

דוח מסכם לתוכנית: 851-0353-22

שם התוכנית

חיסון פרות חוזר נגד נאוספורה קנינום (*Neospora caninum*) במספר הריונות עוקבים

שמות השותפים למחקר, שטח פעולה וחלקו במחקר

מוניקה לשקוביץ מזוז, וטרינרית מומחית בפרזיטולוגיה – חטיבה לפרזיטולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון - monical@moag.gov.il . חוקרת ראשית.

מאור קדמי – "החקלאית" – נציג הרופאים הקליניים

בני לייבוביץ – וטרינר מומחה בפרזיטולוגיה, חטיבה לפרזיטולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון.

ביקור משקים, אחראי על אחסון וניהול החיסונים

איגור סויצקי – אחראי סרולוגיה בפרזיטולוגיה, חטיבה לפרזיטולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון,

אחראי על הסרולוגיה

ילנה בלינדר – עבודה עם תרביות תאים, חטיבה לפרזיטולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קמרון,

אחראית על גידול הטפילים בתרביות תאים לצורך הכנת תרכיב ואנטיגן

ניב לבון – התאחדות מגדלי הבקר בישראל – אחראי תוכנית נעה, לזימון ודיווח של פרות

משתתפות בניסוי

שרון תירוש - לוי – רופא וטרינרית, PhD - אחראית על ביקורי שדה, ניהול רשימות הפרות

המשתתפות ומתן לחיסונים.

תקציר מדעי של תוכנית המחקר

מחלת נאוספורוזיס, הנגרמת על ידי הטפיל החד-תאי, נאוספורה קנינום (*Neospora caninum*), נחשבת כאחד הגורמים העיקריים להפלות בבקר. המחלה מסבה נזקים כלכליים כבדים לענף הבקר לחלב ולבשר בישראל ובעולם. הימצאות המחלה בארץ הינה גבוהה, כאשר העברה אנכית של הטפיל במהלך ההיריון הינה דרך ההדבקה העיקרית. הדבקת העובר יכולה לגרום להפלה, או להמלטה של עגל או עגלה שנראים בריאים אך נגועים בנאוספורה. כיום לא קיים טיפול תרופתי או חיסון מונע המאפשרים צמצום של הנזקים הנגרמים על ידי נאוספורוזיס בבקר. בעבודות ראשוניות שנעשו בארץ, הזרקה של טפילים חיים, טריים או קפואים, הצליחה להפחית בכ-55% את שיעור ההפלות בפרות חיוביות סרולוגית. מטרת עבודה זו היו להעריך את יעילות השימוש בחיסון במהלך ההיריון למניעת הפלות. בנוסף, לאור העובדה שנאוספורוזיס גורמת להפלות

חוזרות בבקר, לבדוק את יעילותו של חיסון לא רק בהריון אחד אלה בהריונות עוקבים, ולהשוות את רמת ההפלות של אותן פרות לפרות נשאיות שאינן מחוסנות ולפרות שליליות.

במהלך הניסוי נאספו דגימות מ-2059 מבכירות מחמש רפתות. ההמצאות הסרולוגית של נאוספורה בכלל המשקים היה 61% (בכייל של 1:200 או יותר) ו-33% היו עם כייל של 1:800 או יותר. מתוך 1059 הפרות שנדגמו, 260 נדגמו לפחות פעמיים ומתוך 21 נדגמו שלוש פעמים. מרבית הפרות שמרו על הסטטוס הסרולוגי שלהן (חיובי/שלילי), אך היו שינויים בכייל בין דיגומים. ל-288 מהדגימות בוצעה, בנוסף ל-IFAT, גם בדיקה בערכת Immunocomb שמתאימה לעבודה בשטח המתאם בין תוצאות שתי הבדיקות היה גבוה ומובהק ($P < 0.001$, $\rho = 0.727$), אך לא מושלם, כאשר הקיט זיהה היטב בעיקר פרות תעל כייל הגבוה מ-1:800.

בסך הכל נאספו דגימות דם מ-132 עגלים לפני קולוסטרומ, שנולדו לפרות שהשתתפו בניסוי. שיעור ההעברה האנכית היה גבוה יותר, בהתאם לכייל הסרולוגי של האמא, כאשר שיעור ההעברה האנכית מאמהות עם כייל גבוה היה 90%.

מתוך 1476 הריונות להם ידועה תוצאת ההריון, 1303 (88%) הסתיימו בהמלטה תקינה, ואילו 173 (12%) הסתיימו בהפלה. שיעור ההפלות עלה בהריונות עוקבים ונמצאה קורלציה חיובית בין מספר המחזור ושיעור ההפלות ($P < 0.001$, $\rho = 0.171$). שיעור ההפלות עלה בהתאם לכייל הסרולוגי לניאוספורה ($P < 0.001$, $\rho = 0.213$), אך לא נמצא קשר בין נגיעות בנאוספורה להזרעות מרובות או הוצאה מהעדר.

בסל הכל, מתוך 351 מבכירות עם כייל גבוה מ-1:800 חוסנו 173 ומתוך, 24 חוסנו שוב בהריון הבא. לא נמצא הבדל מובהק בין שיעור ההפלות במחוסנות (16.5%) ללא מחוסנות (18.5%) ($P = 0.590$). בנוסף, לא נראתה השפעה של החיסון על הזרעות מרובות ($P = 0.618$), העברה אנכית לעגלים ($P = 0.414$), או שיעור היציאה מהעדר ($P = 0.399$), לא בחיסון יחיד ולא בחיסון חוזר. בבחינת השפעת החיסון במשקים השונים, ניתן לראות שיעור הפלות נמוך יותר במחוסנות בשניים מתוך חמשת המשקים, אך ללא מובהקות סטטיסטית.

תוצאות הניסוי מחזקות את המסקנה שההשפעה הקלינית של נאוספורה היא רב גורמית, וכי השפעות סביבתיות וממשקיות עשויות להיות קריטיות ליעילות החיסון במניעת הפלות. בנוסף, היות והשפעת החיסון לא היתה מובהקת באף אחד מההריונות, לא ניתן היה להסיק על יעילות מתן חיסון חוזר.

מבוא ותיאור הבעיה - סקירת הידע הקיים בארץ ובעולם בנושא

מחלת הנאוספורוזיס נחשבת לגורם עיקרי של הפלות בבקר ולכן מסבה נזקים כלכליים לענף גידול הבקר בישראל ובעולם (Reichel et al., 2013). הטפיל החד - תאי *נאוספורה קנינום* הגורם למחלה נפוץ בכל העולם ובודד באזורים גיאוגרפיים רבים, לרבות בישראל (Fish et al., 2007; Dubey and Shares, 2011). המצאות המחלה בישראל הינה גבוהה. דווח בעבר על כך שכ- 40% מהפרות המפילות הינן חיוביות סרולוגיות לנאוספורוזיס וב- 18% מהמקרים גם הנפל חיובי (Mazuz et al., 2011). בבדיקות אבחון שגרתיות שמגיעות למכון הווטרינרי בשנים אחרונות עולה שמעל 50% מההפלות בישראל מיוחסות סרולוגית לנאוספורוזיס.

מחזור החיים של הטפיל מורכב מפונדקאי סופי, הכלב וכלביים נוספים, ומפונדקאי ביניים כגון : בקר, צאן, סוסים, ועוד מגוון בעלי חיים לרבות כלביים. פרות יכולות להדבק מאכילת אואוציסטות (oocysts) המופרשות ע"י הפונדקאי הסופי או על ידי העברה אנכית מהאם לזמן ההיריון. בבקר ההדבקה העיקרית נעשית בשלב התוך רחמי, הדבקת העובר עלולה לגרום להפלה או להמלטה של עגל או עגלה שנראים בריאים אך נגועים ב*נאוספורה*. עגלות שנדבקו בשלב עוברי נשארות נשאיות של הטפיל ועלולות להעביר את הטפיל בכל ההריונות ולסבול (או לא) מהפלות. הדבקת הבקר ב*נאוספורה* והמחלה המתפתחת אינן מלוות בסימנים קליניים מלבד הפלה. במקביל, הגירוי של המערכת החיסונית מעורר יצירת נוגדנים ייחודיים, שגילויים בנסיוב הפרות מעיד על חשיפתן לטפיל. הסיכוי להפיל ולחוות הפלות חוזרות גבוה פי חמש בפרות חיוביות סרולוגית מאשר בפרות שליליות (Mazuz et al., 2014).

למרות הנזקים הכבדים, לא קיים עד היום טיפול תרופתי או חיסון מונע שמאפשר לצמצם את הנזקים הנגרמים מהמחלה. בעבודה שבדקה שיטות שונות למזעור נזקי המחלה לפי מודלים מתמטיים, נמצא שהחיסון נחשב כאסטרטגיה הטובה ביותר לשליטה במחלה במקרה של שכיחות גבוהה של נאוספורוזיס (Reichel and Ellis, 2006). מספר רב של ניסויים על חיסון כנגד נאוספורוזיס נעשו בשנים האחרונות בעכברים, בכבשים ובבקר (Reichel and Ellis, 2009; Innes et al., 2011). העבודות המצליחות ביותר בבקר נעשו עם טפילים חיים (Monney and Hemphill, 2014). למרות שמנגנון התחסנות הבקר מפני נאוספורוזיס אינו ידוע במלאו, בניסוי שבו פרות נחשפו ל*נאוספורה* לפני ההזרעה ובהמשך הוזרקו בטפילים חיים ביום ה-140 להריון, נמצא שהחשיפה המחודשת לטפילים בזמן ההיריון יוצרת גירוי של מערכת החיסון ומקנה הגנה מפני הפלה. כתוצאה מכך מסתיים ההיריון בהמלטה של עגל בריא אך נושא נוגדנים סגוליים ל*נאוספורה* (Innes et al., 2001, Bock et al., 2007, Weber et al., 2013). בארץ נעשו מספר עבודות עם חיסון ניסיוני בפרות לחלב נגד נאוספורוזיס. בעבודה ראשונה חוסנו פרות חיוביות סרולוגיות ב- 120-140 ימים להריון עם 1×10^8 טפילים טריים שגודלו בתרבית. במעקב לאחר

ההיריון נצפתה ירידה משמעותית ברמת ההפלות; בפרות חיוביות רמת ההפלות היתה כ- 26% בעוד שבפרות חיוביות שחוסנו רמת ההפלות ירדה ל כ- 15% (Mazuz et al., 2015). בניסוי השני פרות חיוביות סרולוגית חוסנו בימים 120-140 להריון עם טפילים חיים לאחר הקפאה. שימוש בחיסון מוקפא מאפשר בניית מאגר חיסונים זמין ללא צורך בהתאמה בין מצב גידול הטפילים בתרבית וזמן ההיריון של הפרות. בניסוי זה חיסון הפרות עם כ- 2×10^8 טפילים הוריד את רמת ההפלות מ- 29.6% בפרות חיוביות ללא חיסון ל- 10.3% בפרות המחוסנות (Mazuz et al., 2014). בניסוי שבוצע בשנים האחרונות, החיסון שנעשה עם טפילים חיים מוקפאים כפי שתואר למעלה, בוצעה במקביל ב4 רפתות במקומות שונים בארץ. הניסוי הראה שיעילות החיסון בהורדת הפלות בפרות החיוביות לנאוספורה במהלך ההיריון נע בין 19%- ל 75% ברפתות השונות. ב3 מתוך 4 הרפתות יחד, יעילות החיסון הייתה מעל ל-50% (Mazuz et al., 2021). במעקב אחר שני הריונות עוקבים לאחר החיסון (ללא חיסון חוזר) נמצאה עליה הדרגתית בשיעור ההפלות במרבית הרפתות, ולא ניתן היה לקבוע אם החיסון מקנה הגנה לאורך זמן, או רק להריון בו ניתן החיסון. על כן, מטרת המחקר הנוכחי הינה לחסן מחצית מהפרות המבכירות שיהיו חיוביות סרולוגית לנאוספורה, לעקוב אחר פרות מחוסנות ולא מחוסנות במשך מספר הריונות ולבדוק האם חיסון יחיד מקנה הגנה ארוכת טווח או שיש לחסן פרות חיוביות בכל הריון.

מטרות המחקר

- לבדוק יעילות וכדאיות של חיסון מפני הפלות הנגרמות על ידי הטפיל נאוספורה קנינום בבקר לחלב לאורך מספר הריונות עוקבים.
- לבדוק רמת נגיעות בנאוספורה בעגלות שנולדות מאימהות חיוביות מחוסנות ולא מחוסנות.

שיטות ותוצאות

מהלך העבודה

העבודה התבצעה בחמש רפתות בהן קיימת בעיה של הפלות קשורות להימצאות סרולוגית לנאוספורה קנינום, ואשר הרופאים הקליניים והרפתנים הביעו רצון להשתתף במחקר. בחירת הרפתות נעשה לפי מספר מבכירות חיוביות ולפי נימוקים ייחודיים כמו רפת 5 אשר השתתפה במחקר הקודם ונראו תוצאות משמעותיות של כ- 75% בהורדת הפלות בקבוצת הפרות המחוסנות

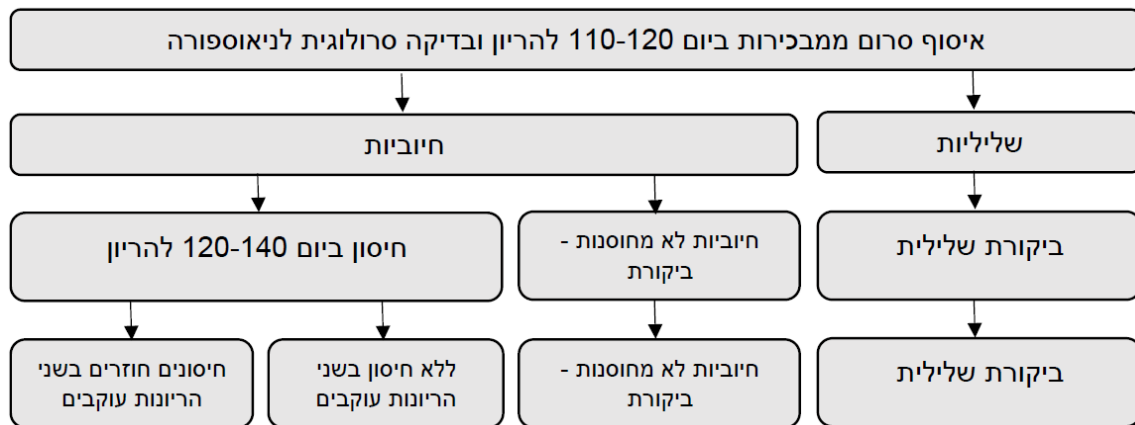
(Mazuz et al., 2021). רפת 6 צורפה לניסוי רק במאי 2022, כדי להגדיל את המדגם. רפת 4 הוצאה מהמחקר, לאחר שהתקבלו מעט מאוד דוגמאות, ומרביתן שליליות.

בתחילת העבודה התקיימה פגישה עם הרפתנים והוטרנירים המטפלים על מנת להסביר את תוכנית המחקר ונתוני הבדיקות הדרושות, והוספה קטגוריה במערכת נעה המזמנת את הפרות לבדיקה ומאפשרת לסמן את הפרות המשתתפות בניסוי.

העבודה התחילה עם קבוצת המבכירות אשר נבדקו סרולוגית לניאוספורה בימים 110-120 להריון. מחצית מהמבכירות החיוביות (בכיל של לפחות מ-1:800) חוסנו בין ימים 120 ל-140 להריון, והמחצית השניה שימשה כביקורת (תרשים 1). המעקב על כל הקבוצה נמשך 2-3 הריונות עוקבים, כאשר בהריון השני מחצית מהפרות שחוסנו, חוסנו חיסון חוזר, ומחציתן לא חוסנו שוב (חיסון יחיד) (תרשים 1). נתוני ההפלות וההמלטות של כל הפרות שמשתתפות בניסוי נאספו ממערכת נעה.

נתוני העברה אנכית בוצעו על ידי בדיקת סרולוגית של עגלים שנולדו לפרות המחקר (איסוף הדם התבצע לפני שתיית הקולוסטרם, במידת האפשר).

תרשים 1. תכנון מהלך העבודה



הכנת תרכיב חי נ. קנינום

טפילי נאוספורה קנינום (NciS491) מבידוד ישראלי (Fish et al., 2007), אשר נשמרו בחנקן נוזלי, הוצאו מההקפאה לצורך הניסוי וגודלו ברצף בתרביות Vero (Shkap et al., 1991). תאי המאכסן גודלו כרובד (monolayer) בבקבוקי פלסטיק והוחזקו באינקובטור עם 5% CO₂, בטמפ'

37°C. חלוקה והעברת התאים נעשתה מדי 72-96 שעות, על ידי פירוק רובד התאים עם תמיסת טריפסין – ורסן (0.05% ו 0.02% בהתאמה). לצורך הכנת התרכיב, טפילי נאוספורה קנינום חיים הופרדו מתאי המאכסן ונספרו בתא ספירה Neubauer. מנות של תרכיב המכילות 2 x 10⁸ טפילים במצע מזין L-15 עם 10% DMSO נשמרו בחנקן נוזלי עד להזרקתן ביום החיסון. התרכיב יוזרק תת- עורית. עד כה נוצרו כ-150 מנות תרכיב.

בדיקה סרולוגית לנ. קנינום

דגימות דם נאספו מהפרות בימים 110-130 להריון. הנסיוב הופרד מהדם על ידי סירכוז ב 1500 rpm במשך 10 דקות. בדיקות סרולוגיות בוצעו לכל הדגימות בשיטת IFAT, עד לכייל סופי, ול-288 הדגימות הראשונות גם באמצעות קיט מסחרי Immunocomb ספציפי לנאוספורה.

המצאות סרולוגית של נאוספורה בקרב מבכירות

בסך הכל נאספו דגימות מ-2059 מבכירות (טבלה 1), 116-450 בכל אחת מהרפתות. ההמצאות הסרולוגית של נאוספורוזיס ברפתות השונות נעה בין 48% ל-83%, והיה בסך הכל 61% (רווח סמך 95%: 58-64%) מכלל המבכירות שנדגמו. כיילים חיוביים גבוהים מ-1:800 נמצאו ב-33% (רווח סמך 95%: 30-36%) מהמבכירות, ושיעורן נע בין 18% ל-63% ברפתות השונות (טבלה 1, איור 2). מתוך 351 הפרות עם כייל הגבוהה מ-1:800, 173 חוסנו כנגד נאוספורה (טבלה 1).

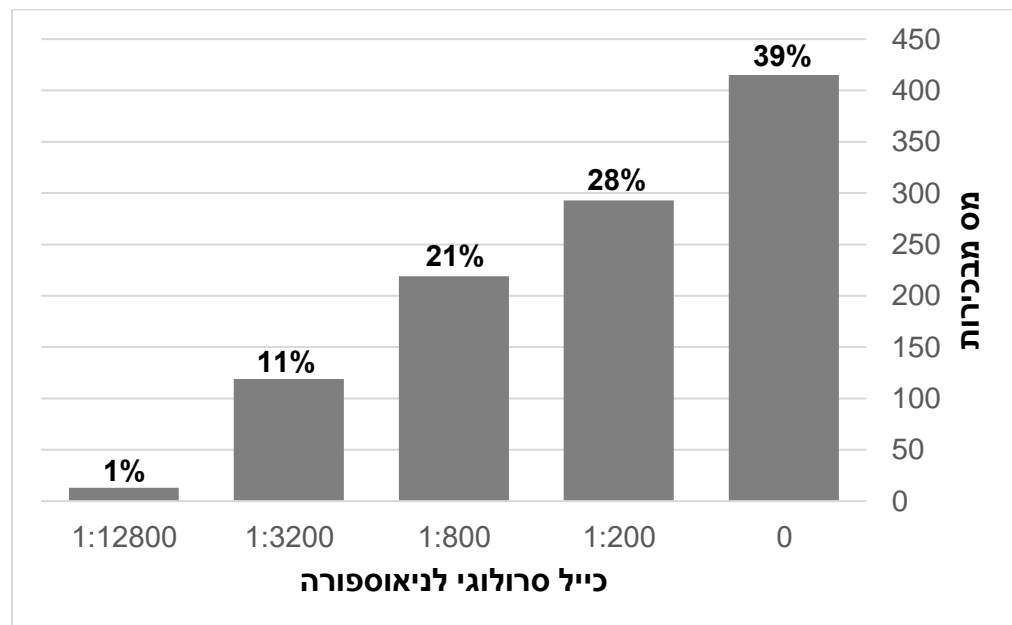
הכייל הסרולוגי במבכירות חיוביות נע בין 1:200 ו-1:12,800. הכייל החיצוני היה 1:200 והרווח הבין רבעוני היה 800.

טבלה 1. תוצאות הבדיקות הסרולוגיות של מבכירות בימים 110-120 להריון ומספר החיסונים

שניתנו בכל רפת

רפת	שליליות	חשודות (1:200)	חיוביות (1:800)	חוסנו	סה"כ
משק 1	22 (17%)	37 (29%)	70 (54%)	33	129
משק 2	70 (33%)	58 (27%)	86 (40%)	45	214
משק 3	32 (21%)	24 (16%)	94 (63%)	46	150
משק 5	231 (51%)	139 (31%)	80 (18%)	40	450
משק 6	60 (52%)	35 (30%)	21 (18%)	9	116
סה"כ	415 (39%)	293 (28%)	351 (33%)	173	1059

תרשים 2. התפלגות תוצאות הבדיקה הסרולוגית של 1059 המבכירות שנבדקו.



השוואה בין בדיקת Immunocomb לבדיקת IFAT

ל-288 מהדגימות בוצעה, בנוסף ל-IFAT, גם בדיקה בערכת Immunocomb שמתאימה לעבודה בשטח (אם כי בעבודה זו היא נעשתה בתנאי מעבדה). בבדיקה זו מתקבלות תוצאות בסולם שבין 0 ל-6, כאשר תוצאה ≤ 3 נחשבת כחיובית.

המתאם בין תוצאות שתי הבדיקות IFAT ו-Immunocomb היה גבוה ומובהק ($\rho=0.727$, $P<0.001$), אך לא מושלם (טבלה 3). כאשר מגדירים דוגמאות כחיוביות או שליליות בכייל הנמצא כקשור להפלות ($\leq 1:800$) ב-IFAT, לעומת תוצאות חיוביות או שליליות (≤ 3) ב-Immunocomb, נראה כי יש הבדלים מסויימים בין תוצאות שתי הבדיקות, אך ההסכמה ביניהן היתה גבוהה ($Kappa=0.694$, $P<0.001$).

בהסתמך על תוצאות ה-IFAT בתור ה-gold standard המייצג את ההמצאות האמיתית, הערך המנבא החיובי (PPV) של ערכת Immunocomb הינו 84.7% והערך המנבא השלילי (NPV) שלה הינו 84.7%.

טבלה 3. השוואה בין האבחון הסרולוגי של ניאוספורה בשיטת IFAT (כייל $\leq 1:800$ נחשב כחיובי) לבין Immunocomb (≤ 3 נחשב כחיובי)

סה"כ	Immunocomb		IFAT
	חיובי	שלילי	
77	6	71 (92%)	0
67	16	51 (76%)	1:200
144	122 (85%)	22	1:800=<

בדיקות חוזרות

מתוך 1059 הפרות שנדגמו, 260 נדגמו לפחות פעמיים ומתוכן 21 נדגמו שלוש פעמים. מרבית (64%) הפרות השליליות, נותרו שליליות גם בהריון הבא והשאר (36%) הפכו לחיוביות, אך רק בודדות (5%) היו עם כייל גבוה (טבלה 4). מבין הפרות שהיו עם כייל נמוך של 1:200, 59% נמצאו שליליות בבדיקה חוזרת, 26% נותרו עם כייל של 1:200 ואילו ב-15% הכייל עלה. מבין הפרות שהיו עם כייל חיובי גבוה, 71% נותרו עם כייל גבוה, 15% נמצאו עם כייל נמוך ו-14% הפכו לשליליות בבדיקה חוזרת (טבלה 4).

טבלה 4. כייל סרולוגי לניאוספורה בבדיקה חוזרת בשני הריונות עוקבים במבכירות (תחלובה 1) ובפרות (תחלובה 2).

סה"כ	תחלובה 2			תחלובה 1
	>=1:800	1:200	0	
83	4	26	53	0
61	9	16	36	1:200
116	82	18	16	>=1:800

בבחינת הכייל הסרולוגי של פרות שנדגמו שלוש פעמים, ניתן לראות כי מרבית הפרות (70%) שמרו על הסטטוס הסרולוגי שלהן (שלילי, חיובי חלש או חיובי חזק), אך היו שינויים בכייל בין הריונות, כולל מעבר בין חיוביות ושליליות לסירוגין (טבלה 5).

טבלה 5. כייל סרולוגי של פרות ספציפיות בשלושה הריונות עוקבים.

פרה	תחלובה		
	3	2	1
2730	800	800	3200
2761	800	800	3200
2777	3200	3200	3200
2781	0	0	200
2798	800	3200	200
2802	0	200	800
2804	3200	800	800
2838	3200	3200	3200
2850	800	800	800
2852	800	200	3200
2882	3200	800	3200
2900	0	0	0
7231	800	200	200
7255	3200	0	800
7270	3200	200	3200
7271	800	3200	800
7301	800	800	3200
7305	800	800	800
8507	3200	800	3200
8531	800	3200	3200
8768	3200	800	800

בהסתכלות על כלל אוכלוסיית הפרות שנגדמו, לא נמצא הבדל בשיעור הפרות החיוביות בשני הדיגומים הראשונים, אך שיעור החיוביות היה משמעותית גבוה יותר בדיגום השלישי ($P < 0.001$, טבלה 6).

טבלה 6. חיוביות סרולוגית לניאוספורה בשלושה דיגומים עוקבים

דיגום	0	1:200	1:800=<	סה"כ
1	415 (39%)	293 (28%)	351 (33%)	1059
2	107 (41%)	60 (23%)	94 (36%)	261
3	3 (14.3%)	0	18 (86%)	21

מבין הפרות שנדגמו לפחות פעמיים, 116 היו עם כייל חיובי גבוה בדיגום הראשון, ומתוך 62 חוסנו. מבין הפרות הללו, 81 נותרו עם כייל חיובי גבוה גם בדיגום השני ו-24 חוסנו בשנית. חמש עשרה מהפרות ההלו נגדמו גם פעם שלישית, אך לא חוסנו שוב.

העברה אנכית

בסך הכל נאספו דגימות דם מ-132 עגלים לפני קולוסטרומ, שנולדו לפרות שהשתתפו בניסוי (טבלה 7). שיעור ההעברה האנכית מאמהות שליליות היה 3% (רק עגל אחד חיובי מתוך 31 פרות שליליות, בכייל גבולי של 1:200). שיעור ההעברה האנכית מאמהות עם כייל נמוך של 1:200 היה 37% (16 מתוך 43 עגלים, כאשר 10 מתוכם עם כייל גבוה של 1:800 או יותר). שיעור ההעברה האנכית מאמהות עם כייל גבוה היה 90% (53 מתוך 59 עגלים, 50 מתוכם עם כייל גבוה של 1:800 או יותר).

מבין העגלים לאמהות עם כייל הגבוה מ-1:800, לא היה הבדל בשיעור ההעברה האנכית בין אמהות מחוסנות (27 מתוך 29) ולא מחוסנות (23 מתוך 27, $P=0.414$).

טבלה 7. העברה אנכית של ניאוספורה מאמהות לעגלים.

סרולוגיית אם	סרולוגיית עגל					סה"כ	%חיובי 1:200	%חיובי 1:800
	0	1:200	1:800	1:3200	1:12,800			
0	1	30				31	3.2%	0
1:200	6	27	1	5	4	43	37.2%	23.2%
1:800	2	3	4	12	10	31	90.3%	83.8%
1:3200	1	3	3	12	6	25	88%	84%
1:12,800				2	1	3	100%	100%
סה"כ	10	63	8	31	21	132	53%	45.5%

מדדי פוריות והוצאה מהעדר של פרות הניסוי

בסך הכל נאסף מידע הקשור למדדי פוריות אודות 2027 הריונות. מספר ההזרעות להריון נע בין 1 ל-11 (חציון = 2, רווח בין רבעוני = 3), אך בחלק מהמקרים עדיין לא היה אישור רשמי לתוצאת הריון חיובית. מתוך 2023 הריונות, 1161 (57%) היו עם פחות משתי הזרעות ואילו 862 (43%) היו שלוש הזרעות ומעלה. בהסתכלות על 4 מחזורי הריון עוקבים, שיעור ההזרעות המרובות נע בין 37% (בהריון הראשון) ל-50% (בהריון השני), כאשר ההבדל בין ההריון הראשון לשני היה מובהק ($P < 0.001$), בעוד שההריונות השלישי והרביעי לא נבדלו משמעותית משני ההריונות הראשונים (טבלה 8).

טבלה 8. מספר ההזרעות עד הריון, בארבעה הריונות עוקבים במהלך תקופת הניסוי.

הריון	1-2	3 <	סה"כ
1	658	380 (37%)	1038
2	419	425 (50%)	844
3	82	55 (40%)	137
4	3	2 (40%)	5

מתוך 1476 הריונות להם ידועה תוצאת ההריון, 1303 (88%) הסתיימו בהמלטה תקינה, ואילו 173 (12%) הסתיימו בהפלה. ב-53 מקרים תודעה גם הפלה בעבר, לפני לקיחת הדגימה הראשונה לניסוי. שיעור ההפלות עלה בהריונות עוקבים מ-8% בהריון הראשון ל-46% בהריון השלישי ($P < 0.001$, טבלה 9) ונמצאה קורלציה חיובית בין מספר המחזור ושיעור ההפלות ($\rho = 0.171$, $P < 0.001$).

טבלה 9. שיעור ההפלות בהריונות עוקבים במהלך תקופת הניסוי.

הריון	המלטה	הפלה	סה"כ
1	924	82 (8%)	1006
2	364	79 (18%)	443
3	14	12 (46%)	26
4	1	0	1

בסך הכל 19% מפרות הניסוי הוצאו מהעדר במהלך תקופת המעקב (204 פרות). הסיבות להוצאת הפרות היו מגוונות, אך 28% מהפרות שהוצאו, ההוצאה היתה מסיבות הקשורות בפוריות (הפלה או חוסר התעברות). מתוך הפרות שהוצאו, 49% הוצאו במהלך המחזור הראשון, 48% במהלך המחזור השני ו-3% במהלך המחזור השלישי.

נגיעות בניאוספורה והקשר למדדי פוריות

נתונים לגבי תוצאת ההריון (המלטה או הפלה) היו זמינים עבור 1239 מההריונות שבמהלכן נלקחו גם דגימות לאבחון, 193 מתוכם של פרות שחוסנו (טבלה 10).

מתוך ההריונות של פרות שלא חוסנו ($N = 1049$) 964 (92.2%) הסתיימו בהמלטה ו-82 (7.8%) הסתיימו בהפלה. שיעור ההפלות עלה בהתאם לכייל הסרולוגי ($\rho = 0.213$, $P < 0.001$). לא נמצא הבדל משמעותי בשיעור ההזרעות המרובות ($P = 0.914$) או בשיעור ההוצאה מהעדר ($P = 0.103$).

בהתאם לסטטוס הסרולוגי, אך היו יותר פרות עם כייל חיובי גבוה שהוצאו מהעדר בשל בעיות פוריות ($P=0.002$) (טבלה 10).

בבחינת השפעת החיסון על הפלות, לא נמצא הבדל מובהק בין שיעור ההפלות במחוסנות (16.5%) ללא מחוסנות (18.5%) בקרב פרות עם כייל סרולוגי הגבוה מ-1:800 ($P=0.590$). בנוסף, לא נראתה השפעה של החיסון על קשיי התעברות (הזרעות מרובות, $P=0.618$), על העברה אנכית לעגלים ($P=0.414$, טבלה 7), על שיעור היציאה מהעדר ($P=0.399$) או על יציאה מהעדר בשל בעיות פוריות ($P=0.934$).

טבלה 10. שיעור ההפלות, ההזרעות המרובות ושיעור ההוצאה מהעדר בפרות הניסוי, לפי סטטוס הנגיעות בניאוספורה וחיסון במהלך אותו ההריון.

הוצאה בגלל פוריות	הוצאו מהעדר	הזרעות מרובות	הפלה	
8/41 (19%)	43/525 (8%)	216/525 (41%)	15/484 (3%)	0
5/32 (16%)	40/353 (11%)	147/352 (42%)	25/335 (7.5%)	1:200
13/28 (46%)	34/269 (13%)	107/267 (40%)	42/227 (19%)	1:800=< לא מחוסנות
10/21 (48%)	20/196 (10%)	74/196 (38%)	32/193 (17%)	1:800=< מחוסנות
36/122 (29.5%)	137/1343 (10.2%)	544/1340 (40.5%)	114/1239 (9.2%)	סה"כ

* מספר הפרות הכולל שונה בכל קבוצה, בהתאם לנתונים שהיו זמינים לגבי כל קטגוריה

מתוך 173 הפרות שחוסנו כמבכירות, 24 חוסנו בשנית בהריון הבא. מתוך 351 הפרות שהיו חיוביות בכייל הגבוהה מ-1:800, כמבכירות, 94 נדגמו שוב, אך בחלק מהמקרים היתה ירידה בכייל ולכן לא הוגדרו כמתאימות לחיסון. בבחינת פרות שנגדמו לפחות פעמיים, ושחוסנו חיסון בודד (בהריון אחד) לעומת שני חיסונים (בשני הריונות עוקבים), לא נמצא הבדל בשיעור ההפלות בין הקבוצות השונות ($P=0.946$, טבלה 11).

טבלה 11. שיעור המפילות בקרב פרות שנדגמו לפחות פעמיים ושהיו חיוביות לניאוספורה בכייל של לפחות 1:800 כמבכירות, בהתאם למספר ההריונות במהלך חוסנו כנגד ניאוספורה.

מס פרות	מפילות
49	8 (16%)
35	7 (20%)
23	4 (17%)

הבדלים בין משקים

שיעור ההפלות במשקים השונים בקרב פרות לא מחוסנות נע בין 7.8% ל-19% במשקים השונים ($P < 0.001$), כאשר שיעור ההפלות נמצא קשור לשיעור ההמצאות של ניאוספורה במשק ($P < 0.001$). לא היה הבדל מובהק בשיעור ההזרעות המרובות בין המשקים. שיעור ההוצאה מהעדר נע בין 5% ל-12% במשקים השונים (טבלה 12).

טבלה 12. מדדי פוריות ונגיעות בניאוספורה במשקים שהשתתפו בניסוי.

מס' פרות	חיוביות לניאוספורה	הפלות	הזרעות מרובות	הוצאה מהעדר
משק 1	90 (73%)	26 (19%)	84 (51%)	14 (8%)
משק 2	123 (50%)	20 (8%)	133 (42%)	30 (9%)
משק 3	76 (69%)	28 (17%)	112 (48%)	23 (10%)
משק 5	196 (42%)	44 (8%)	344 (42%)	101 (12%)
משק 6	47 (44%)	11 (9%)	81 (42%)	10 (5%)
P	> 0.001	> 0.001	0.127	0.044

בבחינת השפעת החיסון במשקים השונים, ניתן לראות שיעור הפלות נמוך יותר בקרב המחוסנות בשניים מתוך חמשת המשקים, אך נתון זה אינו מובהק סטטיסטית (טבלה 13). בשלושת המשקים

האחרים, שיעור המפילות היה גבוה יותר בפרות מחוסנות מאשר בלא מחוסנות (אך גם כאן, ללא מובהקות).

טבלה 13. שיעור המפילות בקרב פרות מחוסנות ולא מחוסנות, החיוביות לניאוספורה בכייל הגבוה מ-1:800 במשקים השונים. המובהקות הסטטיסטית (P) ויעילות החיסון (VE) מצוינות עבור כל משק.

VE	P	מפילות	מחוסנות	מפילות	לא מחוסנות
30%	0.351	8 (20%)	40	14 (29%)	משק 1 49
54%	0.158	4 (7%)	56	10 (15%)	משק 2 65
35%-	0.446	12 (26%)	46	11 (19%)	משק 3 57
5%-	0.931	6 (14%)	42	6 (14%)	משק 5 44
167%-	0.553	2 (22%)	9	1 (8%)	משק 6 12

סיכום

במהלך הניסוי נאספו דגימות מ-2059 מבכירות מחמש רפתות, ההמצאות הסרולוגית של נאוספורה בכלל המשקים היה 61% (בכייל של 1:200 או יותר) ו-33% היו עם כייל של 1:800 או יותר. המצאות זו היתה גבוהה מההמצאות שתועדה בניסוי הקודם, שעמדה על 41% ו-15% בהתאמה (Mazuz et al., 2021), כנראה משום ששלוש מתוך חמש הרפתות היו כאלה שידוע כי סבלו מנגיעות משמעותיות בנאוספורה. התפלגות הכייל הסרולוגי באוכלוסיית הפרות היתה דומה לזו שתועדה בעבודות קודמות, כאשר במרבית המשקים כמחצית מהפרות החיוביות היו עם כייל של 1:800 או יותר.

איסוף הדוגמאות מעגלים לפני קולוסטרום היה מוצלח. שתיים מבין הרפתות התגייסו לטובת איסוף הדוגמאות וקיבלנו 132 דוגמאות מעגלים שניתן היה להשוות בין הסטטוס הסרולוגי שלהם לזה של האם בהריון. בחינת התוצאות חיזק את הידוע כי ההעברה האנכית של נאוספורה יעילה מאוד, ומהווה את המקור העיקרי להדבקה. נמצא כי שיעור ההעברה האנכית בחיוביות עם כייל סרולוגי גבוה במהלך ההריון היה 90%. לעומת זאת, באימהות עם כייל נמוך של 1:200 הייתה העברה

אנכית של 37%, מה שמורה על כך שגם פרות עם כייל נמוך עדיין מהוות מקור להדבקה של עגלות (גם אם ביעילות נמוכה יותר). עובדה זו חשובה בעיקר לאור העובדה שהקיטים המסחריים הזמינים בשוק (ELISA ו-Immunocomb) לא מזהים את כלל פרות אלה כחיוביות.

בהשוואה בין שיטות האבחון, ה-IFAT שנחשב ל-gold standard ונותן גם תוצאות כמותיות של כייל וה-Immunocomb המסחרי שזמין בשטח ולא בהכרח מחייב שליחה למעבדה, נמצא כי הקיט המסחרי מזהה 85% מהפרות החיוביות בכייל של לפחות 1:800, אך לא מזהה כחיוביות 75% מהפרות עם כייל 1:200. היות ובעבודות קודמות נמצא קשר להפלות רק בקרב פרות עם כייל גבוה, הקיט המסחרי יכול לתת מענה טוב יחסית לזיהוי פרות בסיכון אולטימטי סיבת ההפלה בפרות מפילות. עם זאת, בעבודה הנוכחית כן נמצא שיעור הפלות גבוה יותר בפרות עם כייל 1:200 מאשר בפרות שליליות (7.5% לעומת 3%, $P=0.005$), אם כי נמוך בהרבה מאשר בפרות עם כייל גבוה (19%, $P<0.001$), וכן זוהה פוטנציאל להעברה אנכית, יש לשקול את המשמעות הנ"ל בעת תכנון תכניות ביעור.

המעקב אחרי פרות בהריונות חוזרים חיזק את הידוע ממחקרים קודמים לפיו יש תנודתיות בכייל הנוגדנים לאורך זמן, עובדה המשקפת את עומס הטפילים ואת המעבר מציסטות "רדומות" ברקמות להתרבות והתפשטות, שעשויה גם לערב את העובר. בעבודה זו כל הפרות נדגמו בימים 110-120 להריון, תקופה בה יש דיכוי חיסוני תאי פיזיולוגי שעשוי לאפשר התרבות של הטפילים ולהגדיל את הסיכוי להפלה. ואכן, בדומה לעבודות קודמות, נמצא כי חיוביות סרולוגית לנאוספורה במהלך ההריון מעלה את הסיכוי להפלה, וכי הסיכוי להפלה עולה ככל שהכייל הסרולוגי גבוה יותר. זו גם הסיבה בעטיה תוכנן החיסון להנתן בתקופה זו של ההריון.

מתוך 2059 המבכירות שנבדקו, מספר המחוסנות בהריון הראשון היה על 173 פרות. בשנה השניה היה מתוכנן חיסון חוזר של כ-85 פרות, כמחצית מהמחוסנות. יעד זה לא הושג בגלל מספר סיבות: 1. אבדן מעקב על חלק מהפרות בשל הוצאה מהעדר ובשל הגשה חוזרת של הפרות

בחלק מהמשקים, 2. בשל השינויים בכייל הנוגדנים בין הריונות, כך שחלק מהפרות המחוסנות לא היו עם כייל גבוה בהריון הבא (ולכן לא ענו על קריטריון הזכאות לחיסון).

בעבודה הקודמת בה נבחנה השפעת החיסון על שיעור ההפלות, נמצא כי החיסון הוריד את שיעור ההפלות בקרב פרות עם כייל חיובי גבוה בשלוש מתוך ארבע הרפתות שנבדקו. ברפת הרביעית, לעומת זאת, שיעור ההפלות היה גבוה יותר במחוסנות ובהסתכלות על נתוני כל הרפתות יחד אפקט החיסון לא היה מובהק (Mazuz et al., 2021). בעבודה הנוכחית שיעור ההפלות היה נמוך יותר במחוסנות בשתיים מתוך חמש הרפתות ואפקט החיסון לא היה מובהק באף אחת מהרפתות. תוצאה זו מחזקת את המסקנה שעלתה גם מהניסוי הקודם, לפיו ההשפעה הקלינית של נאוספורה היא רב גורמית, וכי השפעות סביבתיות וממשקיות עשויות להיות קריטיות ליעילות החיסון במניעת הפלות. בבחינת הדיגומים החוזרים בשלושת החוות ללא השפעה, לא ניתן לראות עליה בשיעור החיוביות הסרולוגית בדיגומים חוזרים, כך שכנראה לא מדובר בהעברה אופקית או התפרצות של נאוספורה בקבוצה. לעומת זאת, ידוע כי לפחות חלק מהרפתות סבלו מהתפרצויות של מחלות אחרות (כגון קדחת שלושת הימים) במהלך תקופת הניסוי, עובדה שעשויה להשפיע בעקיפין על יעילות החיסון. מסקנה זו מחזקת על ידי העובדה כי ברפת 5, שכאשר השתתפה בניסוי הקודם יעילות החיסון בה היתה 75%, הפעם יעילות החיסון בה היתה 5%.

אחת המטרות המרכזיות של ניסוי זה היה להעריך השפעת מתן חיסונים חוזרים. לצערנו, היות והשפעת החיסון לא היתה מובהקת באף אחד מההריונות, לא ניתן להסיק על יעילות מתן חיסון חוזר.

לו"ז וביצוע משימות

3	2	1	תכנית לפי שנים:
		√	פגישת הדרכה והסברה לרפתות
	√	√	הוצאת טפילי נ. קנינום מהקפאה וגידולם בתאי Vero
	√	√	הכנת מנות תרכיב
√	√	√	בדיקות סרולוגיות
	√	√	חיסון מבכירות חיוביות לפי בדיקות סרולוגיות
√	√		חיסון פרות
√	√		בדיקות סרולוגיות של עגלות שנולדו מאימהות שבניסוי
√	√		ניתוח סטטיסטי של תוצאות

רשימת ספרות מצוטטת

1. Fish, L., Mazuz, L.M., Molad, T., Savitsky, I. and Shkap, V., 2007. Isolation of *Neospora caninum* from dairy zero grazing cattle in Israel. *Vet. Parasitol.* 149, 167-171.
2. Fish, L., Mazuz, M., Molad, T., Savitsky, I., Shkap, V., 2007. Isolation of *Neospora caninum* from dairy zero grazing cattle in Israel. *Vet. Parasitol.* 149, 167-171
3. Innes, E.A., Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D., 2001b. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31, 1523–1534.
4. Mazuz ML, Fish L., Reznikov D., Wolkomirsky R., Leibovitz B., Savitzky I., Golenser J., Shkap V. 2014. Neosporosis in naturally infected pregnant dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 205, 85-91.
5. Mazuz, M.L., Fish L, Wolkomirsky R, Leibovich B, Reznikov D, Savitsky I, Golenser J, Shkap V. 2015. The effect of a live *Neospora caninum* tachyzoite vaccine in naturally infected pregnant dairy cows. *Prev Vet Med.* Jun 15;120(2):232-5.

6. Mazuz, L. M., Fish, L., Molad, T., Savitsky, I., Wolkomirsky, R., Leibovitz, B., Shkap, V. 2011. *Neospora caninum* as causative pathogen of abortion in cattle. *Isr. J. Vet. Med.* 66 (1), 14-18.
7. Mazuz, M.L., Haynes, R., Shkap, V., Fish, L., Wollkomirsky, R., Leibovich, B., Molad, T., Savitsky, I., Golenser, J., 2012. *Neospora caninum*: in vivo and in vitro treatment with artemisone. *Vet. Parasitol.* 187, 99–104.
8. Mazuz, M.L., Leibovitz, B., Savitsky, I., Blinder, E., Yasur-Landau, D., Lavon, Y., Sharir, B. and Tirosh-Levy, S., 2021. The Effect of Vaccination with *Neospora caninum* Live-Frozen Tachyzoites on Abortion Rates of Naturally Infected Pregnant Cows. *Vaccines*, 9(4), p.401.
9. Monney T., Hemphill A., 2014. Vaccines against neosporosis: What can we learn from the past studies? *Exp. Parasitol.* 140, 52-70.
10. Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *Int J Parasitol.* 43: 133-142.
11. Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet. Parasitol.* 142, 23–34.
12. Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2009. *Neospora caninum*—how close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? *Int. J. Parasitol.* 39, 1173–1187.
13. Weber, F.H., Jackson, J.A., Sobocki, B., Choromanski, L., Olsen, M., Meinert, T., Frank, R., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2013. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of *Neospora*-associated fetal loss in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.* 20, 99–105.
14. Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Ellis, J., Bjorkman, C., Reichel, M.P., Trees, A.J., 2007. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect. Immun.* 75, 1343–1348.
15. מזוז, ל. מ., פיש, ל., רזניקוב, ד., סוויצקי, א., ליבוביץ, ב., וולקומירסקי, ר., מולד, ת., שקאפ, ו. 2011. דו"ח מסכם תכנית - 851-0336-2011 - חיסון בקר נגד נאוספורוזיס עם טפילים חיים.
16. מזוז, ל. מ., וולקומירסקי, ר., סוויצקי, א., ליבוביץ, ב., בלינדר, א., שקאפ, ו. 2014. דו"ח מסכם תכנית - 851-0338-14 - עיבוד תנאי גידול ושיטות אופטימליות לייצור המוני של טפילי נאוספורה קנינום in vitro.