

# הקניית עמידות לקדחות קרצית בבקר מבוגר בעזרת חיסון חוזר

## Assessment of immunity to tick-borne diseases in old cattle following revaccination

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף הבקר

ע"י

חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	ורדה שקאפ
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	זלמן הנקין
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	בני לייבוביץ
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	מולד תיאה
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	פיש לאה
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	קריגל יורי
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	סוויצקי איגור
שה"מ/ בע"ח	הררי יוסי
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	מזוז מוניקה
חטיבה לפרזיטולוגיה, מכון וטרינרי, בית דגן	פליידרוביץ לודמילה

יום חמישי 10 אפריל 2008

## תקציר

טפילים חד תאיים בבזיה ביגמינה, ב.בוביס ותיילריה אנולטה המועברות על ידי קרציות מטפילות כדוריות דם אדומות של בקר וגורמות למחלות קשות (בשם העממי "קדחות קרצית") ולתמותה נכרת בבקר מטופח. בישראל כמו במספר מדינות אחרות הדברה יעילה של המחלות הללו מבוססת על חיסון מונע עם תרכיבים המכילים טפילים ממויירים וחיים. התרכיב מוזרק פעם בחיי הבהמה בגיל של 6-9 חודשים ובהמשך החסינות נתמכת ע"י חשיפתו של הבקר השוהה בשדה לקרציות נגועות בטפילים אלה. עם שינוי אקלים בעולם ולרבות בישראל חלו שינויים גם בביולוגיה של קרציות המעבירות את "קדחות קרצית". בהעדר חשיפה מתמדת לקרציות נגועות בחלק מהבקר החסינות של הבקר נחלשת או יורדת, ובעקבות זה הבקר נעשה רגיש להדבקות חוזרות לקרציות שנושאות טפילים אלימים. בעבודה זו בקר באזור אנדמי שחוסן לפני מספר אשר שנים חוסן שנית נגד בבזיוזיס ותיילריוזיס. במהלך שלוש וחצי שנים נעשה מעקב ברמת הנוגדנים ונשאות של טפילי בבזיה ותיילריה לאחר חיסון חוזר. במשך כל שנות המעקב לא נצפתה תחלואה ותמותה בעדר הניסוי. מספר בהמות בעלות נוגדנים סגוליים לכל טפיל ומספר בהמות חיוביות ב PCR היה לא קבוע והשתנה בבדיקות שנערכו 2-3 פעמים בכל שנה. בחודשי הקיץ כשפעילות קרציות בשדה מוגברת מספר בעלי חיים חיוביים היה לאין שעור גבוה יותר לעומת חודשי החורף. במהלך השנים לא היו הבדלים משמעותיים במספר בעלי חיים עם כייל נוגדנים חיובי ונשאים לכל הטפילים בין אם בקר חוסן שנית או לאו. חיסון חוזר נגד תיילריה עם תרכיב הומולוגי או הטרוולוגי הניב תוצאות דומות, ובהמשך המעקב כמחצית העדר היה חיובי סרולוגית וכשליש במבחני PCR. לאור העובדה שחיסון בפני תיילריוזיס היינו בטוח לבקר מבוגר ניתן לחזק את חסינות הבקר ע"י חיסון חוזר כל 3-4 שנים. לעומת זאת, על פי ממצאי ה PCR חשיפה לקרציות הנגועות בטפילי בבזיה הייתה מוגבלת יחסית לעונות השנה. רוב הבקר היה חיובי לנוגדנים סגוליים, דבר שמצביע על זיכרון חיסוני אך לא בחכרח על חסינות העדר. לאור רגישותו הגבוהה של בקר מבוגר לחיסון עם טפילי בבזיה מצד אחד, ולתרומה הלא מובהקת לחיזוק החסינות ע"י חיסון חוזר מאידך, נראה שחיסון חוזר נגד בבזיה בבקר מבוגר אינו מומלץ.

## 2. מבוא ומטרות העבודה

קדחות הקרצית הן קבוצה של מחלות הנגרמות ע"י טפילי דם חד- תאיים המועברים לבקר על ידי קרציות למיניהן. בבזיה בוביס ובבזיה ביגמינה הגורמים לבבזיוזיס בבקר מועברים ע"י קרצית הבקר בואופילוס אנולטוס. תיילריוזיס הנגרמת ע"י תיילריה אנולטה מועברת על ידי קרציות מסוג היאלומה. כל המחלות האלו גורמות לאנמיה קשה, איבוד משקל, ירידה בתנובת החלב, עיכוב בהתפתחות, קשיים בהתעברות ולתמותה. קדחות קרצית מסבות נזקים כבדים לבקר לבשר ובעיקר לעדרים הרועים באזורים נגועים ( רמת הגולן, גליל עליון ותחתון ורמות מנשה) ולאחרונה היו דיווחים על תמותה בעדרי בקר לחלב (קיבוץ בית רימון, רפת הצפון באורטל). בישראל, אוסטרליה ודרום אפריקה מחסנים בקר בפני קדחות קרצית עם תרכיבים המכילים טפילים חיים ממויירים. מקובל לחסן את הבקר מפני בבזיוזיס פעם אחת בלבד בגיל גמילה. הדבקה טבעית או ע"י הזרקת טפילים גורמת ל"חיסון על תנאי" (premunition), כאשר נוכחות מתמדת של טפילים בבהמה מחזקת עמידות בפני מחלות קליניות קשות ( Callow et al., 1997; Donatien and Lestoquard, 1935). מניסיון רב שנים שהצטבר בארץ ובעולם ידוע שהחסינות הנרכשת בעקבות הזרקת התרכיבים נשמרת לאורך מספר שנים הודות להוקעה של הבקר המחוסן ע"י קרציות נגועות. בהעדר הוקעה מתמדת מקרציות נגועות חסינות הולכת ופוחתת עם הזמן. כמו כן, הופעה של זנים השונים מבחינה אנטיגנית מחד, ואלימים מאידך על רקע ברירה טבעית או מוטציות גנטיות (Bock et al., 1992). בעקבות התפרצויות מבבזיוזיס בשדה רוב או כל הבקר מקבל טיפולים עם תכשירים רפואיים. טיפולים אלה גורמים לשבירת החיסון בפני בבזיוזיס והופכים חלק מהבקר לרגיש לחשיפה בפני קרציות נגועות, בקר כזה עלול לחלות קשה ואף למות מבבזיוזיס.

חיסון חוזר בפני בבזיוזיס בין אם על מנת להגביר חסינות דועכת, בין אם לחסון בקר רגיש שטופל בתרופות הנו בעייתי כיוון שבקר מבוגר עלול להגיב קלינית להזרקת טפילים חיים. לפי Timms et al (1981) חיסון חוזר עם טפילים הטרולוגיים שיפר חסינות הבקר. עם זאת המלצות לחסון בקר מבוגר שנית לא קיימות (Bock and DeVos, 2001), יש להדגיש גם שעבודות לבדיקת חסינות בקר מבוגר השווה בשדה קשים לביצוע, ולכן גם הידע הנו מצומצם ביותר. טרם ידועה מידת היעילות של חיסון חוזר בפני בבזיוזיס. לגבי חיסון חוזר בפני טפילי תיילריה קיימות חילוקי דעות בספרות המדעית. התרכיב נגד תיילריוזיס מבוסס על טפילים מוחלשים של תיילריה אנולטה שגודלו בתוך תרבית של תאים לבנים. חיסון של בקר מבוגר נגד תיילריוזיס אינו דורש במעקב אחר תגובות קליניות. עם זאת, חיסון חוזר בפני תיילריוזיס עלול לגרום לתופעה של "דחיית שתל" ע"י המאכסן. הזרקת חוזרת של תאים המכילים טפילים

הומולוגיים גורמת ליצירת נוגדנים אלוגניים (allogenic antibodies) שחוסמים העברת סכיזונטים מתא מודבק לתא תמים בבקר המוזרק שנית. חוסר התרבות הסכיזונטים פוגעת ביעילות התגובה החסינות.

בהתבסס על התאוריה של "חיסון על תנאי" ניתן להעריך הסטטוס האפידמיולוגי של העדר בזמן הנתון ע"י גילוי של טפילים סמויים. יישום של שיטות מולקולריות מתקדמות ובעלות רגישות גבוהה והערכת רמת נוגדנים סגוליים לטפילי דם הם הכלים המעבדתיים המאפשרים לברר ולהעריך תרומת חיסון חוזר בהקניית חסינות בפני קדחות רקצית. כמו כן, על פי Mahoney and Ross (1972) ניתן להעריך יציבות אנדמית בעדר ע"י בדיקות סרולוגיות אשר קבעו שנוכחות נוגדנים סגוליים לבבזיה ב 75% ראשי בקר בעדר מצביעה על יציבות אנדמית.

מטרות המחקר הנוכחי היו לאמוד חסינות ואורכה בבקר מבוגר השווה בשדה אנדמי לקדחות רקצית לאחר חיסון חוזר עם טפילים חיים, ליישם שיטות מולקולריות מתקדמות ורגישות לגילוי בקר נשא טפילים סמויים, לגבש המלצות אופרטיביות למגדלים.

### 3. פירוט עיקרי של הניסויים

הניסויים נערכו במשק בקר לבשר, בו כ 90 ראשי בקר חוסנו לראשונה בגיל גמילה (6-8 חודשים) וחיסון חוזר ניתן לשני שלישי מהעדר כעבור כ 3 שנים. החיסון החוזר בוצע עם בתרכיבים שגרתיים בפני טפילי *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Theileria annulata*. שלישי מהעדר שלא הוזרק שנית שימש כביקורת. המעקב כלל 2-3 ביקורים בשנה שבהם נלקחו דגימות דם לבדיקות משטחי דם, בדיקות סרולוגיות להערכה של רמת נוגדנים, בדיקות מולקולריות - PCR ו RLB. בנוסף, בכל ביקור נערך תשאול לגבי תחלואה או תמותה בעדר הנבדק ובכלל העדרים הרועים באזור.

### 4. תוצאות

בטבלה מס 1. מובאות תוצאות שהתקבלו במבחני PCR ובדיקת נוגדנים בבקר שחוסן לראשונה לפני שלוש שנים וביום החיסון החוזר עם טפילי *בבזיה* ו*תיילריה*. מבחינה סרולוגית רוב המכריע של הבקר נשא כייל נוגדנים סגוליים לטפילי *בבזיה*, אך כ 20% בלבד ל*תיילריה*. לעומת זאת, תוצאות PCR מצביעות על חשיפה מוגבלת לטפילים, שלישי נמצא כנושא טפילים לב. *ביגמינה*, ו 10% בלבד היו חיוביים לב. *בוביס* ו *לתיילריה*. נראה איפה שלפני חיסון חוזר הבקר היה רגיש להדבקות עם קרציות. לפי חוקרים אוסטרליים, בעדר בקר שבו יש לכי 75% מהעדר כייל נוגדנים משמעותי קיימת יציבות אנזאוטית לשתי *הבבזיות*. עם זאת קשה לקבוע על סמך

נוכחות נוגדנים בלבד מידת ומשך היציבות נגד בבזיוזיס. מספרות מדעית ידוע שחיסון בפני טפילי בבזיה מבוסס בעיקר על תגובה חיסונית תאית ולא הומורלית (Brown et al., 2006). עם זאת, מענן לציין, בעבודה של Norimine et al (2003) חיסון בקר עם אנטיגנים המכילים אפיטופים שמורים של תאי T, לא נצפתה תגובה תאית *in vitro* כגון שגשוג ציטוקינים (INF-) או תגובה הומורלית, כמו עליה ברמת ה IgG2.

בהתייחס לחיסון חוזר בפני טפילי תיילריה, מתוך 54 דגימות (טבלה מס. 2) נסיובים שנבדקו סרולוגית שנה אחרי חיסון חוזר נמצאו 17% חיוביים לתיילריה, ומתוך 11 נסיובים של בקר ביקורת 2 נמצאו חיוביים (18%) (ממצא לא הובא בדוח זה). ב PCR התקבלו תוצאות דומות, עם 23% חיוביים בבקר שהוזרק בפעם נוספת. רמת הנשאים בעדר היתה דומה (עד 20% חיוביים) בהשוואה לבקר נשא טפילים או נוגדנים לתיילריה לפני חיסון חוזר. ניראה איפה שהזרקתו של תרכיב ההומולוגי לא תרמה לעליה במספר בקר חיובי סרולוגית או ב PCR. על מנת לבחון יעילות חיסון עם זן הטרולוגי הוכנו תרכיבים מזו המשמש לחיסון שגרתי (זן T) ובנוסף מזן אחר (זן K). שני התרכיבים הוזרקו בשדה לקבוצת בני בקר צעירים. במהלך המעקב (סה"כ 73 בשתי קבוצות) אף אחד מבע"ח שהוזרק לא פיתח סימני מחלה, כלומר שני התרכיבים, השגרתי וזה החדש, מכילים טפילים ממויירים. הבדיקות סרולוגיות שבוצעו כ חצי שנה אחרי חיסון הראו ש 59% מהבקר שקיבל חיסון K היה חיובי עם כיויל ברמה של 1:64 ו 1:256. לעומת זאת, בקר שחוסן עם תרכיב השגרתי מזן T לרוב היה שלילי סרולוגית, רק ב 54% נמצאו נוגדנים בכיויל של 1:64 בלבד. בתיילריזיס, רמת הנוגדנים איננה מהווה מדד למידת חסינותו של בע"ח בפני תיילריזיס. בסיפורות המדעית תואר שבקר עם כיויל של 1:16 היה עמיד להוקעה עם קרציות נגועות (Shkap and Pipano, 2000). במבחני PCR 82.0% מהבהמות היו חיוביות בעקבות חיסון עם זן K ו 62.5% בעקבות תרכיב שיגרתי (טבלה מס.6). תוצאות PCR מעידות שהרוב המכריע של בקר הנו נשא טפילי תיילריה, ונראה שטפילים בתרכיב מזן K נשארים בבהמות זמן ארוך יותר בהשוואה לטפילים בתרכיב מזן T.

בבדיקות שנערכו שנתיים (טבלה מס.3) לאחר חיסון חוזר עם טפילי תיילריה הומולוגיים או הטרולוגיים ניראה שמספר בהמות חיוביות עלה ל 66.6% בחיסון עם טפילים מאותו זן לעומת בקר שקיבל טפילים מזן הטרולוגי (51.6%), לעומת זאת, אחוז החיוביים סרולוגית בשתי קבוצות ביקורת היה 20.8% ו 16.0%, בהתאמה. ניראה שכעבור שנתיים מחיסון חוזר עם טפילים הומולוגיים הייתה השפעה חיובית ברמה דומה, יותר ממחצית הבקר נשא נוגדנים סגוליים, ולחיסון הטרולוגי לא הייתה תרומה משמעותית לעומת טפילים מאותו זן. למרות שהניסוי בוצע בתנאי שדה לא ניתן להעריך מידת החשיפה של העדר לקרציות נגועות, עם זאת, ההבדלים בין קבוצות מחוסנות וקבוצות ביקורת הם בולטים, לכן מומלץ לחסן בקר שנית כי 3-4

שנים לאחר החיסון הראשוני. יש לציין גם את העובדה שתרכיב תיילריה הנו בטוח לבקר בכל גיל.

בטבלה מס' 4 הובאו תוצאות בדיקה סרולוגית של בקר שבחלקו חוסן שנית עם טפילים הטרולוגיים (מזן שונה מזה שהיה בתרכיב), וחלק לא חוסנו. מהתוצאות שהתקבלו נראה שהזרקת תרכיבים לא תרמה להעלאת מספר בהמות הנושאות נוגדנים לב.ביגמינה, אחוז חיוביים סרולוגית בקבוצה שחוסנה וזאת של הביקורת 61% ו 60% בהתאמה. מעניין לציין שלגבי ב.בוביס אחוז הבקר עם כייל נוגדנים סגוליים היה אף נמוך במקצת לעומת קבוצת ביקורת.

מתוצאות של בדיקות PCR (טבלה מס' 5) נראה שהייתה ירידה במס' בעלי חיים נשאים הן לב.ביגמינה (33%) ולב.בוביס 23% מתוך המחוסנות, ומתוך קבוצת הביקורת רק מחצית מבע"ח נשארו חיוביים לב.ביגמינה, ו 7% בלבד לב.בוביס. בטבלה מס' 6 שבה מסוכמות תוצאות סרולוגיות, רוב בע"ח (98%) היו בעלי כייל חיובי לשתי ה *בבזיות* שנה וחצי לאחר חיסון. תוצאות אלה מחזקות ממצאים קודמים על כך שתגובה חיסונית הומורלית נמשכת בבקר זמן מה ללא נוכחות טפילים, מצב של חיסון "סטריילי" שתואר באוסטרליה ובדרום אפריקה. על פי De Waal, (1996) בבקר שטופל עם תכשירים רפואיים (chemosterilization of infection) נשמרה חסינות לב.בוביס במשך יותר מ 3 שנים, ואילו לב.ביגמינה בקר הפך לרגיש 6 חודשים לאחר טיפול. לאור העובדה שכמעט כל הבקר חיובי סרולוגית עם כייל נוגדנים משמעותי ניתן להסיק ש חסינות העדר לבבזיוזיס היא ברמה סבירה. תוצאות בדיקות סרולוגיות ובדיקות PCR לטפילי *בבזיה* שבוצעו שנתיים לאחר חיסון חוזר מסוכמות בטבלה מס' 7. מספר חיוביים IFA לב.ביגמינה ולב.בוביס היה 94.5% ו 95.5% בהתאמה, בקרב בקר שחוסן, בקבוצות ביקורת כל הבקר 100% היו חיוביים לב.בוביס ו 84.0% לב.ביגמינה. תוצאות ב PCR מצביעות על חשיפה בלתי מספקת לטפילי ב.בוביס בשדה, כי מספר בע"ח נושאי DNA של ב.בוביס ירד הן בקבוצה שחוסנה שנית, והן בקבוצת ביקורת (46.0% בין מחוסנים ו 12.5% בביקורת). מאידך, נראה שלטפילי ב.ביגמינה הייתה חשיפה משמעותית אשר קיבלה ביטוי חן במבחני PCR וכן במבחנים סרולוגיים.

תוצאות בדיקות PCR לנישאות DNA טפילי ובדיקות IFA לרמת נוגדנים 3 ו 3.5 שנים לאחר חיסון חוזר מוצגות בטבלה מס' 8. שלוש ושלוש וחצי שנים לאחר חיסון חוזר כמעט כל הבקר (98.5%), נמצא חיובי סרולוגית לב.בוביס ו 39% היו חיוביים ב PCR. לב.ביגמינה 73% ו 58% נשאי נוגדנים זה DNA טפילי, בהתאמה. כעבור חצי שנה נצפתה ירידה בערכים לגבי הבבזיות. לגבי טפילי תיילריה 3 ו 3.5 שנים אחרי חיסון חוזר, רמת נוגדנים משמעותית נמצאה ב 38.0% ו 47.5% מהבקר בהתאמה. בדיקות חיוביות ל PCR נמצאו אצל 34% ו 35%

בהתאמה. תוצאות אלה מצביעות על כך שחלק גדול של בהמות בעדר נחשף לקרציות נגועות, בבקר נשמר זיכרון חיסוני סביר, ואת הערכים שהתקבלו ניתן לייחס בעיקר למידת הדבקות חוזרות בשדה מקרציות. השוואת מדדים מעבדתיים (טבלה מס. 9) בחדשי קיץ וחורף גילתה שבחודשי קיץ מעל 85% בקר נמצא חיובי ל**ב.ביגמינה**. נירא איפה שרוב המכריע של הבקר כולל קבוצת ביקורת שלא חוסנה שנית הוטפל בקרציות נגועות. לגבי **ב.בוביס**, כמחצית הבקר נשא DNA טפילי בקרב מחוסנים, וכשליש הלא מחוסנים. בבדיקות PCR ל**תיילריה** נמצאו 49% נשאים בקרב מחוסנים שנית, ואף יותר ממחצית (מעל 56%) בקבוצת ביקורת. תוצאות אלו מצביעות על פעילות גבוהה נוספת של קרציות, ועל נגיעותם בטפילי דם. תמונה שונה לחלוטין התקבלה כאשר הבדיקות נערכו חצי שנה מאוחר יותר בחודשי החורף (טבלה מס. 9). ירידה משמעותית נצפתה במספר נשאים בקבוצות של בקר מחוסן לשני סוגי ה**בבזיה** (פי 5 פחות חיוביים ל**ב.ביגמינה** ופי 3.5 פחות ל**ב.בוביס**), כאשר בבדיקות רק 1.5% היו PCR חיוביים ל**ב.ביגמינה** ואף לא בהמה אחת חיובית ל**ב.בוביס**. מספר נשאי טפילי **תיילריה** היו כמעט פי 2 קטן יותר מאשר בחודשי הקיץ, אך לא היה הבדל משמעותי בין המחוסנים וקבוצת ביקורת. בישראל קרצית ה**באופילוס** ידועה בפעילותה הגבוהה גם בחודשי חורף (בכינוי עממי "קרצית החורף"), אחוז נמוך של נשאי **בבזיה** בחורף ניתן להסביר בריסוסים קפדניים נגד קרציות שמתבצעים במשק הניסוי. נראה איפה שכתוצאה מפעילות מוגברת של קרציות בקיץ הבקר נחשף לטפילי ה**בבזיה** וחשיפה זו מחזקת את החיסון הקיים. למרות חוסר חשיפה מספקת בחורף לא נרשמה בעדר זה תמותה כתוצאה משבירת חיסון או ירידה בחסינות הנרכשת במהלך כל התקופה.

לגילוי טפילי דם סמויים בבקר שחוסן מספר שנים לפניכן יושמה שיטה מולקולרית חדשה RLB (Reverse line hybridization). השיטה מורכבת משילוב PCR והיברידיזציה עם גלאים ייחודיים לכל טפיל שניתן לאתר בו זמנית על ממברנה אחת. שיטה זאת הוכחה כרגישה ויעלה כאשר יושמה לבדיקות נשאות באנפּלזמה (Molad et al., 2006). פרטי רצפים לבדיקות RLB ולכל הטפילים מוצגים בטבלה מס. 10, והרצפים הייחודיים מפורטים בתמונה מס. 1. כפי שנראה בתמונה מס. 2 הדגימות בערוצים 7, 8, 11 ו 13 נמצאו שליליות, בערוץ 5 התקבלו תוצאות חיוביות ל**ב.בוביס** ו**ב.ביגמינה**. ריכוז הגלאים היה 100 pmole, וגלאי ל**ת.אנולטה** בריכוז 400 pmole. בערוץ 1 דוגמא מעגל בריא, ביקורת שלילית, בערוץ 4 ביקורת חיוביות ל**תיילריה** אנולטה, ביקורת חיובית ל**ב.בוביס** בערוץ 2, בערוץ 3 ביקורת חיובית ל**ב.ביגמינה**, ערוצים 5-22 נשאים בעדר אשר חוסן בפני קדחת הקרציות לפני כשלוש שנים. רמת הרגישות במערכת ה-PCR לזיהוי של **בבזיה בוביס**, **בבזיה ביגמינה** ו**לתיילריה אנולטה** היא כדורית נגועה אחת ל  $10^6$ - $10^7$  תאי דם אדומים. שיטת ה-RLB ל**בבזיה** ו**לתיילריה** שיושמה בעבודה זו מאפשרת

זיהוי בו זמני של שלושת הפתוגנים, בבזיה בוביס, בבזיה ביגמינה וטיילריה אנולטה, עם זאת, שיטה זו רגישה פחות משיטות ה-nPCR בשיטת RLB ניתן לסרוק בו זמנית הרבה דוגמאות ולמזהמים שונים, אך לגילוי הנשאות יש עדיפות לשיטת ה-nPCR שהנה רגישה יותר.

## **5. מסקנות והשלכות המחקר כולל הצעות ליישום בתוצאות**

על פי תוצאות שהתקבלו במהלך שנות המחקר המסקנות לגבי חיסון חוזר בפני טפילי *טיילריה ובזיה* אינן אחידות. כבר חצי שנה לאחר חיסון חוזר נגד *טיילריה* הייתה עליה משמעותית במספר בקר בפיתוח נוגדנים סגוליים והיה נושא DNA טפילי. כתוצאה מחיסון מוצלב עם זנים שונים של טפילי *טיילריה* עלה מספר בהמות חיוביות סרולוגית בשליש מהעדר, לעומת 20% בקבוצת בקר שלא חוסן שנית. המסקנה העיקרית שחיסון חוזר בפני *טיילריה* מומלץ, חיסון בבקר מבוגר הינו בטוח ותורם משמעותית לחסינות למספר שנים נוספות.

לגבי שני סוגי ה**בבזיות** הבדלים משמעותיים בנתונים של רמת נוגדנים ובעיקר גלויים של חומצות גרעין טפיליות נצפו כשנתיים לאחר חיסון חוזר. תוצאות שונות בפרמטרים מעבדתיים נצפו בחודשי קיץ לעומת חורף. החשיפה בחודשי קיץ, תקופה בה פעילות של קרציות גבוהה מאפשרת התחסנות שנמשכת בעונות שאין בהן פעילות רבה של קרציות. תרומתו של חיסון חוזר הייתה שולית למרות של ב.בוביס בקרב בקר מחוסן היו יותר נשאים לעומת בקר בקבוצת ביקורת. עם זאת, לאור רגישותו הגבוהה של בקר מבוגר לחיסון עם טפילי *בבזיה* מצד אחד, ותרומה שולית של חיסון חוזר מאידך, מובילה למסקנה לא לחסן בקר נגד *בבזיות* שנית. שיטת ה-RLB מתאימה לבדיקות המוניות של עדר לעומת שיטות אחרות המתאימות לבדיקת בהמות בודדות, אך רגישותה נמוכה יותר לגילוי גדול יותר של נשאים כשמספר הטפילים בזרם הדם נמוך מסף רגישות הבדיקה.



טבלה מס.1. הערכים של רמת נוגדנים במבחן IFA ותוצאות PCR בבקר ביום חיסון חוזר בפני טפילי בבזיה ותיילריה (n=89)

הטפיל	אחוז בקר חיובי סרולוגית	אחוז בקר חיובי ב PCR
בבזיה ביגמינה	87.5	35.0
בבזיה בוביס	81.5	10.0
תיילריה אנולטה	19.5	10.5

טבלה 2 . תגובות בקר להזרקת תרכיבים משני זנים שונים נגד תיילריה אנולטה חצי שנה לאחר חיסון

תרכיב מין:	מס' בהמות שחוסנו	חיוביים סרולוגית (%)	טווח רמת נוגדנים ב IFA	חיוביים ב PCR (%)
T	33	54	1:64-1:256	62.5
K	40	59	1:64	82.0

טבלה מס. 3. אחוז הבקר הנושא נוגדנים לטפילי תיילריה אנולטה שנתיים לאחר חיסון חוזר עם תרכיב הומולוגי והטרולוגי

אחוז בקר חיובי	חיסון חוזר עם:	מספר בהמות בקבוצה	זן תרכיב בחיסון ראשוני וביקורת לחיסון חוזר
66.6	T	16	T
20.8		8	ביקורת T
51.6	K	22	T
16.0		9	ביקורת K

טבלה 4 . תוצאות בדיקות סרולוגיות לנוכחות נוגדנים פלואורסצנטיים (IFA) בבקר שנה לאחר חוסן חוזר בתרכיבים נגד טפילי בבזיה (n=86)

בע"ח	בע"ח שנבדקו	עם כייל נוגדנים לב.ביגמינה (%)	עם כייל נוגדנים לב.בוביס (%)
חוסנו שנית	66	61	72
לא חוסנו שנית	20	60	80

טבלה מס. 5 תוצאות בדיקות ב PCR כ 18 חודשים לאחר  
 חיסון חוזר נגד בבזיוזיס ( n=76 )

תוצאות המבחנים ב PCR	סה"כ חוסנו שנית ( n = 63 )	סה"כ בקבוצת ביקורת ( n = 13 )
אחוז חיוביים לב.ביגמינה	33	23
אחוז חיוביים לב.בוביס	23	7

טבלה מס. 6 . התפלגות כייל נוגדנים ב IFA בבקר 18 חודשים  
 לאחר חיסון חוזר (n=49)

% סה"כ חיוביים	אחוז הבקר עם כייל נוגדנים			סוג הטפילים
	1:256	1:64	שלילי	
98.0	20	28	1	ב.בוביס
98.0	30	18	1	ב.ביגמינה

טבלה מס. 7 . תוצאות בדיקות סרולוגיות ו PCR שנתיים אחרי חיסון חוזר

תוצאות המבחנים ב PCR	בקר שקיבל חיסון חוזר (n=74)	בקר בקבוצת ביקורת (n=8)
אחוז חיוביים לב.ביגמינה	78.3	87.5
אחוז חיוביים לב.בוביס	46.5	12.5
תוצאות המבחנים ב ( IFA )	בקר שקיבל חיסון חוזר (n=74)	בקר בקבוצת ביקורת (n=11)
אחוז חיוביים לב.ביגמינה	95.5	84.0
אחוז חיוביים לב. בוביס	94.5	100

טבלה מס. 8 . בדיקות סרולוגיות ו – PCR שלוש ושלוש וחצי לאחר חיסון חוזר

חיוביים ב PCR		חיוביים סרולוגית ( IFA )		סוג הטפיל
3.5	3	3.5	3	מס' שנים לאחר חיסון חוזר
80	79	41	67	מס בהמות שנבדקו
48.8	58.0	53.8	73.0	ב. ביגמינה
20.0	39.0	91.3	98.5	ב. בוביס
35.0	34.0	47.5	38.0	תיילריה אנולטה

טבלה מס. 9. בדיקות PCR לנוכחות DNA טפילי בחודשי קיץ וחורף

סוג הטפיל	קבוצות בקר במעקב	אחוז חיוביים (קיץ 2006)	אחוז חיוביים (קיץ 2007)
ב. ביגמינה	חוסנו	87.5	16.4
	ביקורת	85.0	1.5
ב. בוביס	חוסנו	48.0	13.4
	ביקורת	37.0	0
תיילריה אנולטה	חוסנו	49.0	28.3
	ביקורת	56.3	31.0

טבלה מס. 10. רצפים ליישום מבחן RLB לגילוי טפילי דם

Oligonucleotide probe	Gene	Sequence	Reference
Catch -all	18S rRNA	(Amin)TAATGGTTAATAGGARCRCGTTG	Gubbles et al., 1999
<i>B.bovis</i>	18S rRNA	(Amin)CAGGTTTCGCCTGTATAATTGAG	Gubbles et al., 1999
<i>B. bigemina</i>	18S rRNA	(Amin)CGTTTTTCCCTTTTGTTGG	Gubbles et al., 1999
<i>T. annulata</i>	18S rRNA	(Amin)CCTCTGGGGTCTGTGCA	Gubbles et al., 1999
<i>B.bovis</i>	small HSP	(Amin)TCGTCGAAATCATGTTGGC	Designed For present study
<i>B. bigemina</i>	small HSP I	(Amin)TGCTTTATCGCACACACATG	Designed For present study

**תמונה מס' 1. רצפי הגללים אשר עברו היברידיזציה לממברנה להמשך המבחן**

```

801                                     850
B.bovis ATATTAAACT TGTTGCAGTT AAAAAGCTCG TAGTTGTACT TCACGTCCCC
B.big   ATATTAAACT TGTTGCAGTT AAAAAGCTCG TAGTTGTATT TCAGCCTCGC
T.annu  ATATTAAAT  TGTTGCAGTT AAAAAGCTCG TAGTTGAATT TCTGCTGCAT
851                                     900
B.bovis CGCTTGGTCC .....TTTCC TCG.....
B.big   GTTTTTTCCC .....TTTTC TTGGGTCTTT
T.annu  TGCTTGTGTC CCTCTGGGGT CTGTGCATGT GGCTTTTTTTC GGACGGAGTT
901                                     950
B.bovis ..CCGGGACG CCTCGTTACT TTGAGAAAAT TAGAGTGTTT CAAGCAG..G
B.big   TCGCTGGCTT TTTTTTTACT TTGAGAAAAT TAGAGTGTTT CAAGCAGACT
T.annu  TCTTTGTCTG AATGTTTACT TTGAGAAAAT TAGAGTGCTC AAAGCAGGCT
951                                     1000
B.bovis TTTTCGCCTGT ATAATTGAGC ATGGAATAAC CTTGTATGAC CCTGTCGTAC
B.big   TTTGTCTTGA ATACTTCAGC ATGGAATAAT AGAGTAGGAC CTTGGTTCTA
T.annu  TTCGCCTTGA ATAGTTTAGC ATGGAATAAT AAAGTAGGAC TTTGGTTCTA
    
```

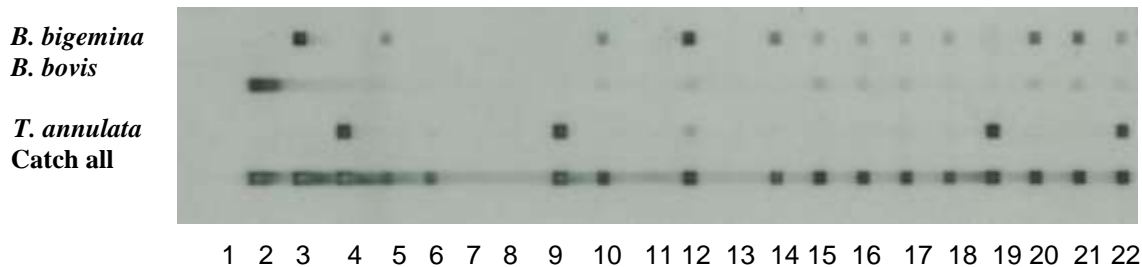
**המיקום של הגללים היחודיים בגן 18S rRNA, הגללי של ב.בוביס מסומן בוורוד הגללי של ב.ביגמינה מסומן בכחול ושל ת. אנולטה באדום**

```

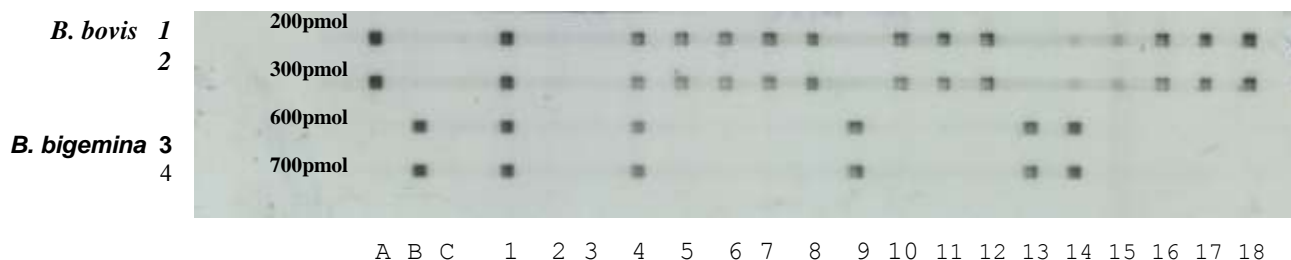
HSPBIG          ATGTGACGCAGAAAGCGGCGCACCTTAAAGGCAGCTCAATTCGCAGTGTTAGATAGCTTG 165
BIGprobe        -----TG 2
HSPBOV          TCTCTTTTCTTAGTATATTGTAATTCATGTATAAGACGCAGAATAAATTGTCAGGTGAA 480
BOVprobe        -----
HSPBIG          CTTTATCGCACACACATGTTTTCTCAGACTGAGAAGCCCTCTGTGATTTACAAGCCGTCG 225
BIGprobe        CTTTATCGCACACACATG----- 20
HSPBOV          AATCGTCGAAATCATGTTGGCATAAATAGTGCAATTCATTAATATTGTTGCAGAGTGAGAA 540
BOVprobe        --TCGTCGAAATCATGTTGGC----- 19
*   *   *   *   *
    
```

**המיקום של הגללים הייחודיים בגן המקודד ל- small heat shock protein, רצף הגללי של ב.בוביס מסומן בסגול רצף הגללי של ב.ביגמינה מסומן בכחול**

תמונה מס. 2. גילוי טפילים סמויים ב RLB ע"י רצפים 18 S rRNA כשלוש שנים לאחר  
 חיסון חוזר



תמונה מס. 3. בדיקת רגישות ויחידיות שיטת RLB לגילוי נשאים של טפילי בבזיה  
 (הגלאים מבוססים על גן small heat shock protein)



בבארות A, B, C – ביקורת שלילת, ב.בוביס וב.ביגמינה, בהתאמה

בבארות 1-19 דגימות מבקר שחוסן בפני טפילי בבזיה

- Bock, R., deVos, A. 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.*, 12: 832-839
- Bock, R., DeVos, A., Kingston, T., Shiels, I. and Dalgliesh, R. 1992. Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. *Vet. Parasitol.*, 43, 45-56
- Brown WC, Norimine J, Goff WL, Suarez CE, McElwain TF. Prospects for recombinant vaccines against *Babesia bovis* and related parasites. *Parasit Immunol* 2006; 28(7):315-27.
- Callow, L., Dalgliesh, R. and De Vos, A. 1997. Development of effective living vaccines against bovine babesiosis the longest field trial. *Int. J. Parasitol.*, 27: 747-767.
- DeWaal, D., 1996. Vaccination against babesiosis. *Acta Parasit. Turcica*. 20, 487-499.
- Donatien, A. and Lestoquard, F., 1938. La premunition et les vaccinations premunitives dans la pathologie Veterinaire. *Bull. Acad. Vet. France*, 8 (2),1.
- Mahoney, D., and Ross, D. 1972. Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. *Aust. Vet. J.* 48, 292-298
- Molad, T., Mazuz, M., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., F. Jongejan, Shkap, V. 2005. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microb.* 113: 55-62.
- Shkap, Varda and Pipano E. 2000. Culture-derived parasites in vaccination of cattle against tick-borne diseases *Ann. N.Y. Acad. Science*, 916: 154-171.
- Timms, P., Dalgliesh, R., Barry, C., Dimmock, C. and Rodwell, B. 1983. *Babesia bovis*: comparison of culture-derived parasites, non-living antigen and conventional vaccine in the protection against heterologous challenge. *Aust. Vet. J.*, 60, 75-77.