

"נגיף TiLV באמנוני בריכות": פטולוגיה, אקולוגיה והקשר למחוללים אחרים

סעיף	תוכן	עמוד
1.2	שם ההצעה	
1.4	שמות השותפים, שטחי פעולה ותחומי אחריות	
1.5	תקציר מדעי	
1.6	מבוא ותיאור הבעיה	
1.7	מטרות המחקר	
1.8	חשיבותו וייחודו של המחקר	
1.9	הפעלת המחקר	
1.10	פרסומים רלוונטיים של חוקר(ים)	
1.11	איורים ושרטוטים	
1.12-1.13	תקציב המחקר,	
1.14	רשימת ספרות	

1.1. שמות השותפים האחרים למחקר, שטח הפעולה של כל משתתף, תיאור קצר של חלקו במחקר.

1. צוות המעבדה המרכזית לבריאות דגים בניר דוד, האגף לדיג – ד"ר בני רון, תמיר אופק ומרגריטה סמירנוב – מרכזת. איסוף נתונים ממשקים, ניתור בריכות במשקי מדגם, איסוף ובדיקת דגים וגורמי מחלה נוספים בהתאמה לתנאי סביבה. במעבדה יעשה הניסוי ליצירת מחלה בתנאים מבוקרים, חשיפה לנגיף (קוהביטציה או הזרקה). הנגיף יתקבל מהשו"ט. יכולות – לימנולוגיה, בקטריולוגיה, פרזיטולוגיה והיסטולוגיה.

2. ד"ר אבי אלדר – חוקר ראשי - מרכז המחקר.

3. ד"ר עזרא רוזנבלוט, מכון וטרינרי, המעבדה למחלות דגים, שירותים וטרינריים (משרד החקלאות) הינו רופא וטרינר מומחה המתמחה במחלות דגים. עזרא יהיה חוקר מוביל. מעבר לחובותיו האדמיניסטרטיביות, עבודתו תכלול את הוירולוגיה הקלאסית ואת יישום שיטת ה-FISH. כמו כן, בשיתוף עם ריטה ועם אסף, עזרא ייטול חלק בפיתוחה המחלה ניסיונית.

4. ד"ר אסף ברקוביץ, מכון וטרינרי. ד תרומתו של אסף תכלול השתתפות בפיתוח מחלה ניסיונית בקוהביטציה, ההוקעות בנגיפים בעלי אלימות שונה, בידוד התנאים ופרמטרים הסביבתיים וממשקיים הדרושים להופעת המחלה. כמו כן, הוא יהיה חלק מרכזי בניטור הפתולוגי של המחלה בשלביה השונים.

5. סטודנט. תואר שני לעיסוק בביואינפורמטיקה בעיקר.

1.2. תקציר מדעי של תוכנית המחקר - התקציר יהיה זהה לתקציר המופיע כחלק מדפי השער – התקציר יכלול את הנושאים הבאים (מתומצתים) בסדר המוצג: הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות), מהלך ושיטות עבודה, תוצאות מצופות.

הצגת הבעיה. גידול דגי אמנון הינו מהענפים המרכזיים של חקלאות המים הישראלית. בשנת 2018 עמד ייצור דגי האמנון על כ-8000 טון המהווים כ-30% מהייצור הכולל. ולכן, למרות הצורך ב"רענון" מיני הדגים המרכיבים את סל הייצור, מיקומו של דג האמנון – מרכזי.

החל משנת 2009 החלו מופעים של תחלואה חריפה וירידה דראסטית ביבול דגי האמנון. הגופים האחראיים (אגף הדיג, השו"ט), במטרה לברר את הסיבות לתופעה זו, ערכו בדיקות מקיפות ככל יכולתם. מבדיקות אלה לא נתקבלו תוצאות ברורות, אלא אוסף של ממצאים אקראיים שהניבו מספר עוד יותר גדול של השערות. התאוששות אמיתית בגידול האמנונים לא התרחש, למרות שלכאורה הייצור חזר לנתונים הקרובים לקודמים. נתונים אלה הושגו לאחר שדייגים שילשו (או אף יותר) את מספרי הדגים, והגדילו בהתאם את אמצעי היצור. וכל זאת בכדי להגיע לרמות השווק המתוכננות. הנזק בשל כך נאמד במיליוני שקלים. אמנם, מרבית הפחתים נצפו בשלבים הראשוניים (סוף תהליך "היפוך הזוויג" ותקופת האימון). אך בה בעת אנו עדים לתמותות של דגים בתקופת האימון השניוני והפיטום. תרחישים אלה של תמותות בלתי מוסברות בדגי הבריכות בכל רחבי הארץ והפחתים הכבדים מביאים את הענף לכדי קריסה. בקווי אמנון מסוימים, אדמונית למשל, הנזקים גדולים אף יותר, בהם נצפו פחתים בשיעור של 70 אחוז ויותר.

בעבודתנו הקודמת תארנו גורם נגיפי חדש ובלתי מוכר לקהילייה המדעית בשם - Tilapia Lake Virus המשתייך לקבוצת נגיפי ה-RNA ולמשפחת ה-ORTHOMYXOVIRUS. הוכח כי הנגיף גורם לתמותות רבות היקף, הן בישראל והן בחו"ל. הנגיף אכן הינו גורם זיהומי חדש. יחד עם זאת, סימני השאלה עדיין רבים מהתשובות, והתשובות למגוון סוגיות בסיסיות אינו ברור עדיין. קיימות עדיין השאלות: האם מדובר במחולל יחיד? או במחולל ראשוני? מה הם הגורמים המדרבנים? מה הם התסמינים הפתולוגיים? האם קיים מגוון מופעים קליניים? האם תיתכן הגנה חיסונית נרכשת? מה השוני בין המינים והקוים וכו'.

בעבודתנו זו נתמקד בחלק נבחר משאלות אלה וננסה לענות כמיטב יכולתנו.

ממצאים ראשוניים והנחת עבודה.

לאחר שצלחנו בבידוד נגיף שטרם אופיין לפני כן, ולאחר שיצרנו כלים אבחוניים, הנחנו כי "היעלמות הדגים בכנרת" ו"מחלת האמנונים המסתורית" נגרמות ע"י אותו מחולל נגיפי, הוכחה. עם זאת, רב הנסתר על הידוע. גם אם ברור כי מדובר במחולל אמיתי, השאלה האם הוא גורם יחיד, זיהומי – ממשקי או גנטי – טרם באה על פתרונה. גם מהלכי המחלה אינם ידועים וכל שהספרות מתארת הינם קטעי מידע המתייחסים למין מסוים ולגודל מסוים, בלי להתחשב במכלול הנסיבות האחרות הקשורות להתפרצות המחלה (סטאטוס חיסוני, ממשק, סוג, מין, גודל וכיו"ב). לעתים השאלות כה רבות עד כי ההנחה כי המחולל המרכזי הינו TILV מוטלת בספק.

במחקר שערכנו אשתקד (אגף הדיג והשו"ט), כאשר בדקנו את הימצאות הנגיף בדגים חולים לאומת דגים בריאים במהלך חודשי הקיץ, תקופה המועדת ל"פורענות". למרות שסגוליות ורגישות הבדיקה – PCR – לא מוטלות בספק, נוכחנו לדעת כי אין קשר ישיר, או לפחות כזה שאנו מבינים, בין חיובית ברמת האבחון המעבדתי לבים המחלה הקלינית. הסיבות האפשריות לממצא זה מגוונות, כשבראשן האפשרות להגנה חלקית כתוצאה מחשיפה קודמת. במקרה זה ייתכן כי הנגיף – גם אם הוא תוקף – אינו גורם לתחלואות קליניות נרחבות. לפי תיאוריה זאת, אותו חלק של הדגים שנפגע, אותו אנו רואים – נמנה על אוכלוסייה ש"טרם התחסנה". דהיינו האוכלוסייה הבוגרת שמסיבות כלשהן לא "פגשה" את הנגיף (לפחות באופן הנכון) ולכן לא פיתחה חסינות. תיאוריה זו מצטרפת למציאות שבה הדייגים מטילים כמויות כפולות ומשולשות של דגיגים בכדי להגיע לכמות הנדרשת, משיעור הישרדות נמוכים מאד, מלרות – שנדבקו ע"י הנגיף בשלבי החיים המוקדמים וממות (מוות שלא נחזה, בגלל גודלם הזעיר). תאוריה זו מחזקת את מה שמתואר בספרות המקצועית כמחלת Syncithial Heaptitis of Tilapia – SHT. פתולוגיה זאת תוארה על ידי פרגוסון ושותפיו שאפיינו תחלואה בדגיגים – בה הנגיף המחולל היה TILV, שגרם תמותות בשיעור 70-80%. כדי להמשיך ולהצביע על החוסר בידע מבוסס בכל הקשור למחלה – במקרה זה סיבת המוות נבעה מנזק בלתי הפיך ברמת המעי – protein loosing enteropathy. פתולוגיה שונה לחלוטין מזו הנצפית בישראל (דימומים, לקויות עור וכיו"ב)... בהקשר זה יש לציין את השוני, לכאורה, ברגישות היחסית של המינים והקיים השונים לגורם התמותה. בעבודתנו המקדימה נוכחנו לדעת כי ההישרדות של אמנון אפור – באימון קיץ הינה של 30-50%, בעוד זו של האדמונית הינה של 10-15%. החסינות הטבעית גם תלוית-מין: טברנון הכנרת כמעט ונכחד בעוד הפחתים באמנון הגליל (גם בבריכות) – שוליים.

הסבר אפשרי נוסף לכמויות הפחתים, ושאינו שולל את הראשון, הוא כי מעגל ה"הגורמים" גדול מזה הידוע וכי קיים מחולל נוסף אותו אנו איננו מזהים. אפשרות זו יותר מהגיונית שכן ברור כי מספר הנגיפים שאינם מוכרים רב מאלה המוכרים. הדוגמה הטובה ביותר היא נגיף ה TILV עצמו שהיה בלתי מוכר טרם אנו אפיינו אותו. גם נגיף KHV הוא דוגמא למציאות מסוג זה. השאלה היא, אם כן, מה תפקידו של אותו נגיף שאינו מוכר, והאם יש לו "זכות קיום עצמאית כמחולל".

בהקשר זה יש לזכור את הכישלונות של ניסיונות החיסון, גם הם בעלי משמעות בכך שהם מצביעים על מורכבות הסוגיה. ומחזקים את ההנחה שיש לעסוק בדגיגם כפי שנאמר לעיל.

מהלך המחקר ושיטות עבודה.

במהלך מחקר זה ייעשה שימוש במגוון שיטות, תאיות, מולקולריות, ביו-אינפורמטיביות, היסטולוגיות וביולוגיות. הידע בדבר המחלה יקודם בכדי לאפשר את הבנת התרחישים האפידמיולוגיים, ויכללו: יצירת מחלה ניסיונית, אפיון המחלה ברמה הקלינית והפתולוגית ואיתור גורמים סביבתיים המעודדים התפרצויות אלימות. בנוסף נאפיין את כלל האוכלוסייה הנגיפית – VIROME – וזאת בשיטות ביו-אינפורמטיות לשם הבנת מכלול הנגיפים הלוקחים "חלק במשחק".

צפי תוצאות: מחקר זה מכוון להשגת מספר תוצאות, כשהמרכזים הינם: (א) הבהרת המחלה ברמה הקלינית, (ב) הבנת המחלה ברמה הפתולוגית, (ג) לימוד המכלול, סביבה-מחולל-מחלה, (ד) יצירת מודל למחלה מושרה (ניסיונית) ו- (ה) בדיקת המכלול הנגיפי של דגי האמנון, כפי שתואר לעיל.

1.3.1. רקע כללי - מבוא ותיאור הבעיה - סקירת הידע הקיים בארץ ובעולם בנושא.

1.3.1.1. תחילת המחלה - הידלדלות אוכלוסיית דגי האמנון באגם כנרת- זיהוי ואפיון נגיף TILV

במהלך העשור השני של שנות האלפיים חלה ירידה עקבית בשלל הדגה של אגם כנרת. בולטת במיוחד הירידה בשלל של דגים ממשפחת האמנוניים (cichlidae) וזאת למרות שבאגם ידועים 27 מינים שונים (מתוכם 19 מינים אנדמיים). השייכים למשפחות שונות (cichlidae, cyprinidae, mugillidae, claridae). בהתייחס לאמנון (ציקליד) החשוב ביותר באגם כנרת – אמנון הגליל (אמנון המאכל היחיד בכנרת), הרי שהשלל שבשנת 2005 עמד על 316 טונות ירד לשפל של 40 טונות (שנת 2007) ו-8 טונות (שנת 2008). כאן המקום להדגיש כי הירידה בשלל, לצד פגיעה בפרנסתם של הדייגים, מהווה בעיה חמורה נוספת: דג האמנון, בהיותו אוכל אצות, תורם למארג האקולוגי של האגם בטיוב המים ושמירת איכותם כמים ראויים לשתיה.

1.3.2. תופעת "מחלת האמנונים המסתורית" בבריכות הדגים.

החל מקיץ של שנת 2009 נצפו במשקי דגי אמנון תופעות של תמותות דגים המוניות. תחילת התופעה במשקי עמק בית-שאן (כפר רופין כמשק ראשון) והמשכה לכלל משקי האמנונים בישראל. אירוע תמותות שאופיין במוקד ראשוני התפשט למוקדים שניוניים כ"כתם שמן". באמנוני המכלוא הפחת הגיע לכדי 30 אחוז, בעוד שבאדמונית התמותות משיקות את סף מאת האחוזים. מעניין לציין כי, בדומה למתואר באגם כנרת, גם בבריכות הדגים התמותות נוגעות אך ורק לדגי אמנון. דגים ממינים אחרים המגודלים באותה בריכה (קרפיון, כסיף, וקיפון) אינם נפגעים. עוד נציין כי, מרגע שמדגר מסוים "חווה את התופעה" – המופע לא חזר.

בתחילה גם לתופעת התמותות בבריכות הדגים לא נמצאו הסברים. אלא שבמקרה זה התופעה נחקרה. על ידי גוף אקדמי, לפי בקשת אגף הדיג של משרד החקלאות. בסיכומו של דבר, בדומה לאירועים בכנרת, לא בודד כל גורם מחלה .

לשאלה אם קיימים מיני דגים נוספים הרגישים למחלה, או כאלה שיכולים לשמש כנשאים של המחולל טרם נבדקה כנדרש. על סמך ממצאים מוגבלים וראשוניים, מצאנו סמירנוב ורזנבלוט) דגי בורי חיוביים ברמת PCR. דגים אלה היו חולים, אך לא ברור אם TILV היה המחולל או שמא הדג היה רק נשא.

1.3.3. חקר התופעות ע"י מעבדת ניר-דוד, אוניברסיטת ת-א, והשו"ט. ממצאים ראשוניים, הנחת עבודה וצידוקים מדעיים.

וירולוגיה ובידוד ראשוני של הנגיף: לאחר שזרענו דוגמאות על שורות תאים "סטנדרטיות" המוחזקים במעבדתנו דרך קבע (EPC, RTG-2, BB, FHM, CCO, KF-1, BF-2, CHSE) לא הניבה תוצאות, ומתוך הנחה ולפיה כל מאמצינו לבידוד נגיף נכשלו עד כה, אולי משום שהיה חסר בשורת תאים פרמיסיבית, פנינו לכיוון של יצירת שורת תאים חדשה. יצרנו שורת תאים של דג אמנון, שנקראת Til-13. משזרענו דוגמאות (שהניבו תוצאות שליליות בכל שורות האחרות) על גבי שורה זו – נתקבלה עדות לנוכחות נגיף (CPE). בשורת Til-13 נצפו, לאחר 10-12 ימי הדגרה, מוקדים תאיים דגנרטיביים הממוקמים במקביל לציר האורך (תמונה מספר 6). בהמשך התאים נעשים יותר ויותר עגולים (swollen) והתופעה מתקדמת לכיוון של התנתקות תאים נרחבת. מיקרוסקופיה אלקטרונית הדגימה נגיף (תמונה מספר 7).

בעבור זמן קצר, נגיף בעל התנהגות זהה לחלוטין בודד ממספר נרחב של בריכות דגים בהן נצפו תמותות בלתי מוסברות.

בדיקה של חומצות הגרעין מצביעה על כי מדובר בנגיף בו החומר הגנטי הינו RNA דו-גדילי המורכב מ-11 סגמנטים. הנגיף אינו דומה לכל נגיף מוכר, להוציא הומוולוגיה של כ-40% (ברמת החלבון...) לפולימרז B של משפחת ה- ORTHOMYXOVIRIDAE.

בכוונה לשחזר את המחלה, תרחיף שהופק משורת תאים מודבקת הוזרק לחלל הצפק של דגי אמנון וגרם לתמותות של 70%. הנגיף בודד מדגים חולים ומתים, בבידוד חוזר. עם זאת, אנו מבקשים לסייג אמירתנו זו ולהבהיר כי שחזור המחלה אינו קוהרנטי, לעתים מתקיים ולעתים לאו.

1.3.4. הנחת עבודה.

בהסתמך על הידע והניסיון המצויים הידינו כיום, יצירת צעדים מניעתיים בלתי אפשרית בשלב זה. כל זאת משום שהמחלה עצמה אינה מתוארת ברמה הקלינית, הפתולוגית והסביבתית. כמו כן, לא ניתן לשלול קיומו של מחולל נוסף. הנחה זו מבוססת על מסד נתונים אותו יצרנו במהלך הקיץ הקודם, כשעקבנו לאורך החודשים יוני-ספטמבר אחר הקשר בין תמותו בלתי מוסברות והמצאות נגיף TILV ברקמות הדג. נמצאו מצבים בו הודגמה חיוביות אך לא נצפתה מחלה, בדיוק כשם שהודגמה מחלה ללא חיוביות. כמו כן הודגמו מצבי ביניים נרחבים. לסיכום, ובתמציתיות: לא נמצא קשר בינארי מובהק בין חיוביות מעבדתית ובין קיום מחלה פעילה.

1. הימצאות RNA נגיפי בדגים בריאים. הימצאות RNA נגיפי (שיטת PCR) הינה עדות להמצאות המחולל. גם אם המחולל כבר לא ניתן לבידוד, הרי שהימצאות חומצות הגרעין הייחודיות מהווה עדות לנוכחותו בדג בפרק זמן של עד שבועיים מיום החדירה לדג (סמירנוב אלדר ורוזנבלוט, ממצאים שטרם פורסמו).

2. אי הימצאות RNA נגיפי בדגים חולים. באופן דומה, אך הפוך מזה המצויים בפסקה מעלה, דגים חולים אותם בדקנו במהלך הקיץ האחרון, נמצאו שליליים לנגיף TILV. כמו כן, בדגים אלה לא אותר גורם מחלה ידוע או אפשרי.

3. מחלה ניסיונית. עד כה אין בנמצא הליך (פרוטוקול) להשריית המחלה. לצורך הבנת האפידמיולוגיה ולשם מתן תשובה מעשית לדייג – האם הדג אמיד או שאינו כזה – קיים צורך בלתי מתפשר בפיתוח מודל להשריית המחלה.

4. פתולוגיה כרונית והשוואתית (בין מינים ובין קווים): לשם הבנת המחלה אנו נדרשים ליצור מדדים שיבהירו את ההיבטים השונים של המחלה, הן ברמה הפתולוגית והן מבחינת האפידמיולוגיה ההשוואתית (גיל וסוג הדג). מידע זה יסייע מעשית בפיתוח צעדים משקיים-מניעתיים. דוגמא היא יצירת היברידיים בין מינים רגישים לכאלה הרגישים פחות.

5. כלל הנגיפים בדג האמנון הישראלי - VIROME עד כה התמקדנו בנגיף TILV ובמחלה אותה הוא משרה. כאמור, סביר להניח כי קיימים נגיפים נוספים, ייתכן אף פתוגניים. לאור זאת, אנו מציעים כחלק מתוכנית זו עריכת סקר ראשוני, ביו-אינפורמטי בשלב זה. בסקר ננתח ברמת RMA SEQ טרנסקריפטים שיידגמו מדגם חולים ושלסיבת המחלה אין הסבר סביר.

1.4. מטרות ויעדים. צידוקים מקצועיים. חשיבות וחדשנות. מסגרת זמנים. שיטות וחומרים.

1.4.1. בניית מחלה ניסיונית - הוכחת הקשר נגיף-מחולל – המופעים הקליניים השונים. חוקרים:

למרות הקשר ההגיוני בין המצאות נגיף ותמותות דגים, ההוכחה כי אין מדובר בממצאים אקראיים דורשת שיחזור של המחלה (מיצוי שלוש ההנחות של Koch-Henle ממחציתה השנייה של המאה ה-19). אין מדובר באקט טכני בלבד, שכן, על פי רוב, בשחזור מחלת דגים נדרש לאתר את הפקטור "המלבה" (טמפרטורה, גודל וכיו"ב). שיחזור המחלה (1) מאפשר את חקר המופע ושולל תמותה מהדבקה שניונית, ו-(2) מהווה בסיס להבנת הפתופיזיולוגיה של המחלה, על שלל מופעי השונים. כך, לדוגמא, במחלות הדגים בעלות החשיבות הכלכלית הגבוהה ביותר – אלה הנגרמות ע"י רבדו-וירוסים Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV) and Infectious Hematopoietic Necrosis (IHNV) הוכח כי הגורם המלבה הינם התנאים הסביבתיים, וכי דגים ששרדו הדבקה ראשונית מחוסנים. במחלות אלו ייתכן מגוון של מופעים קליניים הכוללים מחלה חריפה קלאסית המלווה באלח דם, לצד מחלות תת-חריפיות, כרוניות או מופעים עצביים. יתר על כן – באגמים פתוחים לעתים המחלה אינה

מלווה בסממנים המאפשרים את זיהויה (כגון תמותות הנראות בעין). הדגים השורדים של המחלות הרבדו-נגיפיות מפתחים עמידות חיסונית ספציפית, בדומה לתופעה שנצפתה בדגי האמנון בבריכות הדגים. VHSV Expert Panel and Working Group. 2010; LaPatra et. al., 1995, Ghittino, 1965; Wolf, 1998; Vestergård Jørgensen, 1982; St-Hilaire et. al., 2001; Neukirch, 1986; Hersberger, et. al., 2010; Amend, 1975; Mohamed et. al., 2012; Lorenzen et. al., 1999; (Engelking et. al., 1991; Eloi et. al., 2012).

שיטות וחומרים:

בכדי לשמר את אלימות הנגיף, ההדבקות תעשינה אגב שימוש בגזע בר שגודל במעבדה על גבי תרבית תאים פרמיסיבית (Til-13), בהעברה בודדת. כמות הנגיפים תכומת באמצעות Real-Time PCR ומינונים שונים (מהולים עשרוניים) של התרחיף הראשוני יוזרקו לתוך חלל הצפק של דגי אמנון נאיביים ברמת SPF שיגודלו במתקן סגור במעבדת ניר-דוד. כל קבוצת דגים תכלול 30 פריטים ותמוקם בשליש מיכל אקווריום בן 200 ליטר. באופן זה יעשה שימוש מקביל בשלוש קבוצות דגים זהות. איכות המים תעמוד על 5 חלקיקים למיליון של חמצן (לפחות) ורמת אמוניה הנמוכה מ-1 מ"ג/ל. דגי האמנון ברמת ה-SPF כבר נמצאים בידנו. דגים אלה, הינם אמנון היאור מטופח – ציטרלדה (*Oreochromis niloticus*, strain Chitrellada) שיתקבלו מגידול במתקן סגור בטמפרטורה קבועה של 28 מ"צ.

סוגיות אתיות: כל ניסוי יעשה בהיתר (1) של ועדת צער בע"ח (תקנות צער בע"ח) ושל (2) מנהל השו"ט – בכל האמור לחוק המיקרואורגניזמים ותרכיבים (1963) ופקודת מחלות בע"ח (נוסח משולב, תשל"ד).

ההדבקות תעשנה בשני אופנים:

1. בשיטה הראשונה, הדבקה בהזרקה, תוזרק כמות קבועה (0,2 מ"ל) של תרחיף המכיל מספרים שונים של חלקיקים נגיפיים (מהולים עשרוניים) לדגים. 30-35 גרם כ"א. כל ניסוי יעשה בשלוש חזרות (ראה מבנה אקווריומים, סעיף קודם).

שיטה זו לא מצביעה על "הגורם המלבה", אלא מאפשרת הדבקה ראשונית הנחוצה להדבקות "טבעיות".

2. הדבקה בקוהביטציה - COHABITATION – על דגים, תבוצע בתנאים דומים אלא שארגון קבוצות הדגים יהיה שונה. כך, היות וכ"א מהאקווריומים מחולק לשלושה חלקים המופרדים ביניהם ברשת מחוררת המונעת מעבר דגים אך מאפשרת מעבר חופשי של מים (משאבה השואבת מקצה רחוק ומחזירה את המים לפילטר פנימי הממוקם בקצה הנגדי), הדגים המוזרקים בנגיף (דגים מדביקים) יאוכלסו בשליש האקווריום הקיצוני וקבוצות דגים בריאות תצורפנה לשני החלקים האחרים לאחר הופעת סימנים קליניים בדגים המוזרקים (המדביקים).

בניסויים יושם דגש מיוחד על התנאים המאפשרים התפרצות המחלה. לצור כך נערך שינויים בעומסים ביולוגיים, באיכות מים (חמצן, אמוניה, רמת המליחות), ובטמפרטורות. בכל הניסויים תבוצע תצפית של 21 יום (לפחות) וימולא רישום קפדני של מהלך המחלה, תחלואה-סממנים-תמותות. בחזרה השלישית, דגים חולים יוקרבו לשם (1) בדיקה היסטולוגית ו-(2) בידוד חוזר של נגיף וכימותו ב-PCR--RT. האנליזה סטטיסטית התמותות (משלוש חזרות בלתי תלויות) תוצגנה במונחים של תמותה ממוצעת. השוני בין החזרות ינותח באמצעות chi-square שבו $P < 0.05$ ייחשב כמשמעותי.

1.4.2. יצירת כלי אבחון אימונולוגיים (FISH). חוקר: עזרא רוזנבלוט.

מיקום וזיהוי של מחוללים ברמת הרקמה ברמת התא, ואף ברמת האבחון, הינו חלק חיוני לשם הבנת היחסין מחולל-מאחסן. שיטת FISH מבוססת על היברידיזציה בין מקטעי דנ"א סינטטיים המסומנים

בלואורופור לבין חלקם הקומפלמנטרי, דנ"א או רנ"א. שימוש בשיטה זו מאפשר אבחון המחולל ומיקומו, וכל זאת בהליך קצר, יעיל ואמין.

שיטת FISH מהווה גשרננקודת מפגש בין אבחון מיקרוסקופי קלאסי, לאבחון מולקולארי ופתולוגיה. יתרון בולט של שיטה זו הינו היישום, שנעשה על משטח היסטולוגי. המשטח בו נעשה שימוש הינו אחד מיני רבים זהים (חיתוך של בלוק פרפין רגיל) ובכך מתאפשר ביצוע של מגוון דגימות, שסך כל מרכיביהן יאפשרו תמונה נרחבת של ההליך הזיהומי.

1.4.3 המחלה והסביבה – ריטה, תמיר.

בחנית קשר אפשרי בין גורמי סביבה, טמפרטורה ואיכות מים, תוך כדי בדיקת דגים חולים, תיבחן האפשרות של מעורבות גורמי מחלה משניים (ברמת תצפית בלבד).

1.4.4 המחלה ומחוללים נוספים – ביואינפורמטיקה.

כלים ביואינפורמטיים ומסדי נתונים המספקים מידעים בדבר המבנים הגנטיים והפנוטיפיים של נגיפים ידועים מהווים חלק חיוני בבילוגיה מודרנית. שימוש בכלים אלה תומך ומיעל הליכים בכך שמהווה תמיכה להשערות בדבר הצורך למחקרי עומק.

שיטות ריצוף עדכניות, NGS, מספקות במהירות נתונים נרחבים בהרצה בודדה ובמחיר סביר. למטרתנו אנו, גישה זו מסוגלת לנתח רצפים גנטיים ממקטע בודד בספריה, ובכך להימנע מהצורך לשיבוט והליכים מורכבים. אמת זו נכונה במיוחד לוורולוגיה קלינית, מחלות מתהוות, אפידמיולוגיה מולקולרית וכן במחקר בסיסי. למרות היתרונות הברורים, לשיטת NGS מספר חולשות אותן אנו ניקח בחשבון. הרגישות הנמוכה של השיטה נובעת בראש וראשונה מגודלו הקטן של הגנום הנגיפי ביחס לגנום המארח. אמנם החומרה רבה יותר כשמדובר עח אנליזה של רקמה נגועה, אך גם כשמדובר בנגיף מתורבת - עדיין הדנ"א התאי גדול מזה הנגיפי. על מכשלה זו ניתן להתגבר ע"י סילוק הרנ"א הריבוזומלי וע"י העלאת מספר הקריאות, מה שמאפשר פתרון חלקי. שיטות אלה ניתן ליישם גם לתרבית נגיפית, ובמידה ונדרשת העשרה נוספת – ניתן לרכז ולנקות את הנגיף ע"י סרוז בגרדיינט סוכרוז. ניתן להשתמש גם בשיטות פיזיקליות וכימיות (סינון והשקעה) או ב-PCR לשם הגברת מקטעים שמורים.

1.5 חשיבותו וייחודו של המחקר

בהכללה, מטרת המחקר הינן (א) ליצור ידע בסיסי בכל האמור לפיסיולוגיה של המחלה, (ב) לשפר את כלי האבחון ו-(ג) ליצור כלי הכלה ראשוניים בדמות הבנת התנאים הסביבתיים התורמים להתפרצות אלימה של הנגיף.

1. השריית מחלה ניסיונית/הקשר נגיף-מחולל. מעבר לצורך ביצירת מחלה ניסיונית לשם אישוש הנחת היסוד (הנגיף גורם למחלה הן בכנרת והן בבריכות הדגים), לחלק זה חשיבות מרכזית בשני היבטים. הראשון מתייחס להבנת מגוון המופעים שקשורים למחלה. כל אילה אינם ברורים ובפרט כשמדובר בקבוצות דגים בעלות היסטוריה שונה ותנאי גידול מגוונים ולכן סביר כי ייתכנו מופעים שונים. לא היכרותם לא ניתן לכמת את חשיבותם ולבטח לא ניתן ליצור ולהפעיל כלים מניעתיים.

ההיבט השני בחשיבות חלק זה הינו באפשרות לבצע ניסויים ביצירת כלי הכלה, בין אם ע"י מניפולציות ממשקיות, בין אם ע"י פיתוח תרכיב ובין אם בשילוב שני הגורמים.

כיוונתנו לסיים פרק זה בתום שנת המחקר הראשונה.

2. אפיון המחלה ברמה הכרונולוגיה והפתולוגיה. כבכול מחלה זיהומית שהינה מחלת עדר נדרשים הן הכלים לאבחון המוני (עיבוד של מספר רב של דגימות הנשלחות בעת אחת) והן כלים להערכת מידת הסכנה הנשקפת למדגר נתון. בעבודתנו זו אנו מבקשים ליצור מערכת מידע המתארת את השלבים השונים של המחלה, בהתאם למיני האמנונים השונים וגילם. בפעולה זו ניצור הן מידע בסיסי – שיתמוך בהבדלה בין המחלות השונות (ובכך יתרום לשיפור יכולת האבחון ולהעלאת ההשרדות) והן מידע מעשי (כלי אבחוני המשלים כלים קיימים שלעיתים אינם מספקים ראייה כוללת) PCR ומערכת (ELISA).

- כוונתנו לסיים פרק זה בתום שנת המחקר השנייה.

3. לימוד והכרת מכלול הגורמים הנגיפיים של דגי אמנון בישראל. מחלות זיהומיות, ככלל, הינן מחלות דינאמיות. מחלות חדשות (emerging) מושרשות (established), ומחלות שנדמה היה כי נעלמו – מגיחות שוב (re-emerging). אמת זו נכונה שבעתיים כשמדובר במדגה הישראלי החשוף לכמויות גבוהות של יבוא דגים חיים היכולים לשאת מחוללים, ואשר השירותים הווטרינריים לעתים תכופות כלל אינם מודעים לקיומם... הוסף לכך הברחות, יבוא דרך צנרת של דגי נוי וציפורים נודדות – והרי לפנינו מגוון נרחב. כך, כדוגמא, פרצה מחלת TILV וכך פרצה מחלת KHV. כך הופיעו חיידקי הסטרפטוקוקוס והאירומונס למיניהם.

- כוונתנו לסיים פרק זה בתום שנת המחקר השלישית.

1.9. שיטות המחקר: מטרות החקר, הניסויים והמבנה שלהם וצפי הישגים.

שנה ראשונה

מטרות: בשנה זו נתמקד בשני נושאים. הראשון – שימוצה בתום השנה – שיימשך לאורך כלל תוכנית המחקר (ובהתאם לצרכים) - פיתוח מודל למחלה ניסיונית ושיפור הידע בנושא הקשר נגיף-מחולל. נושא שני הינו פרוט חקר הגורמים ה"מלבים" את התפרצות המחלה – גורמים סביבתיים, גנטיים וממשקיים..

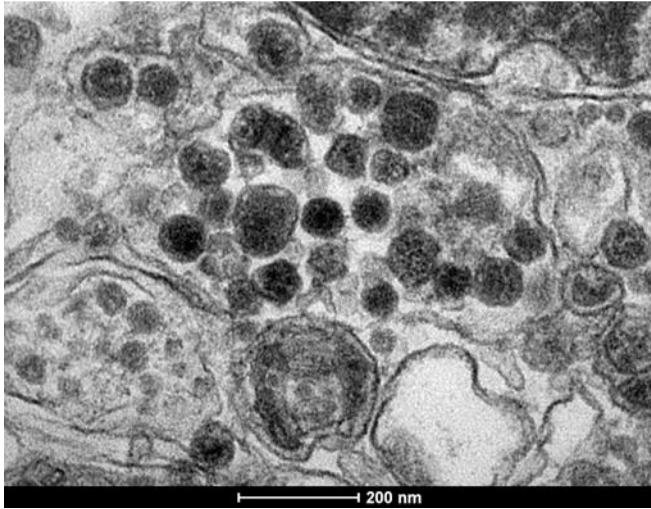
אופי ומבנה הניסויים: לצורך העבודה ייעשה שימוש בשיטות ביולוגיות הכוללות (א) עבודה עם שורות תאים (לשם גידול הנגיף) ו-(ב) עבודה עם דגים חיים (יצירת מודל למחלה ניסיונית). כמו כן, (ג) יעשה שימוש בשיטות היסטולוגיות, וזאת בכל האמור לתיאור המחלה ברמה ההיסטופתולוגית.

לצורך המחלה הניסיונית נגדל TILV – העברה 3 של זן בר בתאי TMB - ואלה יכומתו בשיטת endpoint. מהולים עשורניים יוזרקו לקבוצות שונות של מינים שונים, וזאת במקביל לטבילתם במינונים שונים למשך 30 דקות.

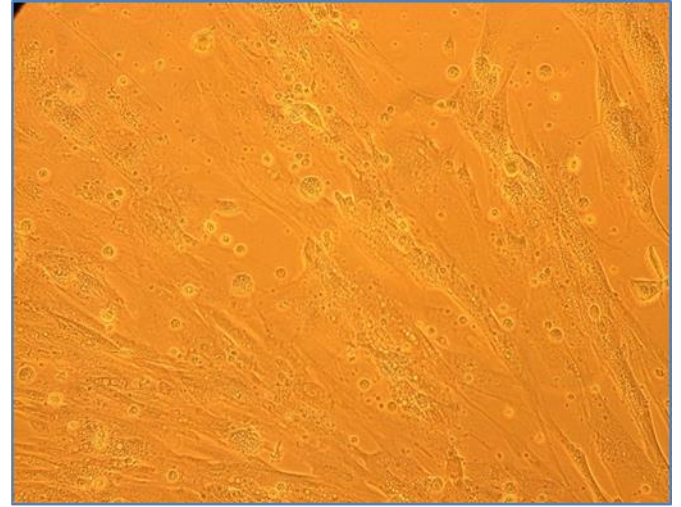
כל הדגים בהם נשתמש במהלך המחקר יהיו כאלה שלא פגשו את המחולל - דגי SPF, וזאת במטרה להימנע מדגים העמידים למחלה, ולו חלקית. הדגים יבדקו בשיטת PCR טרם הבאתם, ופעמיים בשבוע במהלך העבודה. ייעשה שימוש בדגים לאחר היפוך מין (אימון ראשוני), ובכך נוכל לצמצם את שטחי הגידול ולעבוד על מספר פרטים מספק. המחלה הניסיונית תשווה, ברמה הפתולוגית,.

הנושא השני שמתוכנן לשנה זו הינו מעקב אחר כלל הנגיפים באמנונים – VIROME. לצורך כך נאסוף דגימות שטח מדגים חולים. הדוגמאות תחולקנה לשלוש: חלק ראשון ישמש לאבחון מחלות ידועות (חיידקיות טפיליות ונגיפיות). במידה וחלק זה לא יניב תוצאה – החלק השני ייכתש ותמצית ממנו תשמש לזריעה על שורות תאים היכולות להיות פרמיסיביות לנגיפי אמנון – TO TMB2 וכיו"ב. דגימות חיוביות תנוקה ונגיפים מועשרים ירוצפו. דגימות שליליות תשלחנה לריצוף גנומי RNA SEQ וינתחו ברמה ביואינפורמטית.

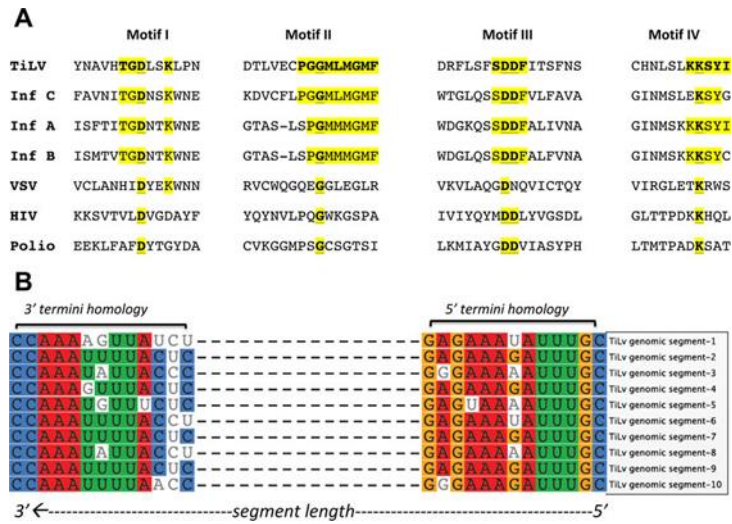
לאנליזה הביואינפורמטית, שכאמור מטרתה הראשונית הרכבתם של קונטיגים מגנום נגיפי היפוטטי, נוסף גם חיפוש וכימות של סמני דלקת (ציטוקינים למיניהם), וזאת בכדי לקבל הערכה על חומרת המחלה בשלביה השונים.



שורת תאי TIL-13, מיקרוסקופ אלקטרוני.



שורת תאי TIL-10 מודבקת.



תקציב

שנה ג	שנה ב	שנה א	
			סטודנט
			החזקת דגים- מים וחשמל
			חומרים מתכלים למעבדה
			דגים ומזון
			נסיעות

1.6 רשימת פרסומים של החוקר(ים) הרלוונטיים לנושא הנחקר.

Eldar, A., Y. Bejerano and, H. Bercovier. 1994. Streptococcus shiloi and Streptococcus difficile: Two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in the Israeli fish. Curr. Microbiol. 29: 139-143

Ghittino, C., Prearo, M., Bozzetta, E. and, A. Eldar. 1994. Phatological Characterization of the

Eldar, A., P. F. Frelier, L. Asanta, P. W. Varner, S. Lawhon and, H. Bercovier. 1995. Streptococcus shiloi, the name for an agent causing septicemic infection in fish, is a junior synonym of Streptococcus iniae. Int. J. Syst. Bacteriol. 45:840-842

- Eldar, A., Bejerano, H., Horovitz, A. and, H. Bercovier. 1995. Characterization and prevention of fish meningoencephalitis in Israeli cultured pondfish. *Eur. Aquaculture Society* .25:189-200
- Eldar, A., Y. Bejerano and, H. Bercovier. 1995. Experimental Streptococcal meningitis in .Tilapines. *Vet. Microbiol.* 43:33-40
- Eldar, A., O. Shapiro, Y. Bejerano and, H. Bercovier. 1995. Vaccination with whole cell vaccine and bacterial protein extract protects tilapia against *Streptococcus difficile* .meningoencephalitis. *Vaccine* 13:867-870
- Eldar, A., C. Ghittino A., L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, M. Prearo and, H. Bercovier. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a junior synonym of *Lactococcus garvieae*, a causative agent of .septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.* 32: 85-88
- Eldar, A., S. Lawhon, P. F. Frelief, L. Asanta, B. R. Simpson, P. W. Varner and, H. Bercovier. 1997. DNA restriction length polymorphisms of 16S rRNA and of whole rRNA genes (ribotyping) of *S. iniae* isolates from the United States and Israel. *FEMS Microbiol. Lett.* .151:155-162
- Eldar, A., A. Hurwitz and, H. Bercovier. 1997. Development and efficacy of a streptococcal .vaccine for the Israeli trout farming. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56:175-183
- Zlotkin, A., H. Hershko and, A. Eldar. 1998. Possible transmission of *Streptococcus iniae* to .cultured fish. *Appl. Env. Microbiol.* 64:4065-4067
- Eldar, A. and C. Ghittino. 1999. *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus iniae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: similar, but different diseases. *Dis. Aq. Org.* 36:227-.231
- Eldar, A., S. Perl, P. F. Frelief and, H. Bercovier. 1999. Red drum (*Sciaenops ocellatus*) mortalities associated with *Streptococcus iniae* infection. *Dis. Aq. Org.* 36:121-127
- Eldar, A., L. Asanta, E. Bozzetta, M. Gorla, H. Bercovier and, C. Ghittino. 1999. Biochemical and ribotypes heterogeneity of *Lactococcus garvieae* strains isolated from fish in different .countries. *Appl. Env. Microbiol.* 65:5216-5219
- Hedrick, R .P., G. D. Marty, R. W. Nordhausen, M. Kebus, H. Bercovier, and A. Eldar. 1999. An herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi carp *Cyprinus carpio*. *Fish Health Newsl. Am. Fish. Soc./Fish Health Sect.* 27 (3):7
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Martin, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and, A. Eldar. 2000. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of .Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J. Aquatic Animal Health* 12:44-57
- Bachrach, G., A. Zlotkin, A. Hurvitz, D. L. Evans and, A. Eldar. 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from Diseased Fish Previously Vaccinated with a *Streptococcus* Vaccine. *Appl. Env. Microbiol.* 67:3756-3758
- Gilad, O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkinson, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar and, R. P. Hedrick. 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* in koi. *Dis. Aq. Org.* 48:101-.108

Zlotkin, A., S. Chilmonczyk, M. Ingor, A. Hurvitz, C. Ghittino and, A. Eldar. 2003. Trojan Horse Effect: Phagocyte-Mediated *Streptococcus iniae* Infection of Fish. *Infect. Immun.* 71:2318-25

Eyngor, M., A. Zlotkin, C. Ghittino, M. Prearo, D. G. Douet, S. Chilmonczyk and, A. Eldar. 2004. Clonality and Diversity of the Fish Pathogen *Lactococcus garvieae* in Mediterranean Countries. *Appl. Env. Microbiol.* 70:5132–5137

Bercovier, H., Y. Fishman, R. Nahary, S. Sinai, A. Zlotkin, M. Eyngor, O. Gilad, A. Eldar and, R. P. Hedrick. 2005. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiology* 5:13

Aoki, T., J. Hirono, K. Kurokawa, H. Fukuda, R. Nahary, A. Eldar, A. J., Davison, T. B. Waltzek, H. Bercovier and, R. P. Hedrick. 2007. Genome sequences of three koi herpesvirus isolates representing the expanding distribution of an emerging disease threatening koi and common carp worldwide. *J. Virol.* 81:5058-65

Eyngor, M., Y. Tekoah, R. Shapira, A. Hurvitz, A. Zlotkin, A. Lublin and, A. Eldar. 2008. Emergence of novel *Streptococcus iniae* Exopolysaccharide-producing strains following vaccination with non-producing strains. *Appl. Env. Microbiol.* 74:6892-6897

Eyngor, M., A. Lublin, R. Shapira, A. Hurvitz, A. Zlotkin Y. Tekoah and, A. Eldar. 2010. A pivotal role for the *Streptococcus iniae* extracellular polysaccharide in triggering proinflammatory cytokines transcription and inducing death in rainbow trout. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:109-120

E. Bacharach, A. Itin, E Keshet. In Vivo Patterns Of Expression Of Urokinase And Its Inhibitor PAI-1 Suggest A Concerted Role In Regulating Physiological Angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, pp. 1068-10690, 1992

E. Bacharach, A. Itin, E Keshet. Apposition-Dependent Induction Of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 Expression: A Mechanism For Balancing Pericellular Proteolysis During Angiogenesis. *Blood* 92, pp. 939-945, 1998

E. Bacharach, S.P. Goff. Binding Of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein To The Viral RNA Encapsidation Signal In The Yeast Three-Hybrid System. *Journal of Virology* 72, pp. 6944-6949, 1998

E. Bacharach, J. Gonsky, D. Lim, S.P. Goff. Deletion Of A Short, Untranslated Region Adjacent To The Polypurine Tract In Moloney Murine Leukemia Virus Leads To Formation Of Aberrant 5' Plus-Strand DNA Ends In Vivo. *Journal of Virology* 74, pp. 4755-4764, 2000

B. Yuan, S. Campbell, E. Bacharach, A. Rein, S.P. Goff. Infectivity Of Moloney Murine Leukemia Virus Defective In Late Assembly Events Can Be Restored By Late Assembly Domains Of Other Retroviruses. *Journal of Virology* 74, pp. 7250-7260, 2000

E. Bacharach, J. Gonsky, K. Alin, M. Orlova, S.P. Goff. The Carboxyterminus Of Nucleolin Interacts With The Nucleocapsid Domain Of Retroviral Gag Proteins And Inhibits Virion Assembly. *Journal of Virology* 74, pp. 11027-11039, 2000

J. Gonsky, E. Bacharach, S.P. Goff. Identification Of Residues Of The Moloney Murine Leukemia Virus Nucleocapsid Critical For Viral DNA Synthesis In Vivo. *Journal of Virology* 75, pp. 2616–2626, 2001

- M. J. Evans, E. Bacharach, S.P. Goff. RNA Sequences In The Moloney Murine Leukemia Virus Genome Bound By The Gag Precursor Protein In The Yeast Three-Hybrid System. *Journal of Virology* 78, pp. 7677-7684, 2004
- I. Amit, L. Yakir, M. Katz, Y. Zwang, M.D. Marmor, A. Citri, K. Shtiegman, I. Alroy, S. Tuvia, Y. Reiss, E. Roubini, M. Cohen, R. Wides, E. Bacharach, U. Schubert, Y. Yarden. Tal, A Tsg101-Specific E3 Ubiquitin Ligase, Regulates Receptor Endocytosis And Retrovirus Budding. *Genes* .pp.1737-1752, 2004 ,18 & Development
- D. Melamed, M. Mark-Danieli, M. Kenan-Eichler, O. Kraus, A. Castiel, N. Laham, T. Pupko, F. Glaser, N. Ben-Tal, E. Bacharach. The Conserved Carboxy-Terminus Of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Domain Of The Gag Protein Is Important For Virion Assembly And Release. *Journal of Virology* 78, pp.9675-9688, 2004
- A. Zipin, M. Israeli-Amit, T. Meshel, O. Sagi-Assif, I. Yron, V. Lifshitz, E. Bacharach, N.I. Smorodinsky, A. Many, P.A. Czernilofsky, D.L. Morton, I.P. Witz. Tumor-Microenvironment Interactions: The Fucose-Generating FX Enzyme Controls Adhesive Properties Of Colorectal .pp. 6571-6578, 2004 ,64 *Cancer Cells. Cancer Research*
- A. Doron-Faigenboim, A. Stern, I. Mayrose, E. Bacharach, Tal Pupko. Selecton: A Server For Detecting Evolutionary Forces At A Single Amino-Acid Site. *Bioinformatics* 21, pp. 2101 – .2103, 2005
- M. Mark-Danieli, N. Laham, M. Kenan-Eichler, A. Castiel, D. Melamed, M. Landau, N. M. Bouvier, M. J. Evans, E. Bacharach. Single Point Mutations In The Zinc-Finger Motifs Of HIV-1 Nucleocapsid Alter RNA-Binding Specificities Of The Gag Protein And Enhance Packaging And .Infectivity. *Journal of Virology* 79, pp.7756-7767, 2005
- Y. Gruper, J. Bar, E. Bacharach, R. Ehrlich. The Transferrin Receptor Interacts With The Hemochromatosis Factor (HFE) And The Divalent Metal Transporter - 1 (DMT1) In .Trophoblast. *Journal of Cellular Physiology* 204, pp.901-912, 2005
- Z. Cohen, E. Bacharach, S. Lavi. Mouse Major Satellite DNA Is Prone To Eccdna Formation Via .DNA Ligase IV-Dependent Pathway. *Oncogene* 25, pp.4515-4524, 2006
- R. Efrony, Y. Loya, E. Bacharach, E. Rosenberg. Phage Therapy Of Coral Disease. *Coral Reefs* .26, pp. 7-13, 2007
- A. Stern, A. Doron-Faigenboim, E. Erez, E. Martz, E. Bacharach, T. Pupko. Selecton 2007: Advanced Models For Detecting Positive And Purifying Selection Using A Bayesian Inference .Approach. *Nucleic Acids Research* 35, pp. W506-511, 2007
- I. Mayrose, A. Doron-Faigenboim, E. Bacharach, T. Pupko. Towards Realistic Codon Models: Among Site Variability And Dependency Of Synonymous And Nonsynonymous Rates. *Bioinformatics* 23, pp. i319-27, 2007
- N. Laham, E. Bacharach. Transduction Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vectors Lacking The Encapsidation And Dimerization Signals. *Journal of Virology* 81, pp. .10687-10698, 2007
- M. Levy, Y. Porat, E. Bacharach, D.E. Shalev, E. Gazit. Phenolsulfonphthalein, But Not Phenolphthalein, Inhibits Amyloid Fibril Formation: Implications For The Modulation Of .Amyloid Self-Assembly. *Biochemistry* 47, pp. 5896-5904, 2008

- Y. Sabo, N. Laham-Karam, E. Bacharach. Basal Budding And Replication Of The Murine Leukemia Virus Are Independent Of The Gag L-Domains. *Journal of Virology* 82, pp. 9770-9775, 2008
- O. Penn, A. Stern, ND. Rubinstein, J. Dutheil, E. Bacharach, N. Galtier, T. Pupko. Evolutionary Modeling Of Rate Shifts Reveals Specificity Determinants In HIV-1 Subtypes. *PLoS Computational Biology* 4, e1000214, pp. 1-10, 2008
- C. Banet-Noach, L. Simanov, N. Laham-Karam, S. Perk, E. Bacharach. Longitudinal Survey Of Avian Metapneumoviruses In Poultry In Israel: Infiltration Of Field Strains Into Vaccinated Flocks. *Avian Diseases* 53, pp. 184–189, 2009
- A. Prizan-Ravid , E. Elis , N. Laham-Karam , S. Selig , M. Ehrlich, E. Bacharach. The Gag Cleavage Product, P12, Is A Functional Constituent Of The Murine Leukemia Virus Pre-Integration Complex. *PLoS Pathogens* 6, e1001183, pp. 1-19, 2010
- Y. Sabo, M. Ehrlich, E. Bacharach. The Conserved YAGL Motif In The Human Metapneumovirus Is Required For Higher Ordered Cellular Assemblies Of The Matrix Protein And For Virion Production. *Journal of Virology*. 85, pp. 6594–6609. 2011
- D. Nachmias, E.H. Sklan, M. Ehrlich, and E. Bacharach. Human immunodeficiency virus type 1 envelope proteins traffic toward virion assembly sites via a TBC1D20/Rab1-regulated pathway. *Retrovirology* 19; 9(1):7,2012

3

1.7 איורים ושרטוטים הנכללים בתיאור המחקר .

תמונה מספר ב1. אמנון, קבוץ

תמונה מספר 1. אמנון הגליל, דג"ע"ור".
כפר רופין תמותות המוניות.

תמונה מספר 2. אמנון, קבוץ שלוחות. תמותות המוניות, שטפי דם והתכייבויות. תמונה מספר 3 אמנון הגליל, כנרת. MMC מרובים בטחול.

תמונה מספר 4. אמנון הגליל, כנרת. וקואוליזציה בעצב הראייה. תמונה מספר 5. אמנון הגליל, כנרת. תנסין דלקתי במוח (גליוסיס)

תמונה מספר 6. שורת תאי TIL-10 מודבקת. תמונה מספר 7. שורת תאי TIL-13, מיקרוסקופיה אלקטרונית.

1.8 תקציב המחקר:

תקציב המחקר השנתי מובא בעמוד השער, ועומד על סך של 200.000 ₪. בקשת המימון הינה לשלוש שנים, והתקציב הכולל המבוקש הינו 600.000 ₪.

דגים ומזון

חומרים

שרותי באינפורמטיקה

סטודנט

- 1.9 רשימת ספרות מצוטטת כולל פטנטים ספציפיים לנושא.
Agius, C., and R. J. Roberts. 2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. 26:499-509
- Amend, D. F. 1975. Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. J. Wildl. Dis.11:471-478 2
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 3
- Bacharach, E., J. Gonsky, K. Alin, M. Orlova, and S. P. Goff. 2000. The carboxy-terminal fragment of nucleolin interacts with the nucleocapsid domain of retroviral gag proteins and inhibits virion assembly. J. Virol. 74:11027-11039 4
- Biacchesi, S., M. Le Berre, S. Le Guillou, A. Benmansour, M. Bremont et al. 2007. Fish genotype significantly influences susceptibility of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), to waterborne infection with infectious salmon anaemia virus. J Fish Dis .30: 631-636 5
- Bohle, H., E. Tapia, A. Martínez, M. Rozas, A. Figueroa and, P. Bustos. 2009. *Francisella philomiragia*, a bacteria associated with high mortalities in Atlantic salmon (*Salmo salar*) cage-farmed in Llanquihue lake. Arch Med Vet.41:237-244 6
- Chen, R. S., and C. B. Chao. 1994. Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathol. 29:61-71. Dorson M., E. Quillet, M. G. Hollebecq, C. Torhy and, B. Chevassus. 1995. Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. Vet Res 26: .361-368 7

- Engelking, H. M., J. B. Harry, and J. C. Leong. 1991. Comparison of representative strains of infectious hematopoietic necrosis virus by serological neutralization and cross-protection assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1372–1378 8
- Eloi, E. R., C. Langevin, C. Tohry, C. A. Houel, V. Ducrocq, A. Benmansour, E. Quillet and, P. , Boudinot. 2012. Genetic Resistance to Rhabdovirus Infection in Teleost Fish Is Paralleled to the Derived Cell Resistance Status. *PlosOne* 7: 4 (e33935) 9
- Lee, K. W., S. C. Chi and, T. M. Cheng. 2002. Interference of the life cycle of fish nodavirus with fish Retrovirus. *J. Gen. Microbiol.* 83:2469–2474 10
- Gilad, O., et al. 2002. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio* koi. *Dis. Aquat. Organ.* 48:101–108 11
- Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkison, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier, and R. P. Hedrick. 2003. Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.* 84:2661–2667 12
- Ghittino, P. Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. 1965. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126:468–478 13
- Hasegawa, S., T. Somamoto, C. Nakayasu, T. Nakanishi, and N. Okamoto. 1997. A cell line (CFK) from fin of isogeneic ginbuna crucian carp. *Fish Pathol.* 32:127–128 14
- Hassanin, A. I., Y. Kaminishi, M. M. Mohamed, M. Osman, H. Zamzam. A. Abdel-Wahad, A. H. Mohamed, E. El-Kady, and T. Itakura. 2009. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining expression of benzo-a-pyrene-Inducible cytochrome P450 1A in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African J. Biotech.* 8:6588-6595 15
- Haugland, Ø., Mikalsen, A. B., P. Nilsen, K. Lindmo, B. J. Thu, T. M. Eliassen, N. Roos, M. Rode and Evensen Ø. 2011. Cardiomyopathy Syndrome of Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Is Caused by a Double-Stranded RNA Virus of the Totiviridae Family. *J. Virol.* 85:5275-5286 16
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Martin, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and, A. Eldar. 2000. A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J. Aquatic Animal Health* 12:44-57 17
- Hershberger, P. K., J. L. Gregg, J. L., C. A. Grady, L. Taylor, and J. R. Winton. 2010. Chronic and persistent viral hemorrhagic septicemia virus infections in Pacific herring. *Dis. Aquat. Organ.* 93:43–49 18
- Hilleman, M. R. 2004. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:14560–14566 19
- Holmes, E. C. 2006. The evolution of viral emergence *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 103:4304-4304 20
- Kjoglum S., S. Larsen, H. G. S, Bakke and, U. Grimholt. 2006. How specific MHC class I and class II combinations affect disease resistance against infectious salmon anaemia in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Shellfish Immunol* 21:431–441 21

- Laham, and E. Bacharach. 2007. Transduction Of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Vectors Lacking The Encapsidation And Dimerization Signals. *J. Virol.* 81: 22
.10687-10698
- LaPatra, S. E., K. A. Lauda, G. R. Jones, S. C. Walker, B. S. Shewmaker, and A. W. Morton. 1995. Characterization of IHNV isolates associated with neurotropism. *Vet. Res.* 26: 23
.433–437
- Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Heppell, T. Wu, and H. L. Davis. 1999. Genetic vaccination of rainbow trout against viral haemorrhagic septicaemia virus: Small amounts of plasmid DNA protect against a heterologous serotype. *Virus Res.*,\ 63:19–25 24
- Melamed, D., M. Mark-Danieli, M. Kenan-Eichler, O. Kraus, A. Castiel, N. Laham, T. Pupko, F. Glaser, N. Ben-Tal and, E. Bacharach. 2004. The Conserved Carboxy-Terminus Of The Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Domain Of The Gag Protein Is Important For Virion Assembly And Release. *J. Virol.* 78:9675–9688 25
- Mohamed, F., M. Shavaliar, R. K. Kim, E. V. Millard, M. R. Gunn, A. D. Winters, C. A. Schulz, A. Eissa, M. V. Thomas, M. Wolgamood, G. E. Whelan, and J. Winton. 2012. Spread of the Emerging Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Strain, Genotype IVb, in Michigan, USA. *Viruses*: 4 734-760 26
- Neukirch, M. 1986. Demonstration of persistent viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus in rainbow trout after experimental waterborne infection. *J. Vet. Med.* 33:471–476 27
- Nishizawa, T., Y. Kokawa, T. Wakayama, S. Kinoshita, and M. Yoshimizu. 2008. Enhanced propagation of fish nodaviruses in BF-2 cells persistently infected with snakehead retrovirus (SnRV). *Dis Aquat Organ.* 3:19-25 28
- Norris, A., L. Foyle and, J. Ratcliff. 2008. Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SPDV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. *J Fish Dis* 31: 913–920 29
- Olsen, A. B., J. Mikalsen, M. Rode, A. Alfjorden, E. Hoel, K. Straum-Lie, R. Haldorsen, and D. J. Colquhoun. 2006. A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *J Fish Dis.* 29:307–311 30
- Ostland V.E., J. A. Stannard, J. J. Creek, R. P. Hedrick, H. W. Ferguson, J. M. Carlberg and, M. E. Westerman. 2006. Aquatic *Francisella*-like bacterium associated with mortality of intensively cultured hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis*. *Dis Aquat Organ.*72:135–145 31
- Ottem, K.F., A. Nylund, T. E. Isaksen, E. Karlsbakk and, O. Bergh. 2008. Occurrence of *Francisella piscicida* in farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in Norway. *J. Fish Dis.*31:525–534 32
- Parrish, C. R., E. C. Holmes, D. M. Morens, E. C. Park, D. S. Burke, C. H. Calisher, C. A. Laughlin, L. J. Saif and, P. Peter Daszak. 2008. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 3:457-470 33

- Purcell, M. K., S. E. Lapatra, J. C. Woodson, G. Kurath and, J. R. Winton. 2010. Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol* 28: 98–105 34
- Purcell, M. K. K. L. Laingm J. R. Winton. 2012. Immunity to Fish Rhabdoviruses. *Viruses*, 4:140-166 35
- Quillet, E., M. Dorson, S. Le Guillou, A. Benmansour and, P. Boudinot. 2007. Wide range of susceptibility to rhabdoviruses in homozygous clones of rainbow trout. *Fish Shellfish Immunol* 22: 510–519 36
- Parrish, C. R., Holmes, E. C., D. M. Morens, E. U. Park, D. S. Burke, C. H. Calisher, C. A. Laughlin, L. J. Saif, and P. Daszak. 2008. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:457-470 37
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy. *J. Biophys. Biochem.* 17:208–212 38
- Slierendrecht. W.J., N.J. Olesen, H. R. Juul-Madsen, N. Lorenzen and, M. Henryon. 2001. Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol* 11: 155–167 39
- Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge, and W. D. Huse. 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16:7583–7600 40
- Stenglein, M. D., C. Sanders, A. L. Kistler, J. Graham Ruby, J. Y. Franco, D. R. Reavill, F. Dunker, and J. K. Joseph L. DeRisía. 2012. Identification, Characterization, and In Vitro Culture of Highly Divergent Arenaviruses from Boa Constrictors and Annulated Tree Boas: Candidate Etiological Agents for Snake Inclusion Body Disease. *mBio* 3(4):doi:10.1128/mBio.00180-12. <http://mbio.asm.org/content/3/4/e00180-12.full.html> 41
- St-Hilaire, S., C. Ribble, C., G. Traxler, T. Davies, and M. L. Kent. 2001. Evidence for a carrier state of infectious hematopoietic necrosis virus in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Organ.*, 46:173–179 42
- Roberts, R. J. 1975. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In *The Pathology of Fishes*, W.E. Ribelin, and G. Migaki, eds. (Madison, WI, University of Wisconsin Press), pp. 399–428 43
- Vestergård Jørgensen, P. E. 1982. Egtved virus: Temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.* 5:47–55 44
- VHSV Expert Panel and Working Group. 2010. Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV IVb) risk factors and association measures derived by expert panel. *Prev. Vet. Med.* 94:128–139 45
- Wolf, K. 1998. Hemorrhagic septicemia virus. In *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*; Wolf, K., Ed.; Cornell University Press: Ithaca, NY, USA, pp. 217–248 46
- Wolke, R. E. 1975. Pathology of bacterial and fungal diseases in fish. In *The Pathology of Fishes*, W.E. Ribelin, and G. Migaki, eds. (Madison, WI, University of Wisconsin Press) 47

Wolke, R. E., A. Murchelano, C. C. Dickstein, and C. J. George. 1985. Preliminary 48
evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. Bull Environ
.Contam Toxicol 35: 222-227