

דו"ח מסכם: חיסון בקר כנגד קדחת קקיונית: יצירת תרכיב רקומביננטי ובדיקת
בטיחות ואימונוגניות בבקר.

דניאל ברקן, אייל קלמנט. 705-0072

Vaccination against Bovine Ephemeral Fever – Construction of a recombinant vaccine and evaluation of its safety and immunogenicity.

Abstract

Bovine Ephemeral Fever is a viral disease that cause significant financial loss to dairy cattle herds owners in tropical and sub-tropical areas around the world, including Israel. The virus belongs to the Rhabdoviridae family and transmitted by biting insects during spring and autumn seasons. The viral genome expresses 5 non-structural proteins and 4 structural proteins (M, N, P and G). Former trails to develop an efficient vaccine had been demonstrated only limited efficacy in both vaccination coverage and immunity period.

In this research project we are developing a viral vector approach to induce a potent and long-lasting immune response. This approach is based on using attenuated Vaccinia virus strain (MVA) that have been proven to be efficient vector to induce immunity against other viruses such as Rabies and SARS. Vaccinia Virus (VV) recombinant strains were built independently to express each of the structural proteins of BEFV and protein expression in these strains was demonstrated using several molecular and biochemical methods. For the N, P and M strains we have proven stable and robust expression, while in the G expressing strains, we got ambiguous results. While, re-cloning the G expressing strain, we started mice model trails, injecting different combination of the recombinant Vaccinia virus strains. In our vaccination trails we had standardized the efficient dose needed to induce robust immune response against VV in the mice. We also demonstrated a good immune response against GnRH, a protein tag that was expressed in tandem with the G protein in one of the recombinant strains. However, in our trails there was no establishment of neutralizing antibodies against BEFV.

Our results suggest that the expression of the G protein, the major antigen to induce neutralizing antibodies, is impaired in our VV strains. Therefore, we have re-cloned the protein to MVA and we are in the process of checking its expression and preparing a sufficient dose for vaccination in mice.

תקציר בעברית:

קדחת קיקיונית (ק"ק) הינה מחלה נגיפית התוקפת בקר ונגרמת על ידי נגיף RNA חד-גדילי בעל מעטפת שומנית ממשפחת ה-Rhabdoviridea. גנום הנגיף מקודד לעשרה חלבונים שונים, חמישה מהם חלבונים מבניים – L, P, M, N ו-G. הנגיף מועבר על ידי חרקים מוצצי דם וגורם לרוב לתחלואה מאופיינת בדרך כלל בשיעור היארעות גבוה ובשיעור תמותה שלרוב אינו עולה על 1%. תרכיבי חיסון שפותחו בעבר הראו הגנה חלקית בלבד וכיום נעשה שימוש בארץ בעיקר בחיסון האוסטרלי המבוסס על נגיף חי מוחלש, למרות ספקות שעלו לאחרונה לגבי יעילותו בישראל.

בעבודה זו, השתמשנו בטכנולוגיה הכוללת שימוש בנגיף ווקסינה מזן MVA השייך למשפחת ה-Poxviridae שהופק במקור מפרות. זן הנגיף - MVA – הועבר מספר פעמים רב בתאי עוף ונמצא בעל יכולת להדביק תאי יונקים אך לא להתרבות בהם ולכן נחשב לזן יעיל לביטוי גנים זרים בתאי יונקים אך גם בטוח לשימוש.

הגנים לחלבונים המבניים של נגיף ק"ק – L, P, M, N ו-G - שובטו בנפרד לגנום נגיף MVA ונבדקו להצלחת השיבוט על ידי ריצוף הגנום. בנוסף, ביצענו אנליזה לביטוי חלבונים מסוג ווסטרן-בלוט בשימוש בנוגדנים שהופקו מפרה שהבריאה ממחלת ק"ק וכן זיהוי באנליזת ספקטרומטר מסות. הצלחנו לזהות חלבונים בעלי גודל מתאים לחלבונים N ו-M במערכת ביטוי המבוססת על תאי עוף שהודבקו בזנים השונים וכן זיהינו את החלבונים L, P ו-M באנליזת ספקטרומטר מסות.

בשלב הבא, ביצענו הזרקה של זני הנגיף שפותחו לעכברים בשילובים שונים שלהם על מנת לזהות את בטיחות השימוש במערכת זו ובנוסף את היכולת של מערכת החיסון ביונקים לפתח תגובה חיסונית חזקה יותר ובעל פוטנציאל לזיכרון חיסוני בהשוואה לחיסונים אחרים כגון החיסון האוסטרלי. לצערנו, בשימוש בסרום העכברים לאחר החיסון, לא נמצאה יצירה של חלבונים מנטרלים כנגד נגיף ק"ק במערכת תרבית תאים במעבדה, אך כן נמצאה יצירת נוגדנים כנגד התג GnRH שהוצמד לחלבון G בחלק מהעכברים שחוסנו.

לסיכום, בשלב זה של הפיתוח החיסון נמצא בטוח לשימוש ויעיל בהפעלת מערכת החיסון ההומוראלית כנגד נגיף MVA וכנגד חלק מהחלבונים המשובטים לגנום הנגיף. למרות זאת, לא נמצאה תגובה חיסונית הומוראלית ליצירת נוגדנים מנטרלים כנגד נגיף ק"ק בשימוש בנגיפי MVA המבטאים את החלבונים המבניים של נגיף ק"ק בעכברים.

ייתכן ששיבוט מחדש של החלבון G נדרש על מנת לוודא ביטוי של החלבון במערכת זו. כמו-כן, ייתכן שבדיקת התגובה החיסונית התאית וניסויי הוקעה לעכברים מחוסנים ישקפו טוב יותר את יכולת החיסון שפותח ליצור הגנה פעילה כנגד מחלת ק"ק.

רקע

קדחת קיקיונית (ק"ק) הינה מחלה נגיפית התוקפת בקר ובאפלו. המחלה נגרמת על ידי נגיף RNA חד גדילי ממשפחת ה-*Rhabdoviridea*. גנום הנגיף שאורכו 14,900 בסיסים, מקודד לחמישה חלבונים מבניים: P, N, ו-L היוצרים את הנוקלאוקפסיד העטוף בחלבון המטריקס (M) ובמעטפת שומנית וחלבון המעטפת G שהוא גם החלבון האימונוגני גדו נוצרים נוגדנים מנטרלים. בנוסף ישנם חמישה חלבונים לא מבניים המבוטאים על ידי הנגיף ותפקידם אינו ברור (Walker and Klement, 2015). הנגיף מועבר על ידי חרקים מוצצי דם (יתושים או יבחושים) ולכן עיקר היארעות המחלה היא בתקופות האביב והסתיו. המחלה הנגרמת על ידי הדבקה בנגיף מאופיינת בעיקר בעליה בחום הגוף, ירידה בתיאבון, קשיון שרירים וירידה בתפוקת החלב. קשיון השרירים והכאב המלווה במחלה יכולים להסתיים לעיתים ברביצה ומוות כתוצאה מהסיבוכים הנובעים ממנה. התחלואה בקדחת קיקיונית מאופיינת בדרך כלל בשיעור היארעות גבוה ובשיעור תמותה נמוך יחסית שלרוב אינו עולה על 1%, למרות שבמספר משקים נצפתה תמותה גבוהה יותר (Walker and Klement, 2015). עיקר הנזקים הכלכליים הנובעים מקדחת קיקיונית קשורים בהפסדי תפוקת חלב. במחקר שבוצע לאחרונה וניסה להעריך את רמת הירידה ביצור חלב במשק נגוע נמצא הפסד ממוצע של כ-176 ליטר חלב עבור כל פרה שחלתה בקדחת קיקיונית (Aziz-Boaron et al., 2014). המחלה תוארה בישראל לראשונה ב-1931 (Rosen, 1931) ומאז הופיעה בתכיפות נמוכה יחסית עד לתחילת שנות התשעים. מאז, קיימת עליה מתמדת בהיארעות המחלה, וכעת היא מאופיינת בהיארעות גבוהה (מעל אחת לשנתיים). התפרצויות המחלה מערבות עשרות עד מאות משקים בכל שנה ומתרחשות בכל שנה באזור אחר בישראל. עם זאת, האזורים הנפגעים ברמה הקשה ביותר הם עמק הירדן ועמק חפר. עד כה פותחו ארבעה סוגים של תרכיבים כנגד קדחת קיקיונית: א. תרכיבים מומתים. ב. חיים מוחלשים. ג. תרכיבים המבוססים על חלבון G. ד. תרכיבים רקומביננטיים. שני סוגי התרכיבים הראשונים הם העיקריים בהם נעשה עד כה שימוש בשדה. קיימים דיווחים מועטים ביותר המתארים את יעילות התרכיבים השונים בשדה. תרכיב המבוסס על נגיף ק"ק אוסטרלי מוחלש שעורבב עם האדג'ובאנט Quil A הוא התרכיב בו נעשה שימוש בשנים האחרונות בישראל. במחקר שבוצע באוסטרליה בשנות התשעים הראה התרכיב יעילות של 90% במניעת מחלה (Vanselow et al., 1995), אולם במחקר רטרוספקטיבי שבוצע בישראל לאחרונה נמדדה רמת תחלואה דומה במשקים מחוסנים ובמשקים לא מחוסנים והדבר העלה ספק רב באשר ליעילותו של תרכיב זה (Van-Straten, personal communication). בנוסף נעשה בישראל בעבר שימוש בתרכיב מומת שפותח מזן ק"ק שבודד ביקום בשנת 2000. התרכיב הראה יעילות של 50% במניעת מחלה, אולם רק לאחר 3 הזרקות שימוש בתרכיב מומת נמצא כבעל יעילות מוגבלת ושימוש בתרכיב חי מוחלש הינו בעל בטיחות

נמוכה. מכיוון שפרות אשר חלו בעבר מוגנות מפני מחלה נוספת (Walker and Klement, 2015), ברור שתגובה חיסונית המקנה הגנה אכן אפשרית, אולם לא לגמרי ברור כיצד להשיגה. בעוד שברור שנוגדנים נגד חלבון ה- G נוצרים בפרה לאחר מחלה קלינית, וברור כי נוגדנים אלו אכן קושרים ומנטרלים את הנגיף לפחות במידה משמעותית, הרי אין גם ספק כי תגובת נוגדנים זו לבדה אינה מספיקה ואינה מרכיבה את כל התמונה החיסונית – שכן התרכיבים שפורטו למעלה הביאו לתגובת נוגדנים כזו, אולם לא סיפקו הגנה מספקת. יתרה מזאת, משך התגובה הנוגדנים שיצרו היה קצר ונראתה ירידה משמעותית בכייל הנוגדנים כשלושה חודשים לאחר החיסון (Aziz-Boaron et al., 2013). ידוע כי נוצרים נוגדנים גם נגד חלבון המעטפת M וגם נגד החלבון הפונקציונלי N, אולם נוגדנים אלו אינם מנטרלים את הנגיף. תוספת של חלבון N לתרכיב אמנס הובילה בעבר לתגובה חיסונית ניתנת למדידה, אולם לא הוסיפה להגנה. נראה, אם כך, שלפיתוח תרכיב יעיל דרושה גישה שונה

שונה	מזו	שננקטה	עד	כה.
נגיף הוקסינייה (vaccinia) הוא נגיף מוחלש המשמש כחיסון נגד מחלת האבעבועות השחורות בבני אדם. הנגיף מתרבה בתאי יונקים, ויוצר תגובה חיסונית חזקה המגנה בצורה יעילה מאד נגד מחלת האבעבועות. מכיוון שהנגיף בטוח לשימוש, וניתן להנדסה גנטית בפרוטוקולים מקובלים וידועים, נערכו מחקרים רבים של שימוש בוקסינייה כוקטור לחיסון כנגד מחלות אחרות – בבני אדם ובבעלי חיים. בבני אדם, נעשו ניסויים בחיסון כנגד וירוס HIV (Bakari et al., 2013), חיידק השחפת ועוד. בקופים נוסה חיסון נגד מלריה (Afolabi et al., 2016), בחתולים – נגד FIV (Hebben et al., 2004), ועוד דוגמאות רבות. החיסון האוראלי נגד כלבת (RABORAL-V-RG), המפוזר בפתינות, ושהשימוש בו הוכתר בהצלחה רבה, מבוסס על נגיף הוקסינייה אשר מבטא את חלבון ה- G של נגיף הכלבת (שהוא מאותה משפחה של נגיף ק"ק). מעניין לציין כי נגד נגיף הכלבת (בניגוד לק"ק), חיסון המבטא רק את חלבון G הקנה הגנה מצוינת – יתכן ובגלל הבדלים בין הנגיפים.				

בשל דאגה מענייני בטיחות בבני אדם – אשר חלק מזערי מהם מפתח תגובה עורית קשה לחיסון בוקסינייה – ועוד לפני הדברת מחלת האבעבועות, פותחו מספר זנים של וקסינייה אשר יהיה בטוחים לחלוטין לשימוש. הנפוץ בהם הוא ה- Modified Vaccinia Ankarana (MVA), שהועבר קרוב ל- 600 פעמים בתאי עופות, ואיבד כמעט לחלוטין את יכולתו להתרבות בתאי יונקים. עם זאת, הנגיף מצליח לשכפל את כל החלבונים שלו, אולם לא מרכיב ויריונים אינפקטיביים. נגיף ה- MVA משמש גם כן בניסויים רבים של חיסון – הן וטרינרי והן בבני אדם (Volz and Sutter, 2013). חסרונו הוא מידת הגנה מעט פחותה יחסית לוקסינייה (לפחות נגד מחלת האבעבועות), ואילו יתרונו הגדול הוא הבטיחות הגבוהה מאד בבני אדם - יתרון שאולי פחות חשוב בחיסונים וטרינריים, שכן הסיכון היחיד בוקסינייה הוא מחלת עור בחולים מדוכאי חיסון או בעלי רקע של מחלת עור אקזמטוטית. בטיחות זו גם מאפשרת עבודת מעבדה פשוטה יותר. תרכיבים רקומביננטיים המבוססים על ביטוי של חלבון G של נגיף הק"ק בנגיפי האבעבועות vaccinia או קטרת העור הוכנו בעבר והדגימו יכולת ליצור נוגדנים מנטרלים כנגד הנגיף. התרכיב הרקומביננטי המבוסס על קטרת העור נכשל בהגנה בעת הוקעה (Wallace and Viljoen, 2005). לעומתו, התרכיב המבוסס על נגיף ה- vaccinia גרם לפיתוח נוגדנים ואף הראה הגנה מפני הדבקה

בנגיף (Hertig et al., 1996). יחד עם זאת, פיתוחו לא נמשך, יתכן ועקב מגבלות תקציביות. בעבודה זו שיבטנו אנטיגנים אפשריים של נגיף הקדחת הקיקיונית לגנום נגיף הווקסיניה מסוג MVA על מנת לבדוק את היכולת של נגיפי MVA לבטא את החלבונים בתרביות תאים ובעכברים וכן להשרות תגובה חיסונית במודל עכברים.

שיטות וחומרים

תאים ונגיפים

תאי SL-29 מסוג פיברובלסטים של תרנגולת (Chicken Embryo Fibroblasts) נרכשו מאגר התאים האמריקאי (American Type Culture Collection - ATCC) ונשמרו בחנקן נוזלי על להפשרה ושימוש. התאים גודלו במדיום המומלץ DMEM בתוספת 10% FBS, 5% Triptose phosphate broth, ונאנטיביוטיקה מסוג פנצילין סטרפטומיצין. התאים גודלו ופוצלו עד ל-5 פיצולם נפרדים או עד 3 שבועות לצורך גידול הנגיף או 7 פיצולים לצורך מבחני טיטרציה.

נגיפי ווקסיניה (Vaccinia virus) מזן (Vaccinia Ankara modified MVA (CRL-1566) נרכשו ממאגר התאים האמריקאי (ATCC) בטיטר של $10^{7.5}$ TCID₅₀ ל-0.2 מ"ל. טיטר הנגיף אומת בניסויי טיטרציה נגיף לטיטר של $10^{6.5}$ יחידות מדבקות למ"ל. סטוק הנגיף נשמר בחנקן נוזלי לאורך זמן ומנות שימוש קטנות הופשרו ונשמרו בטמפרטורה של -80°C לטווחי זמן קצרים.

נגיף קדחת קיקיונית (Bovine Ephemeral Fever Virus - BEFV) התקבל מהמכון הוטרנרי ע"ש קימרון (בית דגן, ישראל) ונמצא בעל אפקט ציטופתי משמעותי בגידול בתרבית תאים מסוג Vero (בית דגן, ישראל) ונמצא בעל אפקט ציטופתי משמעותי בגידול בתרבית תאים מסוג Vero (kidney epithelial cells extracted from an African green monkey).

יצירת נגיפים רקומביננטיים

נגיפים רקומביננטיים של נגיף MVA יוצרו כפי שדווח בעבר (Milligan et al., 2016). בקצרה, תאי CEF גודלו בפלטת 6 באריות הודבקו בנגיף MVA זן הבר ביחס של 1:10 (MOI=0.1). לאחר שעה, הנגיף הוצא והתאים כוסו במדיום גידול. לאחר מכן, הוספנו תערובת של 0.15 מ"ל המכילה מדיום שהודגר 15 דקות עם 8 מיקרוליטר של ריאגנט טרנספקציה (FuGene6, Promega) ו-2 מיקרוגרם של הפלסמיד pLW44 (התקבל מפרופ' Bernard Moss מהמכון האמריקאי לחקר הבריאות NIH), המכיל את הגן הרצוי. התאים הודגרו באינקובטור 37°C בנוכחות 5% CO₂ ל-48 שעות עד לזיהוי ביטוי של GFP בתאים בודדים. מדיום הגידול והתאים נאספו והוקפאו בטמפרטורה של -80°C . בשלב הבא, התאים הועברו 3 הפשרות מהירות באמבט חם והקפאות מהירות בחנקן נוזלי לשבירת התאים ושלושה מחזורי סוניקציה בעוצמה גבוהה. מנות של 10-100 מיקרוליטר ממדיום הנגיף הודגרו עם תאים טריים לשעה. הנגיף נשאב ומדיום גידול המכיל 5% FBS הוסף לתאים ל-48-72 שעות עד לזיהוי של פלאקים נפרדים המבטאים את החלבון GFP. פלאקים בודדים נאספו באמצעות פיפטור והוקפאו ב- -80°C בנפחים של 200 מיקרוליטר. פלאקים אלו טופלו באותו אופן לפיצוץ התאים כפי שמתואר לעיל ו-10 מיקרוליטר הודגרו עם תאים טריים לצורך הדבקה כפי שמתואר

לעיל. התהליך של בידוד פלאקים בודדים בוצע באופן סידרתי כ-5-7 פעמים עד לקבלת נגיף הומוגני של הזן הרקומביננטי ללא רקע של זן הבר. תיאור השיטה מוצג בתמונה 1.

בדיקות מולקולאריות לזיהוי החדרת גנים של הנגיף ק"ק לגנום הנגיף MVA

זיהוי החדרת הגנים של נגיף ק"ק לגנום נגיף MVA בוצע בשני שלבים. בשלב הראשון, DNA נגיפי הופק מ- 10^5 חלקיקים מדבקים של נגיף רקומביננטי הומוגני באמצעות קיט הפקת DNA מתאים (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). לאחר מכן, בוצעה אנליזת הגברת מקטעי DNA בשיטת Polymerase chain reaction (PCR) בשימוש בפריימרים ספציפיים לפרומוטור שלפני הגן (H5_Promoter-forward: 5'-GGGTGGTGTAAATTGAAAGCG-3' ולרצף לאחר הגן המוחדר (MVA_flank-reverse: 5'-CTATCAACTACCTATAAACTTTCC-3'). גודל המקטעים שהתקבלו השווה לתוצאות הגברה שימוש באותם הפריימרים על הפלסמיד pLW44 עם הגן המוחדר הרלוונטי. בשלב השני, תוצרי ריאקציית ה-PCR בזנים בהם זוהה מקטע בגודל המתאים, נשלחו לריצוף סנגר בשימוש באותם הפריימרים. הרצף הושווה לרצפי הגנים הרלוונטיים של נגיף ק"ק.

בדיקות ביוכימיות לזיהוי ביטוי חלבונים

תאי CEF הודבקו בנגיף MVA רקומביננטי המכיל גן לחלבון נגיף ק"ק ביחס של 1:1 (MOI=1) לשעה. לאחר מכן, הנגיף נשאב והתאים כוסו במדיום גידול המכיל 5% FBS. לאחר 48 שעות, בוצעה הערכה של מידת ההדבקה על פי ביטוי GFP של לפחות 90% מהתאים. התאים נשטפו ב-PBS פעם אחת וגורדו בעזרת מקל גירוד תאים. לאחר מכן, התאים סורכזו והוקפאו ב- -80°C עד לשימוש. לאחר הפשרה, התאים הורחפו בבופר ליזיס (RIPA) המכיל מעכבי פרוטאזות. מיד לאחר ההרחפה, הוסף בופר הטענה (Lemmlie buffer), התאים הורתחו ל-10 דקות והוטענו על ג'ל דנטורטיבי בריכוז 12% פולי אקריל אמיד להפרדה על פי גודל. בנדים בגודל הצפוי נחתכו מהג'ל לאחר צביעת חלבונים מסוג Coomassie, ושנלחו לאנליזת ספקטרומטר מסות כנגד רצפי החלבונים של נגיף ק"ק במרכז לחקר חלבונים של הטכניון (The Smoler Protein Research Center).

אנליזת אימונו-בלוט בוצעה על ממברנת ניטרולולוז אליה הועברו החלבונים לאחר הפרדה בג'ל דנטורטיבי (SDS-PAGE). הממברנה נחשפה לתערובת של ארבעה נוגדנים כנגד 4 פפטידים של החלבון G שהוכנו בהזמנה מיוחדת (GL Biochem (Shanghai) LTD.), או לסרום מפרות שנדבקו בנגיף או לנוגדנים כנגד חלבוני הביקורת GFP או אקטין. לאחר שטיפת הממברנה, הממברנה הודגרה עם נוגדים שניוניים הקשורים לאנזים Horseradish reductase protein (HRP) והודגרו עם סובסטרט מסוג 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (SuperSignal West Pico PLUS) (Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific). חלבונים אליהם נקשרו הנוגדנים נצפו בתחום גלי X (425nm) במכשיר הדמיה.

ניסויי בטיחות ואימונווגניות בעכברים

ניסויי חיסון בעכברים אושרו על ידי ועדת האתיקה של האוניברסיטה העברית בירושלים (). הניסויים בוצעו בחדר גידול חיות SPF ייעודי על הפרוטוקול הבא: עכברים בגיל 10 שבועות הוזרקו במנת חיסון אחת המכילה 10^5 - 10^6 נגיפים מכל זן לחלל הבטן. במשך שלושה ימים לאחר מתן החיסון, העכברים נוטרו באופן יומי לגילויי מצוקה, תגובה אימונווגנית מוגברת או לאדמומיות באזור ההזרקה. בשבוע שלאחר מכן, ניטור העכברים בוצע פעמיים בשבוע עד למתן מנת חיסון הדחף. שבועיים לאחר מתן מנת החיסון הראשונה, העכברים חוסנו במנת דחף ונוטרו באותו אופן. שלושה שבועות לאחר מתן מנת הדחף, העכברים הוקרבו וכ-1 מ"ל של דם נלקח מהלב והודגר בטמפרטורת החדר לחצי שעה לקרישה ספונטנית. לאחר מכן, הדם סורכז במהירות של 8000rpm ל-10 דקות במיקרו-צנטריפוגה והסרום נאסף למבחנה חדשה ונשמרה ב- 20°C עד לאנליזה.

ניסויי נוטראליזציה לנגיף קדחת קיקיונית

ניסויי נוטראליזציה בוצעו על תאים פרמסיביים לנגיף ק"ק מסוג vero. נגיף ק"ק נמהל לטיטר של 50 TCID₅₀/ml הודגר במדיום גידול ללא FBS בנפח כולל של 100 מיקרוליטר המכיל מיהולים כפולים של סרום של חיה מחוסנת. לאחר שעה, 150 מיקרוליטר של תאים מורחפים ($\sim 10^5$) הוספו לבארית והודגרו לחמישה ימים באינקובטור בטמפרטורה של 37°C . בסיום ההדגרה, התאים נבדקו לנוכחות אפקט ציטופאתי בתאים בעקבות התרבות הנגיף או גדילה רגילה כאשר הנגיף נוטרל על ידי הסרום.

תוצאות

העמדת מערכת לביטוי נגיף ק"ק ב- vaccinia בתרביות תאים *in-vitro*

לנגיפי ווקסיניה טווח מאכסנים גדול ולרוב ניתן לגדל אותם בתרביות תאים סרטניות ממקור אדם. על מנת לשמור על בטיחות מקסימלית מפני זליגה של נגיף רקומביננטי לסביבה, בחרנו בעבודה זו להשתמש בזן הנגיף המוחלש MVA. זן זה מוגבל לגידול בתרביות תאים ראשוניים בלבד של עוף. לצורך כך רכשנו תאי פיברובלסטים עוף SL-29 (ATCC) וכן את הנגיף עצמו MVA (ATCC) וקבענו את טיטר הנגיף בשיטת ספירת פלאקים תחת צביעה בצבען קריסטל ויולט ותנאי עבודה במעבדה (לא מוצג).

מצאנו כי טיטר הנגיף שנרכש (דווח כבעל טיטר של $10^7.5$ TCID₅₀/0.2ml) במספר היחידות האינפקטיביות למיליליטר הוא 2.6×10^6 PFU/ml.

שיבוט החלבונים המבניים של נגיף ק"ק לפלסמיד pLW44.

לצורך הפקת RNA של נגיף ק"ק, השתמשנו בתאי vero שהודבקו בנגיף ק"ק ביחס 1:1 (MOI=1). לאחר 48 שעות, התאים הופרדו מצלחת הגידול להפקת RNA נגיפי. בשימוש בראקצית Reverse Transcription (RT) יצרנו cDNA של הגנום הנגיפי על פי פריימרים ייחודיים לגנים המבניים מטריקס (M), נוקלאוקפסיד (N), פוספופרוטאין (P) וגליקופרוטאין (G). לאחר מכן, הגברנו את מספר

העותקים של כל גן בנפרד בשיטת PCR (תמונה 2 A). המקטעים שהוגברו של הגנים הללו נמצאו מתאימים לאורך הגנים המדווח ושובטו לפלסמיד מעבר (MSG234). לאחר השיבוט הפלסמידים רוצפו ורצף של כל אחד מהגנים נמצא מתאים לרצף הגנים מנגיף ק"ק של הזן המקומי.

הפלסמיד pLW44 (תמונה 2 C,B) מכיל אלמנטים גנטיים להעתקת גנים ספציפיים לגנום הנגיפי על ידי רקומבינציה הומולוגית. בין אלמנטים אלו הכנסנו את הגנים לחלבוני ק"ק שהגברנו כמו גם סמן מדווח מסוג חלבון פלורוסנטי ירוק (GFP) שניהם תחת פרומוטורים חזקים של נגיף vaccinia. כל ארבעת הגנים המבניים (G,P,N,M) הועברו לפלסמיד נפרד והצלחת השיבוט נבדקה על ידי ריצוף בעזרת פריימרים מתאימים.

הדבקת תאי עוף בנגיף MVA בתוספת החדרת הפלסמידים לתאים לצורך רקומבינציה של הגנום הנגיפי כך שיכיל את הגנים של נגיף ק"ק.

על מנת ליצור תנאים מתאימים לרקומבינציה הומולוגית של הגנים של נגיף ק"ק לגנום נגיף MVA, הדבקנו תאי פיברובלסטים מעוף בנגיף MVA ביחס של 10:1 לטובת התאים (MOI=0.1). לאחר פינוי חלקיקי הנגיף המיותרים, הוספנו את הפלסמידים המשובטים לתאים בנוכחות מניע טרנספקציה (transfection agent) להחדרת הפלסמידים לתאים. תאים שהוחדר אליהם הפלסמיד ביטאו את החלבון הזרחני רק במידה והתא גם הודבק בנגיף. לאחר המתנה של 48 שעות וידאנו נוכחות של פלסמידים ונגיף בתאים משותפים באמצעות נוכחות הסמן הפלורוסנטי (תמונה 3). במידה וקיבלנו נוכחות של ביטוי החלבון הפלורוסנטי, התאים נאספו, פוצצו והכנו לשלב הבידוד של הזנים הרקומביננטיים מרקע זן הבר.

בידוד שבטים בודדים בעלי פוטנציאל לבטא גנים שונים של נגיף ק"ק מרקע זן הבר.

בשלב זה, אחוז האוכלוסייה של נגיפים רקומביננטיים נמוך ביחס לזן הבר מכיוון שתדירות אירועי הרקומבינציה נמוך מאוד, גם בתאים בהם הנגיף קיים לצד הפלסמיד. לכן, השתמשנו במדיום הגידול והתאים המפוצצים שהתקבלו בשלב הקודם, להדבקה של תאי פיברובלאסטים טריים לצורך זיהוי נגיפים בודדים שעברו אירועי רקומבינציה. לאחר ההדבקה, התאים כוסו במדיום גידול מוצק למחצה לצורך יצירת פלאקים בודדים שמקורם בנגיף בודד. פלאקים המבטאים GFP מייצגים נגיפים רקומביננטיים בעלי סבירות גבוהה להכנסת כל המקטע המיועד לגנום הכולל גם את חלבוני נגיף ק"ק (תמונה 4). בשלב זה, נאספו מספר פלאקים מכן זן בנפרד מכיוון שלא ניתן לבצע בדיקה בשלב זה שכל המקטע הוכנס או רק החלק שמבטא את הגן המדווח. על מנת לבדוד את הזנים הרקומביננטיים לגמרי מרקע זן הבר, ביצענו את תהליך העברה הזה מספר פעמים (5-7 העברות סדרתיות). לאחר כל העברה, בוצעה הדבקה של תאים טריים על מנת להעריך את רמת הבידוד. סיום שלב הבידוד נקבע כאשר כל הפלאקים שזוהו באור נראה בשדה הראיה במיקרוסקופ, נמצאו כמבטאים את הסמן הפלורוסנטי (תמונה 5).

בדיקת ביטוי חלבוני נגיף ק"ק בוקטור נגיף MVA רקומביננטי.

בשלב זה, הנגיף הרקומביננטי המבודד מבטא את חלבון הסמן הפלורוצנטי GFP שמעיד כל קיום אירועי רקומבינציה בין הפלסמיד לגנום הנגיף, אך החדרת הגנים של נגיף ק"ק וביטוי תקין שלהם עדיין לא וודא. לכן, ביצענו מספר בדיקות מולקולאריות וביוכימיות על מנת לזהות ביטוי של הגנים המוחדרים. דגימה של הנגיף לאחר גידול בתרביות תאים נלקחה להפקת DNA. על ה-DNA שהופק ביצענו אנליזת PCR להגברת האזור בגנום אליו החדרנו את הגנים של נגיף הק"ק (תמונה A6). תוצרי ריאקציה ההגברה הוערכו על פי גודל ונמצאו מתאימים לגודלי הגנים שהוחדרו. תוצרים אלו נשלחו לריצוף והראו כי רצף הגנום באזורים אלו מתאים לגנים של נגיף הק"ק שהחדרנו. במקביל, הדבקנו תאי פיברובלסטטים של עוף בנגיפים לצורך הערכת הצלחת הכנסת הגנים של נגיף הק"ק לגנום של הנגיפים הרקומביננטיים והיכולת שלהם לבטא את החלבונים של נגיף הק"ק שהוחדרו לגנום. תאים מודבקים נקצרו לאחר שנצפה כי לפחות 80% מהתאים בתרבית המבטאים GFP. לצורך הערכת ביטוי החלבונים של נגיף הק"ק, ביצענו אנליזת ווסטרן בלוט בנוכחות נוגדנים המזהים ביטוי GFP, המהווה סמן להצלחת הכנסת הגנים המתוכננים לגנום הנגיף. מכיוון ואין לנו נוגדנים יעילים המתאימים לחלבוני נגיף הק"ק ששיבטנו (G, M, P ו-N), לא ניתן היה העריך את ביטוי החלבונים הללו בתאים המודבקים (תמונה B6). במקביל, ביצענו החדרה של החלבון G מאוחה לתג זיהוי של 10 חומצות אמינו של הפפטיד GnRH. בדיקת ווסטרן בלוט כנגד הפפטיד GnRH הראתה סיגנל חיובי עם בנד בגודל ~75kDa, מעט קטן יותר מהתוצר המצופה לתוצר החלבונים המאוחדים – 85kDa (תמונה C6).

בנוסף, ביצענו בדיקה של זיהוי ביטוי חלבוני נגיף הקדחת הקיקיונית ושל האנטיגניות שלהם בנגיפים הרקומביננטיים על ידי שימוש בסרום של פרה שחלתה במחלת הקדחת הקיקיונית בהשוואה לסרום מפרה נאיבית. כפי שניתן לראות בתמונה 7, סרום הפרה הגיב עם חלבון המטריקס של הנגיף בתאים המודבקים בנגיף רקומביננטי המבטא את חלבון המטריקס. לעומת זאת, למרות שקיים סיגנל בגודל המתאים לחלבון הגליקופרוטאין בתאים המודבקים בנגיף רקומביננטי המבטא את החלבון G, לא ניתן היה לוודא ביטוי זה מכיוון שבנד זהה בגודל מופיע גם בדוגמאות הביקורת. לכן, גם בניסוי זה לא ניתן לוודא את היכולת של הנגיף הרקומביננטי לבטא את חלבון הגליקופרוטאין של נגיף הקדחת הקיקיונית.

דוגמאות חלבון אלו גם נשלחו לאנליזת ספקטרומטר מסות לצורך זיהוי פפטידים השייכים לחלבוני נגיף ק"ק בתאים שהודבקו בנגיף הרקומביננטי. תוצאות האנליזה הראו ביטוי של החלבונים M, N ו-P. אך לא זוהו פפטידים השייכים לחלבון G בדוגמא המתאימה.

לאור התוצאות הללו הסקנו שהחלבונים M, N ו-P הוחדרו בהצלחה והביטוי שלהם יציב בתאים. לעומת זאת, לא ניתן להראות הצלחה של ביטוי החלבון G. ייתכן שהחלבון הוחדר לגנום הנגיף באופן שמונע ביטוי תקין שלו, אינו יציב באופן הביטוי הנוכחי, או שזיהוי החלבון מוגבל מכיוון שהחלבון נקשר למעטפת השומנית של התאים והנגיף.

הגברה של הנגיף בתאי עוף ליצירת טיטר גבוה להכנת תרכיבים לבדיקת אימונוגניות ובטיחות.

על מנת להזריק את הנגיפים הרקומביננטיים לעכברים לצורך הערכת התגובה החיסונית לחלבוני נגיף הק"ק ששיבטנו ויצירת חיסון בר קיימא לנגיף, ביצענו הגברה של כמות הנגיפים המבודדים בתרביות תאים של פיברובלסטים של עוף בצלחות גדולות. לאחר 10 ימים, קצרנו את התאים ומדיום הגידול וביצענו הערכה של טיטר הנגיפים שנוצר. בשלב הראשון הצלחנו להגיע לטיטר נוגדנים בסדר גודל של 10^4 נגיפים ב-1 מ"ל (סה"כ נאספו 10 מ"ל – 10^5 חלקיקים מדבקים) לכל נגיף. על פי עבודות קודמות, הערכנו שעל מנת להשרות תגובה חיסונית יעילה בשימוש בנגיפים אלו בעכברים, עלינו להגיע לכמות חלקיקי נגיף מדבקים של 10^7 - 10^5 לכל הזרקה. לכן ביצענו שינויים במערכת על מנת לייעל את יצירת הנגיפים הרקומביננטיים והגברתם בסדר גודל אחד לפחות. במקביל השתמשנו בנגיפים, שכבר יצרנו בטיטר נמוך, על מנת לבצע סטנדריזציה של ניקוי הנגיפים מחומרים אימונוגניים שמקורם בתאי ההגברה ולצורך ריכוז הנגיפים לנפחי הזרקה מתאימים. ניקוי הנגיפים בוצע באולטרה-צנטריפוגה על גבי כרית סוכרוז (37% ביחסי מסהנפח בופר). בשלב זה הערכנו אובדן של כ-25%-20 מהנגיפים שהוטענו. בנוסף, ביצענו הערכת שיטת ניקוי של הנגיפים על גבי גרדיאנט סוכרוז (20-40% ביחסי מסהנפח בופר) באולטרה-צנטריפוגה. בשיטה זו הערכנו אובדן של ~50% מהנגיפים שהוטענו. מכאן, הערכנו ששיטת הניקוי המועדפת היא על גבי כרית סוכרוז (37%) בה רמת הניקוי מספקת לצורך הזרקה לעכברים ואובדן מינימלי של חלקיקי נגיף מדבקים.

הערכת הטיטר הנדרש של נגיפים רקומביננטיים להשראת תגובה חיסונית.

לאחר הערכה של טיטר הנגיפים, ביצענו ניסוי ראשוני להערכת הטיטר הנדרש ליצירת תגובה חיסונית ולבטיחות החיסון. לצורך כך, הזרקנו בשלב הראשון חיסון מסחרי כנגד נגיף הקדחת הקיקיונית (Ultravac BEFV - (B) 286826), חיסון ביקורת (PBS) וחיסונים הכוללים 200,000 חלקיקים נגיפים לכל עכבר מחוסן מכל זן של נגיף שיצרנו לחלל הבטן (פירוט ההזרקות מופיע בטבלה 1). לאחר מתן החיסון העכברים נבדקו כל יום למשך 4 ימים לניטור דלקות באיזור ההזרקה, אי נוחות, אובדן תיאבון או עייפות. בשבוע השני, בוצע מעקב כל יומיים. שבועיים לאחר הזרקה החיסון, העכברים חוסנו במנה נוספת כבוסטר לחיסון בהתאמה לחיסון הראשון ונטרו באופן זהה. לאחר שבועיים נוספים, העכברים הוקרבו ודם נאסף לבדיקת טיטר הנוגדנים בסרום. בטבלה 2, ניתן לראות את תוצאות מבחני הנוטרליזציה שביצענו לנגיף זן הבר בנוכחות דוגמאות סרום מהעכברים המחוסנים ובהשוואה לסרום מפרה שפיתחה נוגדנים לאחר חשיפה לנגיף, וסרום מפרה ללא חשיפה. הנתונים שקיבלנו הראו שהחיסון בו השתמשנו לא גרם ליצירת נוגדנים מנטרלים כנגד הנגיף, בעוד החיסון המסחרי הראה תגובה אימונוגנית בעוצמה נמוכה.

לאור התוצאות האלו, החלטנו לבצע ניסוי נוסף בו הגדלנו את מספר החלקיקים המדבקים ל- 10^6 מכל זן למנת חיסון. בנוסף, ביצענו הדבקה של עכבר בזן נגיף החיסון המבטא את החלבון G של נגיף הקדחת הקיקיונית מצומד לתג קצר של 10 חומצות אמינו (GnRH) לביקורת יצירת נוגדנים ספציפיים, כפי שמפורט בטבלה 2. פרוטוקול החיסון בוצע בדומה לפרוטוקול בניסוי החיסון הראשון.

בסיום הניסוי נאסף סרום העכברים בדומה לניסוי הראשון. במבחן נוטרליזציה של הסרום כנגד הדבקה בנגיפי הקדחת הקיקיונית, נמצא שלא נוצרו נוגדנים מנטרלים בסרום העכברים המחוסנים.

לעומת זאת נמצאו נוגדנים מנטרלים כנגד נגיפי הווקסיניה המעידים על תגובה חיסונית של העכבר כנגד נגיפי החיסון. כמו-כן, בבדיקת ELISA של הסרום ליצירת נוגדנים כנגד חלבון התג GnRH המצומד לחלבון הגליקופרוטאין של נגיף הקדחת הקיקיונית נמצא שנוצרו נוגדנים ספציפיים כנגד התג. התוצאות מוצגות בטבלה 3.

תוצאות אלו מעידות שלמרות התגובה החיסונית לזן החיסון, לא נוצרו נוגדנים מנטרלים כנגד נגיף הקדחת הקיקיונית בעכברים המחוסנים.

דיון

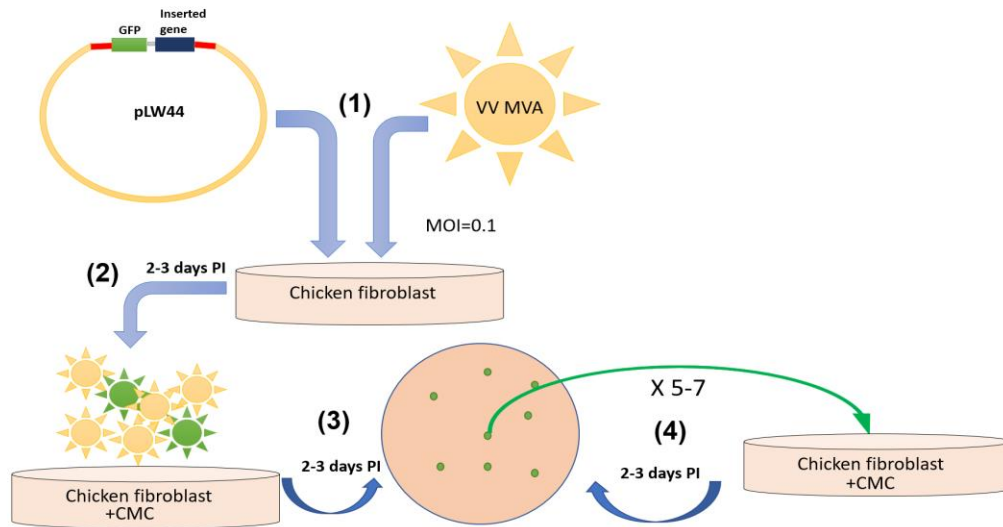
בעבודה זו פיתחנו שיטת חיסון חדשה כנגד נגיף הקדחת הקיקיונית המבוססת על ביטוי החלבונים האנטיגניים של נגיף ק"ק בוקטור ויראלי מסוג זן מוחלש של נגיף הווקסיניה - MVA. לפי הידע שקיים היום, מחלה קלינית מגנה בפני מחלה קלינית חוזרת, ולכן ניתן להסיק שתגובה חיסונית יעילה, אשר מונעת מחלה קלינית, הינה אפשרית – אולם אינה מושגת על ידי התרכיבים המקובלים היום כמו כן הניסיונות לחסן בנגיף מוחלש אינם צולחים מכיוון שהוא אינו מעורר תגובה מספקת. לכן בעבודה זו פנינו לאסטרטגיית חיסון משולבת המבוססת על תערובת הטרוגנית של נגיפי חיסון ווקסיניה, שכל אחד מהם מבטא חלבון סטרוקטורלי אחר – כולל חלבון ה-G, אך משיקולי בטיחות ללא הקומפלקס האנזימטי L. שיטות החדרת הגנים לחלבוני נגיף ק"ק ובידוד הזנים הרקומביננטיים הייחודיים מתואר בפרק התוצאות וניתן להסיק את הקשיים בפיתוח החלבון. לדוגמא, בדיקת ביטוי החלבונים בנגיף הרקומביננטי אינה ניתנת למדידה עד שלב מתקדם בתהליך הבידוד בו יש הומוגניות גבוהה של הנגיף הרקומביננטי. אתגר זה מעיב על היכולת לזהות כשלים בתהליך ההחדרה ושל ביטוי החלבונים מוקדם, ולכן גורם להארכת הזמן בין שלבי הפיתוח. למרות קושי זה, יצירת זנים רקומביננטיים המבטאים את החלבון נוקלאוקפסיד (N), החלבון מטריקס (M) והחלבון פוספופרוטאין (P) הצליחו על פי התכנון והוכחו הן מולקולארית והן ביוכימית לזיהוי החלבונים בתאים מודבקים בנגיף הרקומביננטי. לעומת זאת, בעבודה זו הראנו שהגן לחלבון G, שהוחדר לגנום בהצלחה על פי הבדיקות המולקולאריות שלנו כולל ריצוף המקטע הרלוונטי, לא הציג עדויות מהימנות לביטוי יציב ואמין של החלבון. החדרת החלבון מאוחה בביטוי לפפטיד GnRH (10 חומצות אמינו), הראה תוצאה מעודדת של ביטוי חלבון המגיב לתג בבדיקת ווסטרן בלוט בגודל קרוב לגודל המצופה (70-75kDa לעומת כ-85kDa). לאור תוצאות אלו החלטנו להמשיך בניסויי הבטיחות האמינוגניות ובמקביל לבודד זנים נוספים של נגיף רקומביננטי המבטאים את החלבון G. ניסויי האיימונוגניות הראו כי קיימת תגובה לנגיפי החיסון. על פי בדיקת האלייזה (ELISA) כנגד התג GnRH, זיהינו יצירת נוגדנים ספציפיים. למרות זאת, לא נוצרו נוגדנים מנטרלים כנגד נגיפי קדחת קיקיונית בניסויי נוטרואליזציה בתרביות תאים, גם כאשר ביצענו ניסויים המשלבים הזרקה של כל החלבונים המיבניים יחדיו לאותו עכבר. לעומת זאת, סרום מנטרל נוצר בהזרקה של חיסון זן מוחלש של נגיפי ק"ק אוסטרלי. הסיבה העיקרית המשוערת לתוצאה זו היא פגיעה בביטוי החלבון G בוקטור הנגיפי. פגיעה בביטוי עלולה לנבוע משיבוט הגן בצורה לקויה או מחוץ למסגרת הקריאה של החלבון

או מאי-יציבות של ביטוי החלבון במסגרת הוקטור הנגיפי. לכן, במסגרת השנה האחרונה לפרויקט, המשכנו לבצע בידודים של נגיפים רקומביננטיים המבטאים את החלבון G וביצענו עד כה ניסויי אימות להצלחת בידוד הזנים. אנו מקווים שבדיקת מספר זנים מבודדים במקביל, תצביע על לפחות זן אחד בעל ביטוי תקין שנוכל לאמת של החלבון G.

בעבר פורסם כי חלבוני M וגם חלבוני N מביאים ליצירת נוגדנים, אולם אלו לבדם אינם מספיקים לניטרול הנגיף (Cybinski et al., 1990). כמו כן, ידוע שחלבון ה-N גורם לתגובה חיסונית של תאי T, אשר מובילה לזיכרון חיסוני ארוך יותר – אולם שוב, בפני עצמה אינה מספיקה להקניית הגנה. בנוסף, חיסון כנגד החלבון G בלבד משרה, כנראה, תגובה הומורלית ויצירת נוגדנים אך אינו מספק הגנה מלאה. לכן, ייתכן והעכברים אליהם הזרקנו את כל הזנים הרקומביננטיים המבטאים את החלבונים M, N, P פיתחו מידה מסוימת של תגובה תאית, אך זן הנגיף המבטא את החלבון G לא השלים את מערכת התגובה החיסונית ההומורלית, ולכן לא נוצרו נוגדנים מנטרלים. בפרויקט זה לא בדקנו היווצרות של תגובה חיסונית של הזרוע התאית ולא אתגרנו את העכברים בהדבקה בנגיף ולכן לא ניתן להעריך את מידת החיסוניות שהעכברים פיתחו לנגיף.

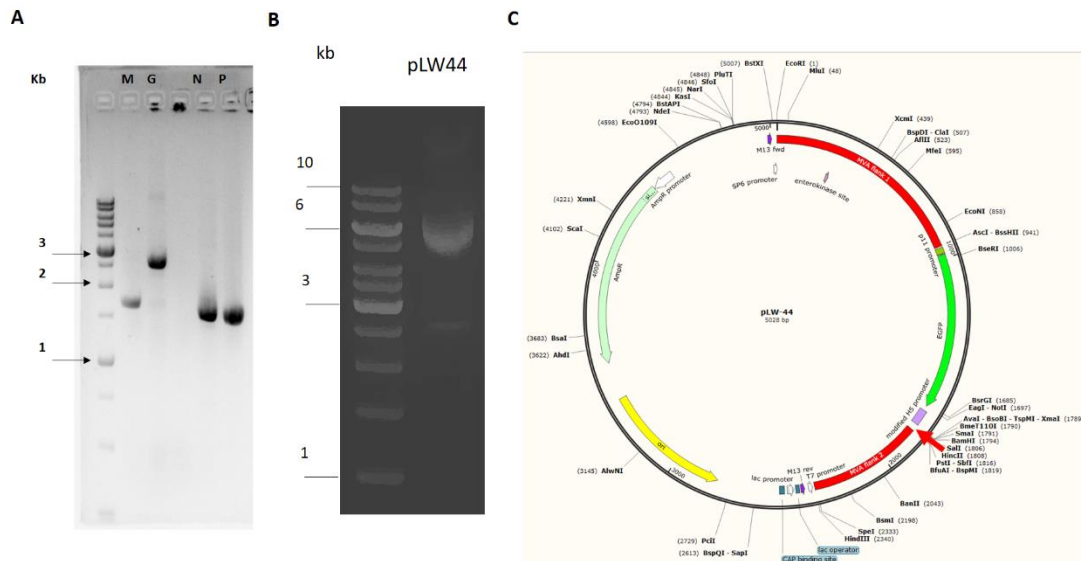
לסיכום, נראה שמסגרת חיסון בשימוש נגיפי MVA המבטאים חלבוני נגיף ק"ק הינה בעלת פוטנציאל להשראת חיסון לנגיף ק"ק. וקטור זה משרה תגובה חיסונית אפקטיבית כנגד חלבונים זרים שהוא נושא בגוף בעל החיים המחוּסן. לצערנו, נראה ששיבוט החלבון האנטיגני העיקרי, G, לוקטור הנגיפי לא אומת בצורה משביעה רצון וייתכן שאינו מבוטא בצורתו המלאה או התקינה במסגרת הנגיפים הרקומביננטיים. מכאן שנדרש לבצע סידרה חדשה של ניסויי חיסוניות עם זנים מבודדים חדשים המכילים את הגן לחלבון G בשילוב הגנים לחלבונים המבניים האחרים על מנת להשרות תגובה אפקטיבית. בכל מקרה, גם בהזרקה של טיטר נגיפי גבוה, לא זיהינו בעיות בטיחות או תגובות אימונולוגיות חריגות במודל העכברי.

תמונה 1



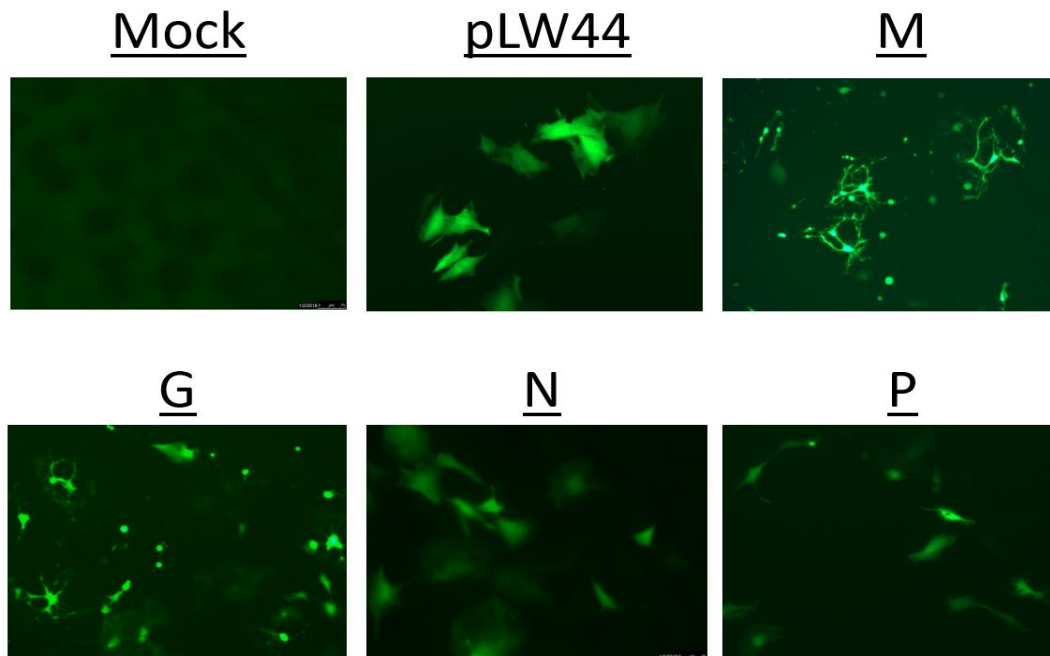
Overview of the generation and isolation of recombinant MVA strain. (1) CEF cell were infected with wild type VV-MVA followed by transfection of pLW44 plasmid including the inserted gene of interest. (2) 2-3 day post infection, the growth medium and cells were collected and used to infect fresh CEF cells. (3) After 48-72 hours, green fluorescence viral plaques were collected separately and transferred to fresh CEF cells after disruption of the cells. (4) This process was repeated 5-7 times until homogenous recombinant virus was observed.

תמונה 2



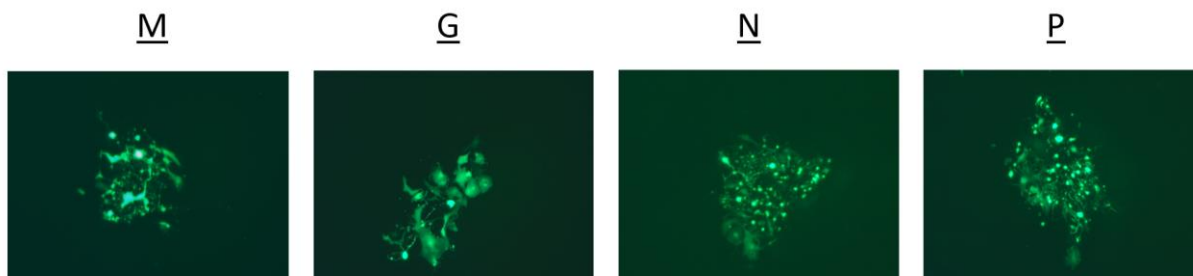
BEF genes – M, G, N and P were amplified from BEF RNA (isolated from BEF infected VERO cells), cloned in to a MSG234 plasmid and confirmed by sequencing. The figure represents PCR products of the relevant genes. B. pLW44 was purified using DNAeasy mini-plasmid purification kit from *E. coli* culture. The plasmid size was confirmed and sequenced. C. A map of the plasmid pLW44 with its main features. The multi-cloning site (marked by red arrow) located downstream to H5 promoter was used to insert the BEF genes.

תמונה 3



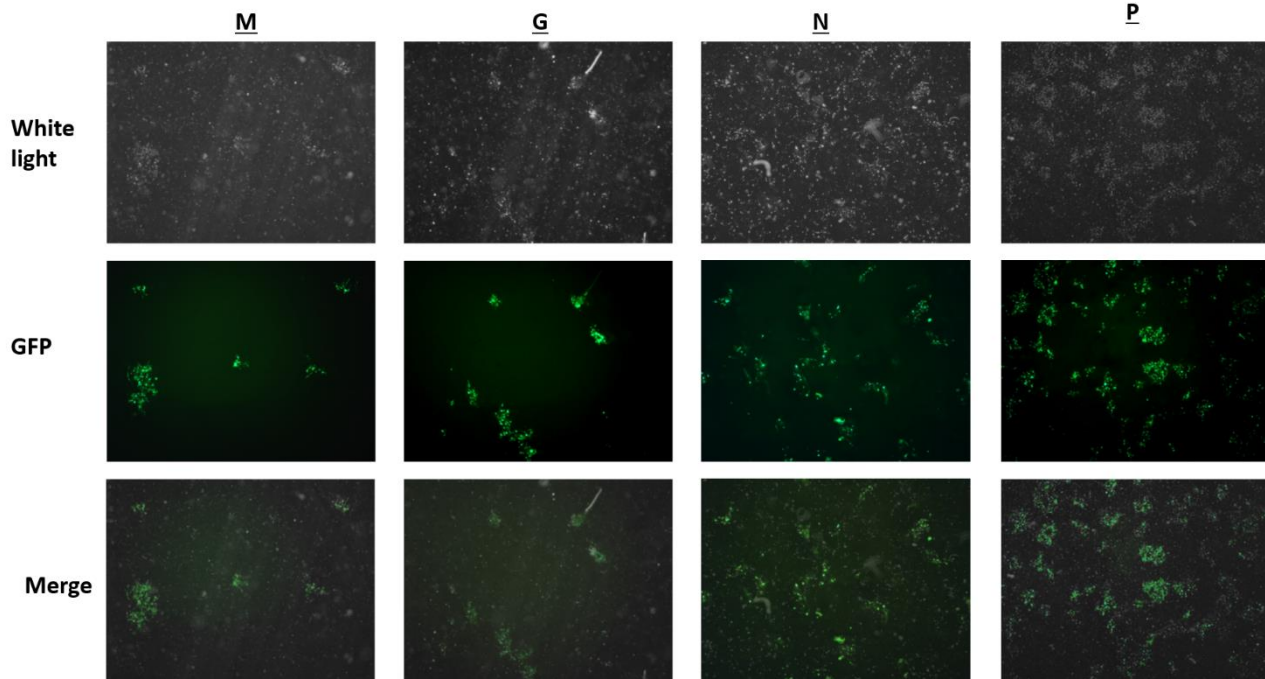
Chicken Fibroblasts cells (SL-29) were infected with MVA virus in MOI of 0.1. After 1hour, the virus was removed, and the cells were introduced to transfection agent (FUGene6) medium mixed with pLW44 plasmid cloned with the BEF genes (G, N, P, M) inserted downstream to GFP, both under vaccinia virus promoter. Mock- uninfected cells with pLW44 plasmid. pLW44 – represent the plasmid with no BEF gene.

תמונה 4

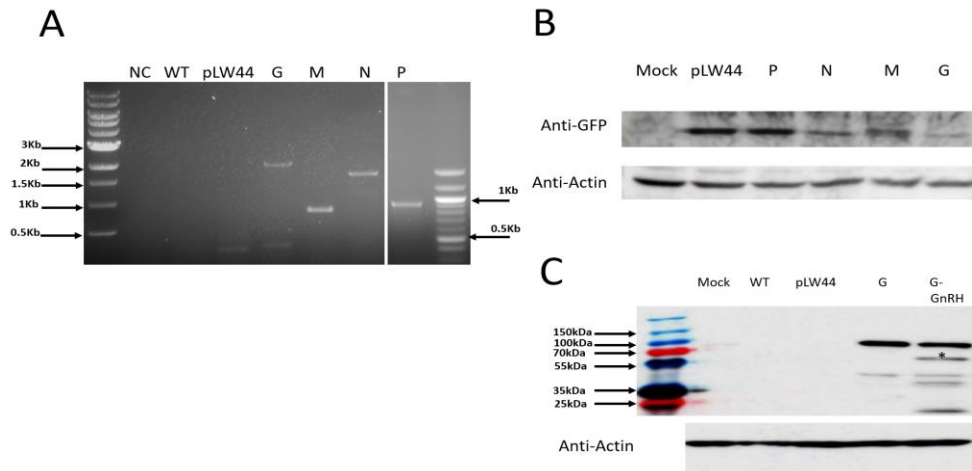


Chicken fibroblasts cells were infected with supernatant medium that was collected from cells induced to recombination of BEF genes with MVA (picture 2). The cells were covered with semi-fluid medium for plaque formation originated from one recombinant virus particle (A). Each collected plaque was introduced to naïve cells covered with semi-fluid medium for formation of new plaques which were collected again for further transfer and isolation.

תמונה 5

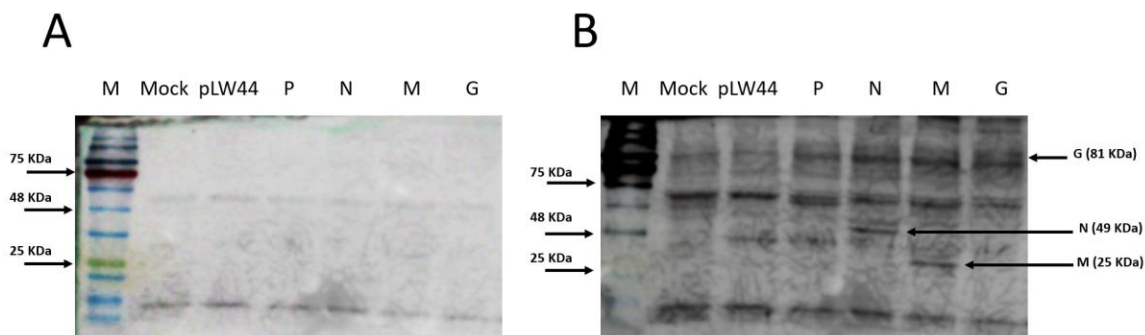


Chicken fibroblasts cells were infected with recombinant MVA collocated from plaques formed after 7-8 transfers. Each recombinant MVA strain expresses BEFV protein as marked on top of each column. An estimation of the purity levels of the recombinant MVA was conducted by the ratio between GFP expressing plaques to non-GFP plaques. The cells were pictured under white light under X50 magnification (upper row) and under dark-field with GFP excitation light (nm) (middle row). The pictures were overlay to emphasize the dominantly of the GFP expressing plaques (lower row).



Estimating success of insertion of BEFV genes into MVA genome. (A) DNA was extracted from WT MVA and from each sample of recombinant virus: pLW44 (only the GFP insert), M, G and N. The DNA was taken to PCR analysis to confirm the insertion of each BEF gene. Next, PCR products were sent to sanger sequencing to reconfirm that the sequences were inserted properly to the MVA genome. NC- Negative control. (B) Chicken fibroblasts were infected without (Mock) or with clean homogenized stock of each recombinant strain (pLW44, M, G and N) in high MOI (~1). After 2 days, the cells were harvested and centrifuged in high speed. Next, the pellets were incubated with Lemmlie buffer and loaded on SDS-PAGE for Western-blot analysis using antibodies against GFP (MW=27KDa - upper panel) and Actin (MW=42KDa - lower panel). (C) Chicken fibroblasts were infected with MVA-WT or with clean homogenized stock of each recombinant strain (pLW44, G or G-GnRH) in high MOI (~1). After 2 days, the cells were harvested and centrifuged in high speed. Next, the pellets were incubated with Lemmlie buffer and loaded on SDS-PAGE for Western-blot analysis using antibodies against GnRH (MW=5KDa (85kDa for G-GnRH) - upper panel) and Actin (MW=42KDa - lower panel). A unique band estimated to be G-GnRH was recognized in the ~75kDa size ladder (marked with asterisk).

תמונה 7



Estimating success of insertion of BEFV genes into MVA genome using serum of BEFV infected cow. Chicken fibroblasts were infected with MVA-WT or with clean homogenized stock of each recombinant strain (pLW44, N, P, M and G) in high MOI (~1). After 2 days, the cells were harvested and centrifuged in high speed. Next, the pellets were incubated with Lemmlie buffer and loaded on SDS-PAGE for Western-blot analysis using serum extracted from control uninfected cow (A) and from BEFV infected cow (outbreak 2005) (B). expected size of protein bands: N (49kDa) M (25kDa), P (32kDa) and G (81kDa).

טבלה 1 : תוצאות ניסוי נוטראליזציה של נגיף הקדחת הקיקונית בנוכחות סרום עכברים מחוסנים I-

Mouse	Neutralization titer
Mock I	-
Mock II	-
Ultravac I	1:8
Ultravac II	1:16
Ultravac III	1:8
MVA -G I	-
MVA -G II	-
MVA -G III	-
MVA G+N I	-
MVA G+N II	-
MVA G+N+M I	-
MVA G+N+M II	-
Bovine NC	-
Bovine PC	1:64

טבלה 2 : תוצאות ניסוי נוטרליזציה של נגיף הקדחת הקיקונית בנוכחות סרום עכברים מחוסנים II-

Mouse	Neutralization titer
Mock I	-
Mock II	-
Ultravac I	1:8
Ultravac II	1:16
MVA -G I	-
MVA -G II	-
MVA -G-GnRH	-
MVA G+N_M+P I	-
MVA G+N+M+P II	-
MVA G(2)+N+M+P I	-
MVA G(2)+N+M+P II	-
Bovine NC	-
Bovine PC	1:32

טבלה 3 : תוצאות ניסוי ELISA ליצרית נוגדנים כנגד GnRH בסרום עכברים מחוסנים II-

Sample	ABS (450nm)	Calculated Ab titer
Mock I	0.0295	0.18457265
Mock II	0.0101	0.06319267
G[BEF] - I	0.1906	1.19252702
Ultravac I	0.034	0.2127278
Ultravac II	0.0579	0.36226293
MVA -G I	0.0195	0.12200565
MVA -G II	0.0952	0.59563784
MVA G+N_M+P I	0.1358	0.84965986
MVA G+N+M+P II	0.0111	0.06944937
MVA -G-GnRH	2.3072	14.43545824

מקורות

- Afolabi, M.O., Tiono, A.B., Adetifa, U.J., Yaro, J.B., Drammeh, A., Nebie, I., Bliss, C., Hodgson, S.H., Anagnostou, N.A., Sanou, G.S., Jagne, Y.J., Ouedraogo, O., Tamara, C., Ouedraogo, N., Ouedraogo, M., Njie-Jobe, J., Diarra, A., Duncan, C.J., Cortese, R., Nicosia, A., Roberts, R., Viebig, N.K., Leroy, O., Lawrie, A.M., Flanagan, K.L., Kampman, B., Bejon, P., Imoukhuede, E.B., Ewer, K.J., Hill, A.V., Bojang, K., Sirima, S.B., 2016. Safety and Immunogenicity of ChAd63 and MVA ME-TRAP in West African Children and Infants. *Mol Ther* 24, 1470-1477.
- Aziz-Boaron, O., Gleser, D., Yadin, H., Gelman, B., Kedmi, M., Galon, N., Klement, E., 2014. The protective effectiveness of an inactivated bovine ephemeral fever virus vaccine. *Veterinary microbiology* 173, 1-8.
- Aziz-Boaron, O., Leibovitz, K., Gelman, B., Kedmi, M., Klement, E., 2013. Safety, immunogenicity and duration of immunity elicited by an inactivated bovine ephemeral fever vaccine. *PloS one* 8, e82217.
- Bakari, M., Munseri, P., Francis, J., Aris, E., Moshiro, C., Siyame, D., Janabi, M., Ngatoluwa, M., Aboud, S., Lyamuya, E., Sandstrom, E., Mhalu, F., 2013. Experiences on recruitment and retention of volunteers in the first HIV vaccine trial in Dar es Salam, Tanzania - the phase I/II HIVIS 03 trial. *BMC Public Health* 13, 1149.
- Cybinski, D.H., Walker, P.J., Byrne, K.A., Zakrzewski, H., 1990. Mapping of antigenic sites on the bovine ephemeral fever virus glycoprotein using monoclonal antibodies. *The Journal of general virology* 71 (Pt 9), 2065-2072.
- Hebben, M., Duquesne, V., Cronier, J., Rossi, B., Aubert, A., 2004. Modified vaccinia virus Ankara as a vaccine against feline coronavirus: immunogenicity and efficacy. *J Feline Med Surg* 6, 111-118.
- Hertig, C., Pye, A.D., Hyatt, A.D., Davis, S.S., McWilliam, S.M., Heine, H.G., Walker, P.J., Boyle, D.B., 1996. Vaccinia virus-expressed bovine ephemeral fever virus G but not G(NS) glycoprotein induces neutralizing antibodies and protects against experimental infection. *The Journal of general virology* 77 (Pt 4), 631-640.
- Milligan, I.D., Gibani, M.M., Sewell, R., Clutterbuck, E.A., Campbell, D., Plested, E., Nuthall, E., Voysey, M., Silva-Reyes, L., McElrath, M.J., De Rosa, S.C., Frahm, N., Cohen, K.W., Shukarev, G., Orzabal, N., van Duijnhoven, W., Truyers, C., Bachmayer, N., Splinter, D., Samy, N., Pau, M.G., Schuitemaker, H., Luhn, K., Callendret, B., Van Hoof, J., Douoguih, M., Ewer, K., Angus, B., Pollard, A.J., Snape, M.D., 2016. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and

- Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 315, 1610-1623.
- Rosen, S., 1931. Ephemeral fever (three days' fever) of cattle in Palestine. *Vet J* 87, 244-246.
- Vanselow, B.A., Walthall, J.C., Abetz, I., 1995. Field trials of ephemeral fever vaccines. *Veterinary microbiology* 46, 117-130.
- Volz, A., Sutter, G., 2013. Protective efficacy of Modified Vaccinia virus Ankara in preclinical studies. *Vaccine* 31, 4235-4240.
- Walker, P.J., Klement, E., 2015. Epidemiology and control of bovine ephemeral fever. *Vet Res* 46, 124.
- Wallace, D.B., Viljoen, G.J., 2005. Immune responses to recombinants of the South African vaccine strain of lumpy skin disease virus generated by using thymidine kinase gene insertion. *Vaccine* 23.3061-3067 ,