

## שיטת אבחון מהירה למחלת קטרת העור בבקר תוך הבדלה מנגיפי אבעבועות אחרים

וליזר בומברוב, שטרם יהודה, לריסה קוזנצוב, ידין חגי

### 1. תקציר

קטרת העור (Lumpy Skin Disease (LSD) זו מחלה הנגרמת על ידי נגיף ממשפחת האבעבועות, הדומה לאבעבועות הצאן. זו מחלה אקוטית של בקר המאופיינת בהופעת לקויות דמויות אבעבועות עור, נפיחות של קשרי לימפה ובצקת בגפיים. הסימנים הקליניים העיקריים הם: חום גבוה והופעת קטריות בעור. היקף התחלואה עלול להגיע עד- 90% מהאוכלוסייה, אולם התמותה נמוכה בהרבה. הנזק מתבטא בהפסד תנובת החלב, ירידה בפוריות, דלקות עטין כרוניות וירידה במשקל. המחלה לראשונה נרשמה בארץ ב- 1989, למעלה משלושה שבועות. כהתפרצויות נוספות חווינו ב- 2006 ו-2007.

התכנית אשר הוצעה, מטרתה הייתה לתת פתרון לאבחון הבעייתי של קטרת העור ולקצר את משך זמן האבחנה. התכנית התבססה על ייצור נוגדן ייחודי בעזרת פפטיד סינטטי המחקק את האתרים האנטיגנים בנגיף ה- LSD. הפפטיד תוכנן לאחר בדיקה ממוחשבת (תוכנת BLAST) של חלבוני מעטפת הנגיף ונבחר רצף מהפפטיד 32 P הספציפי ל-LSDV. יוצר פפטיד סינטטי אשר לאחר קשירה לנשא KLH הוזרק לארנבות ואלה יצרו נוגדן ייחודי. לאחר דימום הארנבות וניקוי הנסיוב באמצעות קולונה, נבדק הנסיוב המכונה PMAP בשיטת ELISA. תוצאות הבדיקה מראות כי ה- PMAP המיוצר באמצעות הפפטיד הסינטטי הינו נוגדן ספציפי לפפטיד.

בדיקת יעילות נוגדני ה- PMAP במבחן IHC מראה כי נגיף ה- LSD מזוהה במהולים 1/40, 1/20 בתאים ורקמות מודבקים. אך, עוצמת הצבע שהתקבלה אינה מספיק חזקה לשמש בהליך של אבחון מעבדתי רוטיני. נוגדני ה- PMAP, בכל המהולים אינם נותנים צבע או רקע בלתי ספציפי ברקמות שאינן נגועות ב-LSDV.

בבדיקת שיטת ה- AGPT התברר כי זו יכולה לשמש לאבחון אנטיגן ונוגדנים של LSD גם עם חומרים מכבשים וגם מבקר (סוספנסיה עור – אבעבועות וקטריות, נסיובים מחיות שעברו מחלת LSD או SP). המהולים המתאימים לאבחון הם: לאנטיגן – ללא מיהול ולסרום ביקורת – 1:8 תוצאות ראשוניות אלה אפשרו ויאפשרו לקצר את זמן התשובה המעבדתית

### 2. מבוא ותאור הבעיה:

מחלת קטרת העור (Lumpy skin disease, (LSD היא מחלה נגיפית הנגרמת בעקבות אילוח בקר ובופלו עם נגיף DNA ממשפחת ה- Poxviridae, השייך לקבוצת Capripox (1-3). מחלת קטרת העור נפוצה בעקר באפריקה ושם גם מקורה (4,5). היא תוארה לראשונה ברודזיה (4,5) ב- 1929 והפכה למחלה אנדמית והופיעה בסדרה של מגפות שונות והתפשטה עד מצרים (6) 1988. בהמשך חדרה המחלה לאסיה נרשמה בכווית ב- 1986 ובסעודיה ב- 1992 (7,8). בישראל הופיעה קטרת העור ב- 1989 במושב פדויים ובווערה על ידי שחיטת כל הבקר במושב וחיסון משקי הבקר בתרכיב אבעבועות צאן (9-12). המחלה זו היא מחלה רשומה של OIE ומחייבת דיווח מידי לארגון. ב- 2005 פרצה המחלה פעם נוספת במצרים כמגפה שהתפשטה על פני 15 מחוזות בעקר באזור דלתת הנילוס והגיע עד איסמעיליה ופורט סעיד ([http://www.oie.int/eng/info/hebd/a\\_csum.htm](http://www.oie.int/eng/info/hebd/a_csum.htm)). במאי 2006 היא

פרצה המחלה בישראל בשנית במוקד אחד שהתפשט לשני משקים סמוכים (13). ההפצה העיקרית היא כנראה באמצעות חרקים עוקצים, זבובים ויתושים המשמשים כמעבירים מכניים במיוחד לאחר עונות גשומות מאד (14-16)

[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lumpy\\_skin\\_disease.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/lumpy_skin_disease.pdf).

בנוסף, הנגיף בשלב הוירמיה עלול להיות מועבר ישירות בהפרשות ובעיקר ברוק מבקר נגוע לבקר תמים, זאת, על ידי זהום מזון ומים משותפים. אפשרות נוספת של העברה והתפשטות המחלה היא החדרת הנגיף באמצעים מכניים כמו מחטים מזוהמות בעת הזרקה (העברה יטרוגנית) (16-17). תקופת הדגירה של קטרת העור יכולה להמשך עד 5 שבועות (1-3). בהדבקה מבוקרת המתבצעת עם חרק מודבק הדגירה נמשכת 20 – 6 ימים (14). במקום העקיצה מופיעה "קיטריט" (NODULE) ראשונה, בצורת תפיחה קשה בעור בקוטר של 0.5 ס"מ עד 7 ס"מ (14). בשלב הראשוני של המחלה מופיע חום של 41 – 41.5 מעלות צלזיוס הנמשך מספר ימים ומלווה בריוור מוגבר, הפרשות מהעיניים, מהאף, אפטיה, חוסר תאבון, הפרעות נשימה וירידה דרמטית בתנובת החלב, קשרי לימפה חיצוניים מוגדלים, בצקת בגפיים, ובאזורים אחרים. הסימן המובהק ביותר הוא, הופעתן של קיטריט על פני אזורים נרחבים של העור, האף, העפעפיים, האוזניים, הבושת, שק האשכים, העורלה, על פני הפין, והרגליים. הקיטריט הן תפיחות קשות בתוך העור שקוטרן נע בין 0.5 עד 7 ס"מ. חלק מהקטריט מתמזג לקטעי עור מעובים ונרחבים. הקיטריט נרפאות תוך מספר שבועות, נוצר תהליך של נמק ובסוף התהליך נוצרת צלקת. במידה והקיטריט מזדהמות עלולות להופיע מורסות מוגלתיות, דלקת ריאות ותמותה. התחלואה נעה בין 3- 85% והתמותה על פי רוב אינה עולה על 5%. מהלך ההחלמה הוא איטי, תנובת החלב נפגעת קשה ומתבטאת בירידה דרמטית של עד 50%, כמו כן דווח גם על הפלות (1-3, 9-12, 14-16).

המחלה עצמה יכולה לעיתים להדמות, לתגובת יתר בעור (אורטיקריה), להרפס ממיליטיס, לזבוב חרר העור, לפטרת (טריכופיטון וורוקוזום, סטרפטוטריכוזיס) (3-4).

האבחון הראשוני הוא על ידי הסמנים הקליניים, קרי, זיהוי הקיטריט האופייניות וחום מתמשך. זיהוי הנגיף במיקרוסקופ אלקטרוני היא הדרך המהירה, אך רגישות המבחן אינה גבוהה ואינה מבדילה בין LSDV ל-Poxvirus. לשם קבלת תוצאה מהימנה יש צורך במעל ל- 1000 יחידות נגיף ב- 1 מל. בשיטת PCR עם פיתוחם של תחלים מתאימים (יהודה שטרם, הודעה אישית) תתכן הבדלה בין נגיפי אבעבועות השונים.

### 3. מטרת המחקר:

1. פיתוח שיטת האימונוהיסטוכימיה כשיטה מהירה ואמינה לאבחון מחלת קטרת העור המסוגלת לזהות את הנגיף ברקמה החשודה תוך פרק זמן קצר (כשעה וחצי). עם מתן תשובת אבחון מהיר ואמין ניתן לבצע חיסון מידי למניעת התפשטות המחלה.
2. שימוש באנטיגן סינטטי כבסיס למערכת זיהוי נוגדנים בשיטת האליזה.
3. פיתוח מערכת PCR לזיהוי הנגיף.

### 4. חומרים ושיטות:

1. תכנון ויצור הפפטיד והנוגדנים הייחודיים לאימונוהיסטוכימיה:
  - נבחר רצף של 18 חומצות אמינו (NDIFYKKVDTVKDFKNSDV) 27-45 הייחודי של חלבון האנטיגן של-LSDV בהתאם לספרות. חלבון זה מכונה פפטיד 32-P והוא נבדק בעזרת תוכנה מיוחדת לזיהוי האתרים האימונוגניים שלו.
  - תוצאות הבדיקה של האתרים האימונוגניים עברו השוואה הדדית ונבחרו הרצפים בעלי התכונות האימונוגניות הגבוהות ובעלי חומצות האמינו המכילות N טרמינל בסופו של הרצף.
  - הרצף הנבחר בעל התכונה האימונוגנית הגבוהות ובעל חומצות האמינו המכילות N טרמינל בסופו של הרצף, נבדקו באמצעות תוכנת BLAST לבחירה נוספת של הרצף הספציפי ביותר לרצף הפפטיד של ה-LSDV ושאינו מצוי בכל נגיף אחר. מצאנו כי הרצף (NDIFYKKVDTVKDFKNSDV) 27-45 עומד בכל הדרישות ליצירת נוגדנים (Polyclonal Monospecific Afinity Purified PMAP).

- הרצף הנבחר נשלח לחברה חיצונית (הדר ביוטק) מתוך מטרה לבדוק אם הרצפים הנבחרים עומדים בדרישות ליצור נוגדנים כנגד הרצף הנ"ל.
- 2. סינטזה של הפפטיד הנבחר – בוצעה על ידי חברת אדר ביוטק בעיימ, רחובות.
- 3. נוגדנים (PMAP) כנגד פפטיד סינטטי יוצרו גם כן על ידי חב' אדר ביוטק בעיימ. הפפטיד המסונז נקשר לנשא (carrier) שלא מפעיל את מערכת החיסון. הפפטיד המסונז הקשור לנשא הוזרק ל- 2 ארנבות. אלה הוזרקו 4 פעמים מידי שלושה שבועות עם 1 מיליגרם של הפפטיד. שבועיים אחרי ההזרקה האחרונה דיממו את הארנבות והפרידו סרום.
- 4. סרום הארנבות נבדק לרמת הנוגדנים כנגד הפפטיד הסינטטי בשיטת אליזה ישירה. מאחר ונמצא חיובי הועבר תהליך ניקוי באמצעות קולונת אפוקסי הכוללת פפטיד סינטטי. הנוגדנים שנקשרו לפפטיד נשארו בקולונה ובהמשך הופרדו מהקומפלקס על ידי שינוי pH ונבדקו מחדש בשיטת ה- ELISA. חב' אדר ביוטק סיפקה לנו עם תום התהליך כמות של 0.6 מל. נוגדנים PMAP.
- 5. מערכת אימונוהיסטוכימית (IHC) על חתכי רקמה נגועה וקפואה בהתאם לפרוטוקול המקובל במעבדה.

(1) פרוסות הרקמה הצבועות נבדקו במיקרוסקופ NIKON בהגדלה 20x/10x.

- לבדיקת אמינות מערכת בדיקה האימונוהיסטוכימית הועמדו ביקורות כלהלן:
  1. עור קפוא מבקר לא נגוע ב- LSD - ביקורת שלילי
  2. עור קפוא מבקר נגוע ב- LSD אובחן בשיטות אחרות – PCR, EM
  3. עור קפוא מבקר נגוע בנגיפים אחרים: BVD, IBR - ביקורת שלילי
  4. תאי VERO לא מודבקים ב- LSDV - ביקורת שלילי
  5. תאי VERO מודבקים ב- LSDV עם 30% CPE
  6. תאי VERO מודבקים בנגיפים שונים מ- LSDV : PPR, IBR, BVD - ביקורת שלילי
  7. שימוש בשיטת IHC ללא נוגדנים ראשונים - ביקורת שלילי
  8. שימוש בשיטת IHC בעזרת נוגדנים ראשונים ל- RNF, WNF שיצרו באותה שיטה)) PMAP - ביקורת שלילי
- 6. התאמת שיטת ה- AGPT לבדיקת נסיוני בקר לנוכחות נוגדנים לקטרת.
  - PMAP נבדק בשיטת AGPT (Agar-Gel Precipitation Test) נגד אנטיגן של LSD ו-SPV
  - התאמה שיטת AGPT לזיהוי נוגדנים בנסיובים של פרות. השיטה בנויה על בסיס של SPV אנטיגן מיוצר אבעבועות מעור כבשים שחלו באבעבועות צאן ונסיוב מכבשים שעברו את המחלה:
    - הכנת אנטיגן: הומוגניזציה של עור עם לקוויות (מכבשים או פרות) 5+1 v/w ב- BDW וסרכוז במהירות 800 g משך 10 דקות. נוזל עליון משמש לבדיקה.
    - בדיקת ה-AGPT בוצעה ב- 1% NOBLE אגר ב- BDW, קוטר הבארות – 6 mm והמרחק ביניהן 6 mm.
    - ביקורות:
      1. Fetal Calf Serum - ביקורת שלילי.
      2. עור מבקר או כבשה בריא - ביקורת שלילי
- השתמשנו במהולים כפולים של אנטיגן ונסיובים מ- 1:2 עד 1:256 AGPT נעשה בפרוטוקולים שונים:
  1. מיהול קבוע של אנטיגן (עור) במרכז ומהולים של סרום מסביב,
  2. מיהול קבוע של סרום במרכז ומהולים שונים של אנטיגן מסביב.
- 7. ערכת PCR של LSDV המאפשרת ההבדלה בין אבעבועות וקטרת העור. הפקה ה-DNA נעשתה עם הקיט להפקת DNA של QIAGEN. לאחר הפקה DNA עבר דנטורציה ע"י הרתחה למשך 5 דקות. הריאקציה נעשתה עם התחיליים הבאים:
 

```
#lsd43U-GTGGAAGCCAATTAAGTAGA
#lsd12621-GTAAGAGGGACATTAGTTCT
```

- תנאי הריאקציה הם: C 95<sup>0</sup> לדקה ואחר 35 סיבובים של C 95<sup>0</sup> ל- 30 שניות, C 58<sup>0</sup> ל- 30 שניות, C 72<sup>0</sup> ל- 70 שניות, לבסוף שלב הארכה סופי של C 72<sup>0</sup> ל- 5 דקות.
- תוצר הריאקציה בגודל של 1222 נבדק בג'ל אגרוז הצבוע באתידיום ברומיד.

8. התאמה שיטת ELISA לבדיקת נסיובי בקר לנוכחות נוגדנים לקטרת: חומר מפפטיד סינטטי קשור ל-BSA. כמותו הייתה מוגבלת ולא הספיקה לבדיקת אפשרות זיהוי נוגדנים או אנטיגן בשיטת האליזה בהתאם לפרוטוקול המקובל במעבדה.

9. בידוד LSDV בתרבית תאים VERO/LK וסתירת נוגדנים: פרוטוקול דומה לפרוטוקול הדבקה תאים של OIE MANUAL. סוספנסיה עור 1/10 ב-PBS עובר סרכוז בצנטריפוגה. מסננים בפילטר 0.45 וזרועים על רקמת תאים. הדבקה למשך שעה. אחרי זה מוסיפים מדיום ובודקים משך 10 ימים עד להופעת CPE. בהמשך לטיטרציה של הנגיף בוצע נסיון נטרול של הנגיף עם PMAP לפי פרוטוקול שתואר ב- OIE Manual.

## 5. תוצאות:

1 הרצף הנבחר בעל התכונות האימונוגניות המבטיחות ביותר ובעל 18 חומצות האמינו המכילות N טרמינל בסופו של הרצף, נבדק באמצעות תוכנת BLAST לבחירה נוספת של הרצף הספציפי ביותר לרצף הפפטיד של ה- LSDV ושאינו מצוי בכל נגיף אחר. מצאנו כי הרצף 27-45 (NDIFYKKVDTVKDFKNSDV) עומד בכל הדרישות ליצירת נוגדנים PMAP (Polyclonal Monospecific Affinity Purified).

2. הרצף נשלח לחברה חיצונית (הדר ביוטק) לאחר בדיקה התקבלה תשובה כי הרצף עומד בדרישות ליצור PMAP.

3. סינטזה של הפפטיד הנבחר – בוצעה על ידי חברת אדר ביוטק בעימ, רחובות. **(ראה נספח מס' 1)**

נוגדנים (PMAP) כנגד פפטיד סינטטי יוצרו על ידי חב' אדר ביוטק בעימ.

ב. סרום הארנבות נבדק לרמת הנוגדנים כנגד הפפטיד הסינטטי בשיטת אליזה ישירה ונמצא

חיובי. סרום עבר תהליך ניקוי באמצעות קולונת אפוקסי הכוללת פפטיד סינטטי. הנוגדנים

אחרי הניקוי נבדקו מחדש גם בשיטת ה- ELISA. חב' אדר ביוטק ואישרה כי הם הכן

ספציפיים כנגד האנטיגן המסונטז. PMAP עברו מבחן גם בשיטת IHC. בחינה חוזרת של

הנוגדנים אישרה כי הם הכן ספציפיים כנגד האנטיגן המסונטז. **(ראה נספח מס' 2)**

1. תוצאות העמדת מערכת אימונוהיסטוכימית.

בכל הביקורות השליליות (הופעלה שיטת ה- IHC ללא נוגדנים ראשונים, שימוש ב- PMAP

כנגד נגיפים גורמי מחלות אחרות, עור ותאים לא מודבקים ב- LSDV, תאים ועור מודבקים בנגיפים

שונים מ- LSDV) לא קיבלנו צביעה או רקע בכל המהולים של ה- PMAP בהם השתמשנו. גם

במהולים של PMAP 1/160 ו- 1/320 של ביקורות חיוביות, לא מצאנו צביעה ספציפית. במהולים

1/20 ו- 1/40 רק בביקורות החיוביות מצאנו צביעה ספציפית חלשה בציטופלזמה קרוב לגרעין.

במהול 1/80 – לא ניתן היה להבדיל האם זה רקע או צבע ספציפי (צבע חלש). (ראה תמונות.

**נספח מס' 3)**

נוגדני ה- PMAP נקשרו וב יותר לפפטיד הקשור ל-BSA וזאת עד מיהול של 1/500000 , לעומת פפטיד אינו קשור לנשא התגובה הסרולגית פחות מובהקת והכייל נמוך מ-1/50000 ועם ביקורת שלילית המכילה BSA או PBS בלבד – עד מיהול 1/1000 של הנוגדן.

2. התאמת שיטת AGPT לבדיקת נוגדנים ל-LSD בנסיובים של בקר: התוצאות נתנו קווים עם ניואנסים שונים – מקו חזק, עבה ורחב עד קווים חלשים שקשה לראותם.

++++ קו חזק ועבה.

+++ קו חזק אך לא עבה.

++ קו חזק .

+ קו חלש.

-+ קו חלש וקשה לזיהוי. (ראה נספח מס' 4 ו-5)

ג. נמצא כי נוגדני ה- PMAP אינם פעילים בהשיטת AGPT

ד. בסדרת ניסיונות נקבעו המהולים המתאימים של הריאגנטים לשיטת ה-AGPT ואלה כלהלן: אנטיגו – ללא מיהול, נסיון – 1/8 . לא נמצאה תגובה בין ביקורות שליליות וריאגנטים ממערכת AGPT (עור בריא, סרום עגל). אנטיגן מעור של כבשים שעברו אבעבועות צאן נמצא מתאים לזיהוי נוגדנים ל-LSD בסרום של בקר.

3. מערכת PCR של LSDV לצורך הבחנה בין אבעבועות צאן ו-LSD עם התחלים כלהלן:

#lsd43U-GTGGAAGCCAATTAAGTAGA

#lsd12621-GTAAGAGGGACATTAGTTCT

נתן הבחנה ברורה וזיהוי ה-DNA הנגיפי בדגימות דם בעת מחלה ואף במחלה תת קלינית.

4. התאמה ושימוש בשיטת ה- ELISA

PMAP נקשרים טוב יותר לפפטיד הקשור ל-BSA וזאת עד מיהול של 1/500000 , לעומת פפטיד שאינו קשור לנשא התגובה הסרולגית פחות מובהקת והכייל נמוך מ-1/50000 ועם ביקורת שלילית המכילה BSA או PBS בלבד – עד מיהול 1/1000 של הנוגדן. (ראה נספח מס' 6)

5. בידוד נגיף קטרת העור בתרביות תאים ושימוש בתרבית לסתירת נסיון.

דגימות מארועים שונים של קטרת העור נזרעו בתרביות תאים ונגיף התבטא באפקט ציטופטי (ראה תמונות נספח מס' 7) כל הבדודים היו מקשרי למפה של חיות נגועות כשבדוד ראשוני מצליח על תאי LK ובידוד משני על תאי VERO. בדיקת נוגדנים כנגד אחד הבידודים בשיטת סתירת הנסיון SN, התגלתה כבעייתית עקב זמן ממושך של התבטאות הנגיף בתאים (10 ימים). יחד עם זאת הסתבר כי אף לאחר מחלה רמת הנוגדנים בסתירת הנסיון מאד נמוכה.

לפי תוצאות של BLAST, הרצף שניבחר מפפטיד P 32 היה ספציפי ל-LSDV. מבחן PMAP בשיטת ELISA מראה כי ה- PMAP המיוצר באמצעות הפפטיד הסינטי הינו נוגדן ספציפי לפפטיד. מבחן IHC מראה כי – PMAP מזהה את נגיף ה- LSD במהולים 1/20, 1/40 בתאים ורקמות מודבקים. אבל צבע אינו חזק מספיק לשימוש באבחון מעבדתי רוטיני. PMAP לא נותנים צבע או רקע לא ספציפי ברקמות שאינן נגועות ב-LSDV וזאת בכל המהולים. בשיטת AGPT אפשר להשתמש לאבחון LSD אנטיגן ונוגדנים בדגימות מכבשים, (סוספנסיה עור – אבעבועות וקיטריות, נסיונים מחיות שעברו מחלת LSD או SP). המהולים מתאימים לאבחון הם: לאנטיגן – ללא מיהול ולסרום ביקורת – 1:8. שיטת ה- PCR הותאמה לביצוע בדיקות אבחון בחומר חשוד, וניתן לאבחן באמצעות שיטות מוקולריות

## 7. References

1. Abraham, A. and Zissman, A. Isolation of lumpy skin disease virus Israel. *Isr. J. Vet. Med.* 46: 20-23. 1991.
2. Ali, A. A. Esmat, M., Attia, H., Selim, A. and Abdel-Hamid, M. Clinical and pathological studies on lumpy skin disease in Egypt. *Vet Rec.* 127: 549-550. 1990.
3. Brenner, J, Malkinson, M. and Yadin, H. Application of various diagnostic procedures to epidemiological situations encountered during arboviral infection. *Vet. Ital.* 40: 567-571. 2004.
4. Brenner, J., David, D., Avraham, A., Klopfer-Orgad, U., Samina, I. and Peleg, B.A. Experimental infection with local lumpy skin disease virus in cattle vaccinated with sheep pox vaccine. *Isr. J. Vet. Med.* 47: 17-21. 1992.
5. Brenner, J., Haimovitz, M., Oron E., Stram, Y., Fridgut, O., Bumbarov, V. Kuznetzova, L., Oved, Z., Waserman, A., Garazzi, S., Perl, S., Lahav, D., Edery, N. and Yadin, H. 2006. Lumpy Skin Disease (LSD) in a large dairy herd in Israel, June 2006. *Isr. J. Vet. Med.* 61: (in press)
6. Carn, V.M. and R.P. Kitching. An investigation of possible routes of transmission of lumpy skin disease virus (Neethling). *Epidemiol. Infect.* 114; 219-226. 1995
7. Carn, V.M. and R.P. Kitching. The clinical response of cattle following infection with lumpy skin disease (Neethling) virus. *Arch. Virol.* 140: 503-513. 1995.
8. Chihota, C. M., Rennie, L. F., Kitching, R. P. and Mellor, P. S. Attempted mechanical transmission of lumpy skin disease virus by biting insects. *Med. Vet. Entmol.* 17: 294-300. 2003.
9. Chihota, C., L.F. Rennie, R.P. Kitching and P.S. Mellor. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Epidemiol. Infect.* 126: 317-321. 2001

10. Coetzer J. A. W. Lumpy skin disease. In: Infectious Diseases of Livestock. 2<sup>nd</sup> Edition. (Eds). J. A.W. Coetzer and R.C. Tustin. Oxford University Press. 2004. pp. 1268-1276. 2005.
11. Greth, A., Gourreau, J. M. Vassart, M. Ba-Uy, N. Wyers, M. and Lefevre, P. C. Capripoxvirus disease in an Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia. J. Wildlife Dis. 28: 295-300. 1992.
12. Haig, D.A. Lumpy skin disease. Bull. Epiz. Dis. Afr. 5: 421-430. 1957.
13. Kitching, R.P. and Hammoud, J.M., Poxvirus infection and immunity. In: Enciclopedia of Immunology. Vol 3.(Roith, I.M. and Delucs, P.J., Eds.), pp 1261-1264, Academic press, London, 1991
14. MacDonald, R.S.A. Pseudo-urticaria of cattle. North Rhodesian Dept. Anim. Healt. Ann. Report 1930.
15. Mangana-Vougiouka, O.P., Markoulatos, G., Koptopoulos, K., Nomikok, Bakanditsas, N., Papadopoulos, O., Sheep poxvirus identification by PCR in cell culturies. Journal of Virological Methods, 77; 75-79, 1999
16. Office International Des Epizooties, World animal health 5. pp 703. 1990.
17. Ordner, G. and Lefervre, P. C. La dermatose nodulaire contagieuse des bovines. Etudes et sytheses de l'Institut d'Eleavage et de Medicine Veterinarie Tropicale, Maison-Alfort, Paris, pp 92. 1978.
18. Markoulatos, P., Mangana-Vougiouka, O., Koptopoulos, G., Nomikok, K., Papadopoulos, O., Detection of sheep poxvirus in skin biopsy samples by a multiplex polymerase chain reaction, Journal of Virological Methods, 89; 161-167, 2000
19. Shimshony, A. Lumpy skin disease. Israeli Veterinary Services Epidemiol. Quart. (3) pp. 5-7 (in Hebrew). 1989.
20. Tiwari, A.K., Rao, T.V.S. and Negi, B.S., Spot agglutination test for the rapid diagnosis of goat pox, Trop. Anim. Helth Prod., 28; 213-215, 1996
21. Tuppurainen E.S.M., Venter E.H., Coetzer J.A.W. The detection of lumpy skim disease virus in samples of experimentally infected cattle using different diagnostic techniques. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2005, 72(2); 153-164
22. Vanessa M. Carn, An antigen trapping ELISA for detection of capripoxvirus in tissue cilture supernatant and biopsy samples. Journal of Virological Methods, 51; 95-102, 1995
23. Von Backstromm, U. Ngamiland cattle disease: Preliminary report on a new disease, the aethiological agent being probably of an infectious nature. J. South Afr. Vet. Med. Assoc. 16: 20-35. 1945.
24. Weiss, K.E. Lumpy Skin Disease Virus. Virol. Monographs Vol. 3 New York: Springer Verlag. 1968.
25. Yeruham, I., Nir, O., Braverman, Y., Davidson, M., Grinstein H., Hymovitch, M. and Zamir, O. Spread of lumpy skin disease in Israel dairy herds. Vet Rec. 137: 91-93. 1995.

# ADAR BIOTECH

madiplyvipivgreisdvvpelksd **ndifykkvdtvkdfknsdv** nfflkdkkddislsy  
 klliwkveksqgvenfteyfsqglcnalctkeakssiakhfslwksyadadiknsenkfi  
 vvieddntlkdsiiihniiemqkknidifqlretfhnsnsrilfnqennnfmysyggg  
 dftlsayvirllssaiklineiiknkgistslsfemyklekelklnrqvlndsskyilht  
 kylskkranemkngiwnrvqkwmah

Velizar recommended the following peptides:

P 32 # 154-171: (C)ETFHNSNSRILFNQENNN  
 P32 # 27-45: NDIFYKKVDTVKDFKNSDV

## 1) SEARCHING ANTIGENIC PEPTIDES CANDIDATES WITH EMOSS

**ANTIGENIC SOFTWARE:** THIS SOFTWARE IS SEARCHING FOR HYDROPHOBIC AA SURROUNDED BY HYDROPHILIC AREA WHICH WAS FOUND TO BEAR HIGH ANTIGENIC POTENTIAL BY KOLASKAR AND TONGAONKAR.

### OUTPUT FILE *outfile*

```
#####
# Program: antigenic
# Rundate: Sun Feb 07 2007 07:40:58
# Report_format: motif
# Report_file: outfile
#####

#-----
#
# Sequence:      from: 1   to: 265
# HitCount: 10
#-----
```

Max\_score\_pos at "\*"

(1) Score 1.221 length 20 at residues 4->23

Sequence: iplyvipivgreisdvvpel

[www.adarbiotech.com](http://www.adarbiotech.com)

אדר ביotech בע"מ; טל. 08-9468176 פקס. 08-9467750  
 משרד: דרך יבנה 27 רחובות 76360  
 מעבדה: רח' חורש 4, קניסטור #217, גס ציונה 74031



Form 996 ver 1.0 dec2004

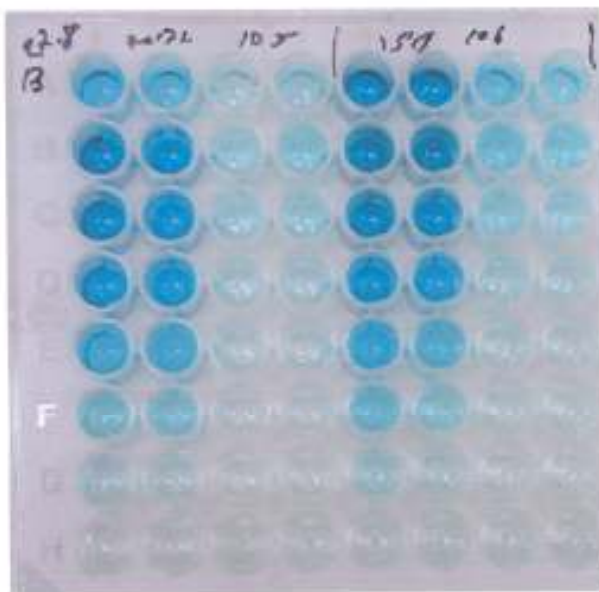


Experimental: antibodies titers against antigen (BSA-Peptide YS1) and BSA as negative control were determined by direct ELISA assay.

Sera was diluted 1:50 1:300 1:1,800 1:10,800 1:64,800 1:388,800 1:2.3x10<sup>6</sup> end point is last colored well in dilutions.

Lane 5 is RbI lane 6 is RbII on antigen coated wells Lane7 and 8 are same sera on BSA coated wells. Other lanes are non relevant.

Conclusion: very good titer at 1:388,800 with very good selectivity (low background on BSA).

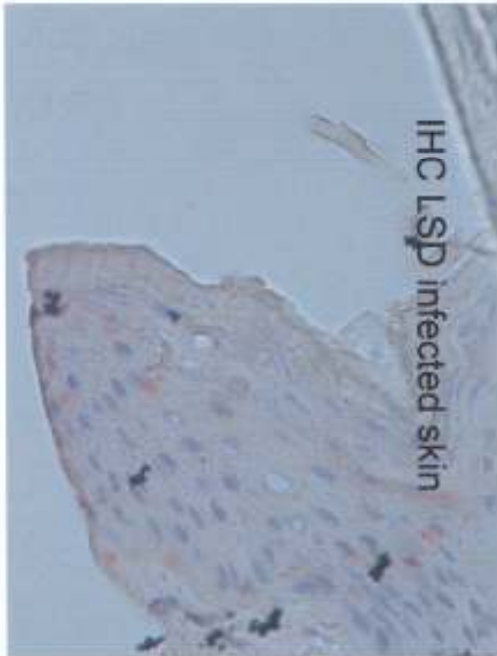


[www.adarbiotech.com](http://www.adarbiotech.com)

אדר ביוטק בע"מ; טל. 08-9468176 פקס. 08-9467750

משרד: דרך יבנה 27 רחובות 76360

מעבדה: רח' החרש 16, קניסטור #217, נס ציונה 74031



מחלים של S<sup>+</sup>

תוצאות AGPT

מחלים של Ag	מחלים של S								
	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
0	(++++)	(++++)	(+++)	(++++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(-+)
1/2	(++++)	(++++)	(+++)	(++)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)
1/4	(+++)	(+++)	(+++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/8	(++)	(+)	(+)	(-+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/16	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/32	(-+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
1/64	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

מחלים של Ag



AGPT - LSD

20.06.07

1859/07

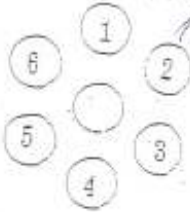
1897/07

1916/07

1917/07

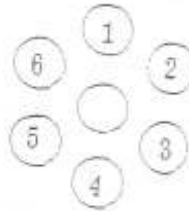
245 | 455

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

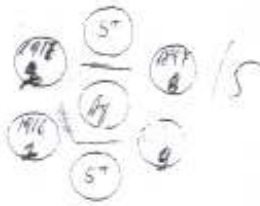


245 | 455

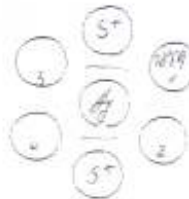
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



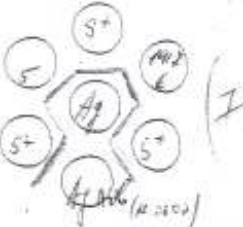
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



**ELISA - PMAP against peptide syntheti (SPV) Adar Biotech****23.01.08**

	<u>Peptide</u>	<u>Pept+BSA</u>	<u>BSA</u>	<u>PBS</u>		
	1	2	3	4		
A	***	***	0.679	0.058	5 min	read after Dilutions
B	***	***	0.269	0.381 ✓		1/100 ✓
C	2.22 ***		0.186	0.188		1/500 ✓
D	0.868 ***		0.099	0.1		1/1 000 ✓
E	0.43 ***		0.112	0.096		1/5 000 ✓
F	0.174	1.81	0.102	0.074		1/10000 ✓
G	0.117	0.963	0.114	0.085		1/50000 ✓
H	0.081	0.382	0.103	0.08		1/100000 ✓
						1/500000 —
	1	2	3	4		
A	3.092	2.338	0.677	0.057	10 min	
B	3.182	3.035	0.268	0.379		
C	2.19 ***		0.186	0.184		
D	0.861 ***		0.11	0.1		
E	0.424	3.412	0.11	0.093		
F	0.173	1.804	0.101	0.072		
G	0.113	0.951	0.11	0.076		
H	0.078	0.379	0.099	0.077		
	1	2	3	4		
A	1.811	1.416	0.683	0.056	30 min	
B	2.176	1.895	0.27	0.375		
C	1.901	2.442	0.184	0.182		
D	0.849	2.356	0.106	0.102		
E	0.418	2.462	0.11	0.091		
F	0.169	1.739	0.1	0.071		
G	0.109	0.932	0.105	0.075		
H	0.075	0.376	0.098	0.076		
	1	2	3	4		
A	1.28	1.073	0.678	0.057	45 min	
B	1.762	1.587	0.267	0.386		
C	1.762	2.087	0.18	0.182		
D	0.844	1.84	0.104	0.101		
E	0.415	2.078	0.111	0.093		
F	0.166	1.717	0.102	0.071		
G	0.108	0.921	0.106	0.076		
H	0.075	0.38	0.098	0.076		

**Innovation of a rapid method for detection of Lumpy Skin Disease of cattle with differentiation from other Pox viruses.**

Velizar Bamarov, Yeuda Starm, Larisa Koznizov, Hagai Yadin.

Lumpy Skin Disease (LSD) caused by virus which belong to the Pox family and very closed related to the Sheep pox. LSD is an acute disease of cattle characterized by skin lesions in the form of lumps, which are very like to lesions of sheep pox, swelling of lymph nodules, leg edema, mastitis, weight loss and decreasing of milk production. LSD is List A disease with high transmission potential. The main characteristic symptoms is elevated body temperature and skin lumps. The morbidity can reach the 90% of the herd while mortality rate is up to 5%. LSD was reported for the first time in Israel in 1989, while the subsequent outbreaks occurred in 2006 and 2007.

The aim of the proposed program was to improve the diagnostic method of LSD. Based on synthesis of specific peptide which mimics the antigenic sites of the virus. After computerized screening (Blast program) of the virus envelopes proteins a part of the sequence of the peptide specific protein P-32 LSDV was chosen and designed. The peptide was produced, bind to KLH and injected to rabbits for production of specific antibodies. Following clarification and purification, the rabbit serum (called PMAP ) was checked by Elisa. The Elisa results indicate that the PMAP is specific antibody to the peptide and can recognize the LSD virus in cells and organ tissue up to a dilution of 1/20 and 1/40. The PMAP serum antibodies are specific to LSD and does not produce any reaction in control uninfected tissues, but, unfortunately the obtained color intensity was not strong enough to use it for routine diagnosis.

The simple AGPT method revealed to be very efficient for diagnosis of LSD and Sheep pox antigen and sera from sheep and cattle infected with those diseases. These results enable cutting of the laboratory procedure for LSD diagnosis.