, היכולת לאתר במהירות הבדלים קטנים בין בידודים ממקומות שונים או מזמנים שונים, מקדמת את המחקר העוסק באבולוציה של נגיפים ובאופן ההתפשטות של מחלות נגיפיות. המשך פיתוח שיטות אבחון מולקולריות צפוי לשפר עוד יותר את מהירות ורגישות הבדיקות, ואף להוזיל את עלויות הבדיקה. ▲

מאפשר לחוקרי המכון להשתמש בהן כבדיקות ייחוס לדגימות שמגיעות מהשדה בשגרת האבחון. על מנת לשפר עוד יותר את איכות הבדיקה, פותח אלגוריתם ייחודי שבדק את רצפי הבידודים של הנגיף, ומציג אזורים שמתאימים לפיתוח מערכת גילוי לפי דרישות החוקרים. עבודה זו בוצעה במסגרת שיתוף פעולה בין המכון הווטרנרי לאוניברסיטה הטכנית של קאזרסלאוטון בגרמניה. באמצעות אלגוריתם זה, אותרו אזורים ברצף הגן, בהם יש דמיון רב בין בידודים שונים מאותו אזור גיאוגרפי, אבל יש שוני בין בידודים מאזורים שונים. למשל, התוכנה איתרה אזור בו כל הבידודים הישראליים דומים זה לזה, כל הבידודים היפניים דומים זה לזה, אבל קיים שוני בולט בין הישראליים ליפניים. על בסיס האזורים אשר אותרו על ידי התוכנה שופרו ריאקציות שמזהות באופן ספציפי את ההבדלים בין הבידודים השונים, עד למצב בו ניתן להבדיל בין בידודים מחמישה אזורים גאוגרפיים שונים.