

## חקר התגובה החיסונית המנטרלת כנגד נגיף ה-Bovine coronavirus (BCoV) ככלי לפיתוח של חיסון משופר

חוקר ראשי – דר' נתנאל צארם, המכון למדעי החיים, הפקולטה למתמטיקה ומדעי הטבע, האוניברסיטה העברית  
חוקרים נוספים – דר' אסף סול, המחלקה הוירולוגית, המכון הוטרנרי ע"ש קימרון  
דר' שני שיניין, רפואת העדר, החקלאית

### תקציר

נגיף הקורונה בבקר (Bovine coronavirus (BCoV), הינו נגיף מסוג RNA הגורם למחלות נשימתיות ומחלות מעיים בבקר ובמעלי גרה שונים ולהפסדים כלכליים משמעותיים לתעשיית החלב והבקר. חיסונים מסחריים שונים פותחו ברחבי העולם ונעשה בהם שימוש כדי להפחית את ההפסדים הללו ולשפר את רווחת בעלי החיים. בישראל, למרות שאין חובה לחסן בקר כנגד BCoV, מומלץ לחסן פרות לפני ההמלטה כדי להעניק חסינות לעגלים דרך הקולוסטרון. יש לציין שלמרות תוכניות החיסונים השגרתיות המיושמות במספר רפתות, מחקרי שטח עדכניים הצביעו על כך שפרות ועגלים בוגרים רבים בחוות אלו ממשיכים לסבול מזיהומי BCoV. בשל ממצאים אלה, שיערנו כי זני ה-BCoV המדביקים בעלי חיים אלו שונים גנטית מזני החיסון ולכן הבקר המחוסן אינו מוגן מפני זיהומי BCoV. כדי לחקור השערה זו ערכנו חקירה אפידמיולוגית מולקולרית רחבת היקף של BCoV במספר רפתות גדולות ברחבי ישראל. תוצאות החקירה הראו נוכחות של זנים שונים של BCoV שנפוצים בישראל, אשר שונים גנטית מזני החיסון המקובלים כגון זן ה-Mebus. כדי לבחון את היעילות של חיסוני BCoV הקיימים כיום בהגנה על הבקר מפני הזנים הנפוצים כיום בישראל חיסנו למעלה מ-60 פרות לפני ההמלטה בשלושה חיסונים מסחריים שונים, תוך מתן שתי מנות חיסון לכל פרה. אספנו מטושים (אף ופי הטבעת), קולוסטרון וסרום בזמנים שונים כדי להעריך את רמת החסינות של הפרות הממליטות. בדיקות RT-qPCR של המטושים הצביעו על כך שחלק מהפרות המחוסנות היו חיוביות ל-BCoV לפני ואחרי החיסון. מדידה של סך רמות הנוגדנים המנטרלים בכמה מדגימות הסרום והקולוסטרון לא גילתה עלייה בתגובת Ab הספציפית ל-BCoV לאחר חיסון. ניסויים מבניים ראשוניים באמצעות מיקרוסקופית אלקטרונית הראו שהמבנה של חלבון המעטפת Spike של הנגיף הישראלי IRS2182 דומה למבנה הקנוני של חלבוני ה-Spike של נגיפי הקורונה. מחקר זה מהווה את הבסיס להבנה עמוקה יותר של התגובה החיסונית כנגד נגיף ה-BCoV ולבדיקת היעילות של החיסונים המסחריים הקיימים כיום וכן לאפיון מבני של אפיטופי הנטרול לצורך פיתוח עתידי של חיסון יעיל יותר כנגד הנגיף.

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

### רקע מדעי

לחקר מחלות זיהומיות של חיות משק ישנה חשיבות עליונה לצורך שמירה על רווחתן של חיות המשק ומניעת נזקים כלכליים. הבנת התגובה החיסונית כנגד גורם המחלה יכולה לסייע רבות לצורך פיתוח של תרופות ו/או חיסונים מניעתיים ובכך לשפר את רווחת חיות המשק ולמזער את הנזק הכלכלי של החקלאי.

נגיף הקורונה בבקר (Bovine coronavirus (BCoV), הינו נגיף מעטפת (envelope virus) מסוג RNA ממשפחת ה Coronaviridae, הכוללת גם את נגיפי ה SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 (1). נגיפים השייכים למשפחה זאת ידועים בתדירות גבוהה של מוטציות המתרחשות בשלב ההכפלה של הגנום הנגיפי, תופעה התורמת ליכולת של הנגיף לעבור התאמה מהירה להדבקה של מאכסנים חדשים (1). כמו כן, ריבוי המוטציות מקשה על מערכת החיסון הנרכשת ביצירת של תגובה חיסונית אפקטיבית כנגד הנגיף.

נגיף הקורונה בבקר גורם למחלות נשימתיות ומחלות מעיים בבקר ובמעלי גרה שונים אשר גורמות להפסדים כלכליים משמעותיים למשק הבקר (2). הנגיף קשור למספר תסמונות קליניות מובהקות: (1) Winter dysentery (WD) המאופיינת בשלשול דמי בבקר בוגר וירידה חדה ומובהקת בתפוקת החלב של פרות חולבות (3). (2) calf diarrhea (CD) הפוגעת בעגלים בשבועות הראשונים של חייהם ומאופיינת בשלשול חמור, לעיתים דמי, ובמקרים רבים אף לתמותה (3). (3) זיהומים בדרכי הנשימה בבקר בגילאים שונים, היכולים לגרום לירידה בתפוקת החלב ולתמותה ניכרת (כחלק מ bovine respiratory disease complex (BRDC) (4).

ישנם מספר חיסונים מסחריים כנגד נגיף הקורונה בבקר המבוססים על שימוש בנגיף חי מהונדס או נגיף מומת (modified live or inactivated vaccines) המכילים ברוב המקרים אחד משני זנים, זן ה- Mebus (הזן הראשון שבודד לפני כחמישים שנה (5)) או זן C-197. נכון להיום, בישראל, כמו ברוב המוחלט של מדינות העולם, אין חובת חיסון כנגד נגיף הקורונה בבקר אלא המלצה לחסן פרות לפני המלטה על מנת לספק הגנה לוולד דרך הקולוסטרום. העדר חובת החיסון מותירה את משק הבקר חשוף בפני התפרצויות של נגיף הקורונה בבקר. עדות לכך ניתן למצוא במספר רב של התפרצויות של הנגיף במשקי בקר שונים בארץ (כ 250 מקרים שונים בין השנים 2017-2021, כולל ההתפרצות החמורה במשק ניר יצחק בשנת 2017) אשר גרמו נזקים כלכליים חמורים לחקלאים (6).

על אף שחיסונים מסחריים קיימים כבר שנים רבות, ישנו מחסור משמעותי בנתונים לגבי יעילות החיסונים ביצירת הגנה חיסונית (protective immunity) לאורך זמן כנגד CD ו WD וכן לגבי היכולת של חיסון פרות לפני המלטה לספק הגנה חיסונית יעילה לעגלים. מחקרים אף הראו שחיסונים אלו אינם יכולים ליצור הגנה חיסונית ארוכת טווח כנגד מחלות ה-BRDC (7). בעיה נוספת עם החיסונים הקיימים כיום נובעת מהעובדה שהחיסונים הנהוגים כיום מבוססים על נגיפים שבודדו לפני עשרות שנים. בהינתן השונות הגנטית הגבוהה של נגיפי הקורונה (7), המקנה לנגיף יכולת לחמוק ממערכת החיסון הנרכשת (viral escape), ישנה אי ודאות לגבי יעילות החיסונים כנגד זני הנגיף המדבקים כיום את אוכלוסיית הבקר.

בשנים האחרונה, חוקרי המכון הווטרינרי בראשות ד"ר אסף סול ערכו סקר נרחב במשקי בקר שונים בארץ במטרה לאפיין את זני הנגיף הנפוצים בישראל. בסקר זה בודדו עשרות נגיפים חדשים ממשקים שונים ברחבי ישראל (6). נגיפים אלו בודדו מפרות חולבות אשר הראו סימנים קליניים ברורים. נגיפים אלו עברו אפיון מולקולרי המבוסס על רצף חלבון ה-Spike (S) וניתוח פילוגנטי לקביעת השונות הגנטית בתוך הזנים המקומיים ובין זנים אלו לזן התרכיב Mebus. תוצאות הסקר הראו כי קיימים מספר ואריינטים גנטיים

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

לנגיף הקורונה בבקר במשק המקומי וכי ישנה שונות גנטית בין הזנים הנפוצים כיום בארץ לבין זני התרכיב. ממצאים אלו מחזקים את השאלה לגבי היעילות של החיסונים הנהוגים כיום בישראל לצורך יצירה של הגנה חיסונית יעילה.

### מטרות המחקר

**מטרת הצעת מחקר זו הינה לחקור את התגובה החיסונית ההומורלית הנרכשת (Humoral immunity) בכלל, והתגובה החיסונית המנטרלת (antibody neutralization response) בפרט כנגד נגיף הקורונה בבקר נגוע ובבקר מחוסן.**

השערת העבודה שלנו היא שהבנה עמוקה של תגובת נטרול הנוגדנים נגד BCoV בבקר נגוע באופן טבעי לעומת בקר מחוסן ואפיון ברזולוציה גבוהה של אפיטופי נטרול בחלבוני מעטפת של BCoV ישמשו פלטפורמה לתכנון מבוסס מבנה של חיסון מניעתי משופר ובכך יתרמו לשיפור רווחת חיות המשק ולמזעור הנזק הכלכלי של החקלאי.

אנו נבחן את ההשערה שלנו ונשיג את המטרות של הצעה זו באמצעות המטרות הבאות:

**מטרה 1:** אפיון ובידוד של זני BCoV מקומיים הגורמים לתסמונות קליניות שונות בחוות בקר ברחבי ישראל.

**מטרה 2:** חקר החסינות ההומורלית הנרכשת נגד BCoV בבקר.

**מטרה 3:** אפיון ביוכימי ומבני של אפיטופי נטרול בחלבוני המעטפת הנגיפיים אשר מזוהים על ידי נוגדנים מנטרלים (neutralizing antibodies (nAbs)).

### תוצאות

**מטרה 1:** אפיון ובידוד של זני BCoV מקומיים הגורמים לתסמונות קליניות שונות בחוות בקר ברחבי ישראל.

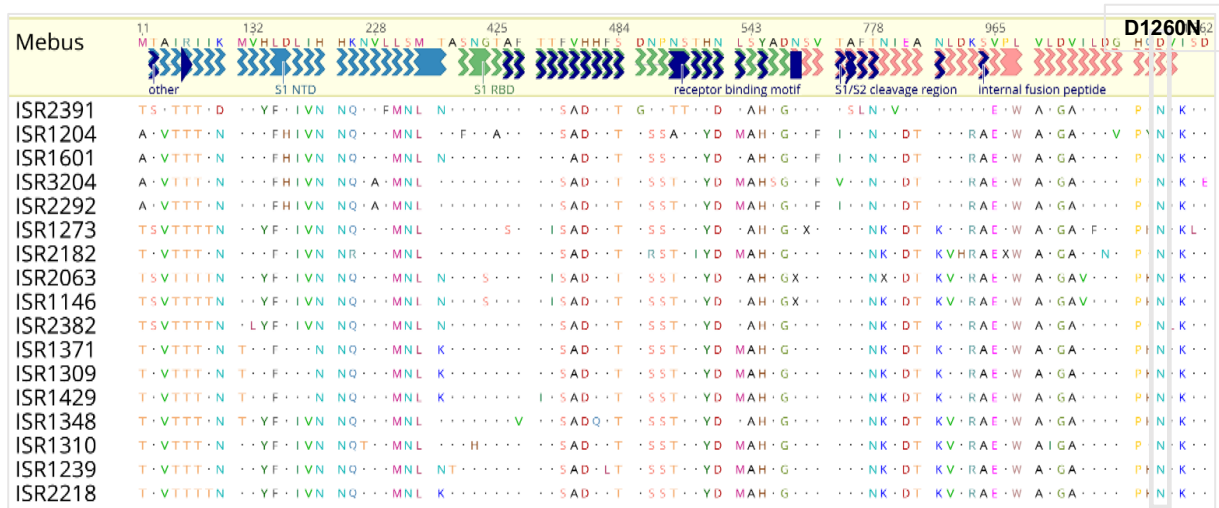
#### מטרה 1.1: אפיון זנים מקומיים BCoV.

כדי לאפיין את זני BCoV אשר קיימים כיום בישראל, הגברנו וריצפנו את הגן המלא של חלבון ה Spike (S) מ-18 דגימות קליניות, אשר אושרו כחיוביות ל-BCoV על ידי RT-qPCR. דגימות אלו התקבלו בין השנים 2017-2022 מפרות בוגרות חולות ומתות ועגלים הסובלים מ WD, שלשול עגלים (calf diarrhea) וזיהומי ריאות (pneumoenetric infections) מ-15 חוות בקר הפזורות ברחבי ישראל (טבלה 1). השוואה של רצפי חומצות האמינו של זני BCoV מקומיים עם זן ה Mebus גילתה החלפות ב-87 חומצות אמינו בחלבון S (איור 1). החלפה בודדת של חומצת אמינו בעמדה 1260 (חומצה אספרטית לאספרגין, D1260N) יוצרת אתר גליקוזילציה פוטנציאלי בכל הבידודים הישראליים.

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

Farm	Sample	Site of collection/Source	Collection year	Clinical syndrome	Location	Animal status
1	ISR2218	Rectal Swab	2020	Winter dysentery	Central	Alive
2	ISR2391	Rectal Swab	2017	Winter dysentery	South	Alive
3	ISR2382	Rectal Swab	2018	Winter dysentery	South	Alive
4	ISR1348	Rectal Swab	2019	Winter dysentery	North	Alive
	ISR2292	Rectal Swab	2020	Winter dysentery	South	Alive
5	ISR3204	Rectal Swab	2021	Calf diarrhea	South	Alive
6	ISR1601	Rectal Swab	2018	Winter dysentery	South	Alive
7	ISR1310	Rectal Swab	2022	Winter dysentery	Central-S	Alive
8	ISR1309	Rectal Swab	2022	Pneumonoenteric	Central-N	Alive
9	ISR1239	Tissues	2022	Calf diarrhea	North	Dead
10	ISR2182	Rectal Swab	2020	Winter dysentery	East	Alive
11	ISR1146	Rectal Swab	2021	Winter dysentery	Central-N	Alive
12	ISR2063	Lung	2021	Respiratory	North-E	Dead
	ISR1429	Tissues	2022	Pneumonoenteric	North	Dead
	ISR1371	Rectal Swab	2022	Calf diarrhea	North	Alive
13	ISR1273	Tissues	2022	Pneumonoenteric	North	Dead
14	ISR1204	Tissues	2022	Pneumonoenteric	North-E	Dead
15	ISR1262	Rectal Swab	2021	Winter dysentery	South	Alive

**Table 1.** Local bovine coronavirus strains isolated from animals suffering from different clinical syndromes detected on major farms in Israel between 2017 and 2022

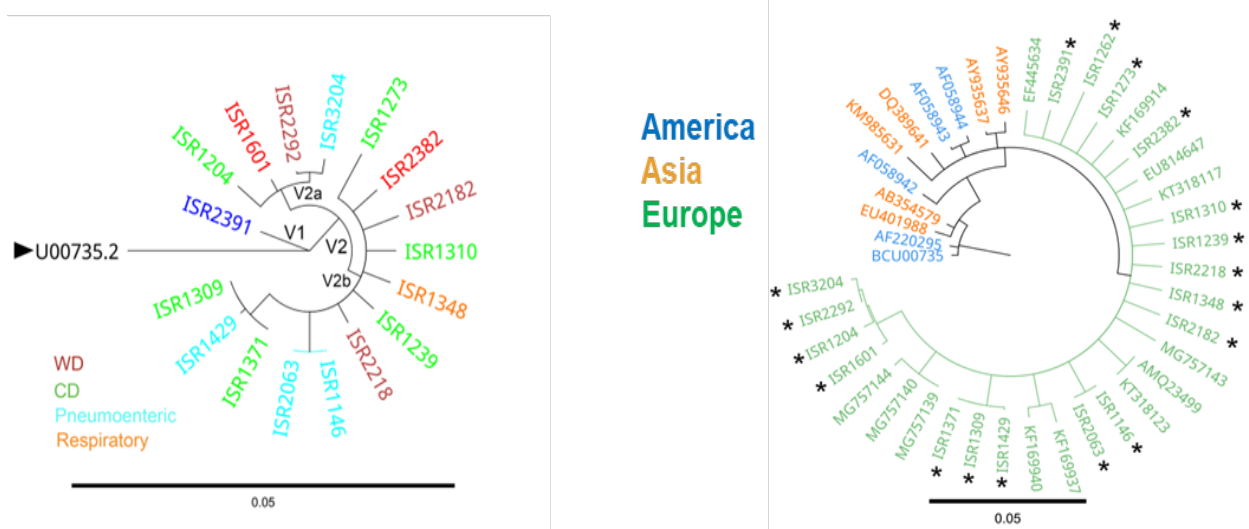


**Figure 1.** Compares the deduced amino acid sequences of the full spike glycoprotein of the local Bovine coronavirus (BCoV) isolates. The sequences were aligned using the Geneious protein alignment tool and included only different amino acids in at least one isolate.

ניתוח פילוגנטי המבוסס על רצפי חומצות האמינו הראה כי כל הזנים הישראליים שונים מזן הייחוס, זן ה-Mebus, וזנים אחרים מאמריקה ואסיה, אך הם דומים לרצפים שבודדו באירופה (איור 2). יש לציין כי ניתוח ריצפי של כל חלבוני BCoV Spike במאגרי הנתונים הצביע על כך שהתחלופה של D1260N מבדילה בין הזנים האמריקאים והאסיאתיים לבין הזנים האירופיים.

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

ניתוח התוצאות מראה כי הזן הנשימתי ISR2063 שבודד מריאות של עגל מת באזור צפון-מזרח ישראל ב-2021 היה זהה לזן ISR1146 שבודד ממטוש שלקח מפי הטבעת של בעל חיים נגוע בדיזנטריה במרכז הארץ באותה השנה (איור 2 וטבלה 1). בנוסף, שני זני BCoV שבודדו משלשול של עגל ועגל שסבל מתסמונת ריאות באותה החווה, ISR1371 ו ISR1429 (חווה מס' 13, טבלה 1) התקבצו בצורה ברורה יותר מרצפים אחרים בתת-קבוצה זאת. תוצאות אלו מצביעות על כך שתסמונת קלינית שונות של BCoV נגרמות על ידי אותם נגיפים ומאששים את ההשערה המוקדמת שלנו שזני BCoV מתקבצים על סמך מיקום ושנת הבידוד אך לא סוג המחלה (8). כדי לאמת את החלוקה לקבוצות של זני ה BCoV המקומיים, ביצענו ניתוח פילוגנטי עצמאי המבוסס על רצפים מלאים של גן ה HE של למעלה מ-20 זני BCoV מקומיים. בדומה לניתוח של הרצפים של חלבון ה S, זני ה BCoV המקומיים שלנו התקבצו ללא קשר לתסמונת הקלינית.



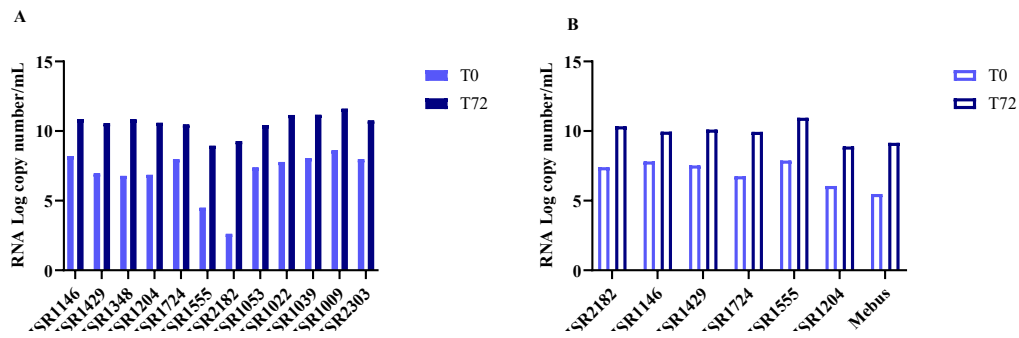
**Figure 2. Phylogenetic tree and amino acid sequence alignment of HE gene of local BCoV strains.** (A) The phylogenetic tree was generated based on varying HE protein amino acid sequences using the neighbor-joining method with 1000 replicates in Geneious prime alignment software. (B) deduced sequences of partial HE protein of local BCoV strains aligned to the Mebus reference sequence.

### מטרה 1.2: בידוד ושיכפול של זני BCoV מקומיים בתרבויות תאים.

בידוד של זני שדה של BCoV בתרבויות תאים נחוץ לביצוע מחקרים ביוכימיים ותפקודיים כגון מבחני קישור וניטרול. לאחר הגילוי המקרי של BCoV בשנת 1972 (9), הנגיף בודד לראשונה בתאי כליות של עוברי בקר (10). עם זאת, בשל פוטנציאל הגדילה המוגבל וזמן התפשטות ארוך יותר של תאים ראשוניים, היה הכרחי לפתח ולנצל שורות תאים מעבדתיים שיכולות לתמוך בבידוד ושכפול יעיל של נגיפי BCoV. לשם כך, נעשו ניסיונות ברחבי העולם לבודד ולגדל BCoV בשורות תאים מותמרים שונים (7, 11). למרות שרוב זני השדה של BCoV אינם גדלים בצורה טובה בתרבות תאים (12), הוכח שאת חלק מהזנים, למשל את זן ה Mebus, ניתן לבודד בתאי סרטן פי הטבעת אנושיים (human rectal tumor clone-18G (HRT-18G)). במחקר זה, ניסינו לבודד בתרבויות תאים כ-23 זני שדה מקומיים של BCoV בתאי HRT-18G ובדקנו את שכפולם על ידי RT-qPCR. מטושים (האף/פי הטבעת) והתסנינים ההומוגניים של אברי פיגרי פרות שימשו כדי לבודד את הנגיפים על ידי מעבר סדרתי של הנגיף בתאי HRT-18G. גדילת הנגיף נותרה על ידי כימות

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

מספר העתק RNA של הגן BCoV N. הזנים שבודדו בהצלחה עברו בדיקת יעילות השכפול. הנתונים מראים שהצלחנו לבדוד 12 זנים מקומיים וכן את זן ה-Mebus (איור 3) המייצגים שיעור הצלחה של ~52%. HRT-18G הוא שורת תאים ממקור אנושי. לפיכך, הגידול של BCoV בתאים אלו עלולה לגרום לאירועי העברה זואונוטיים [3]. כדי למצוא קווי תאים חלופיים לבידוד BCoV בתאים בתרבות, ביצענו ניסויי הדבקה במספר שורות תאים ומצאנו כי נגיף ה-BCoV יכול להשתכפל גם בתאי כליות של גורי אוגרים (baby hamster kidney (BHK)). שורת תאים זו שימשה בייצור חיסונים רקומביננטיים (13). ניסויי ההכפלה מראים כי הצלחנו להדביק ולגדל 7 זנים (כולל זה ה-Mebus) בתאי BHK. לפי ידעתנו זהו הדיווח הראשון על הדבקה מוצלחת של תאי BHK בנגיף ה-BCoV.

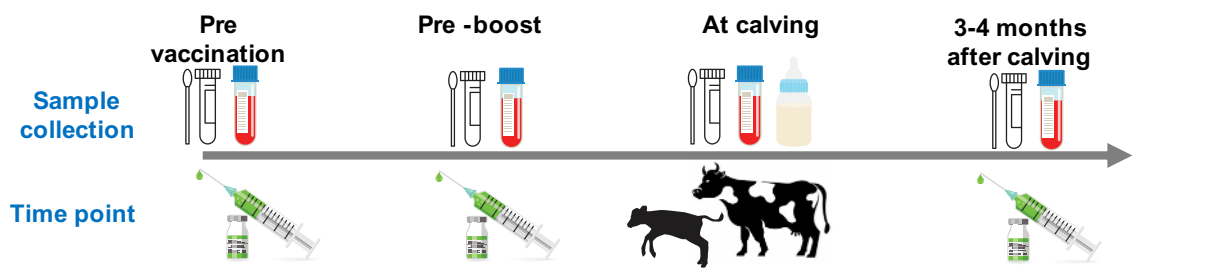


**Figure 3.** Growth kinetics of isolated BCoV strains in HRT-18G (A) and BSR-T7 cells. Cells were inoculated with a 1:10 dilution of each virus strain and incubated for 72 hours, followed by a Real-Time reverse transcription PCR (RT-qPCR) reaction to determine Virus replication. The RNA log copy numbers were calculated and plotted for each strain at T0 and T72. An increase in log copy numbers indicates successful replication.

### מטרה 2: חקר החסינות ההומורלית האדפטיבית נגד BCoV בבקר.

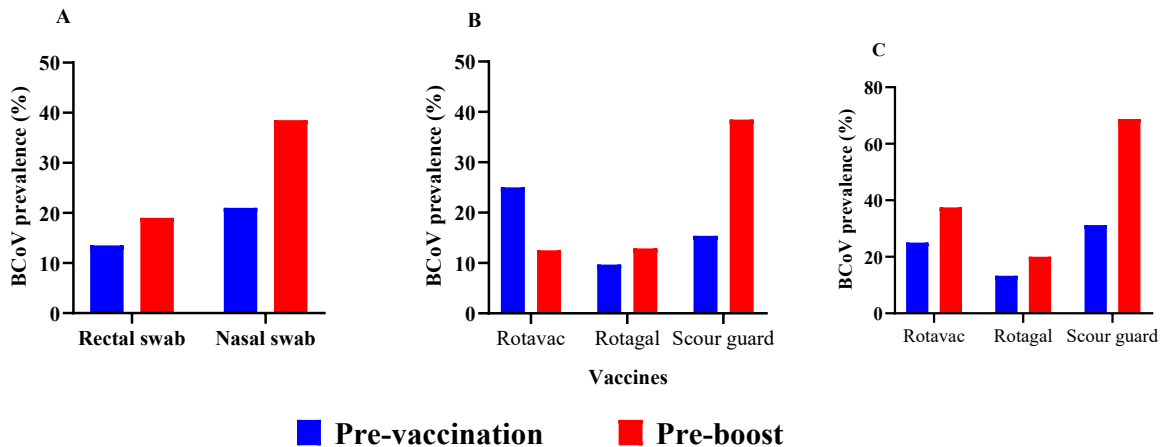
#### מטרה 2.1: בדיקת היעילות של חיסונים מסחריים הקיימים כיום בשוק לעורר ייצור נוגדנים כנגד זני BCoV מקומיים.

במטרה זו, בדקנו האם החיסונים המסחריים הקיימים כיום יכולים לעורר יצירה של נוגדנים כנגד הנגיף בעלי יכולת להגן על הבקר מפני זני BCoV עכשוויים. לשם כך חיסנו כ-60 פרות לפני המלטה ראשונה בשתי מנות של אחד משלושה חיסוני BCoV מסחריים שונים, כאשר שלושה שבועות מפרידים בין המנה הראשונה והשנייה. החיסונים כללו: Rotovac (Bharat Biotech), Rotagal (Pharmagal-Bio), and ScourGuard (Zoetis). מצב ההדבקה על ידי BCoV של פרות אלו נטר במהלך תהליך החיסון על ידי בדיקת המצאות של רני"א נגיפי במטושי פי הטבעת והאף שלהן שנאספו לפני זמן החיסון ונתינת מנת הבוסט (boost). במקביל, אספנו דגימות סרום וקולוסטרום לבדיקת תגובה הכוללת של נוגדנים ותגובת הנוגדנים המנטרלים של הפרות המחוסנות. הסרומים נאספו לפני החיסון, לפני חיסון הבוסט, מיד לאחר ההמלטה ו-12 חודשים לאחר המנה הראשונה. דגימות קולוסטרום נאספו מיד לאחר ההמלטה.



## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

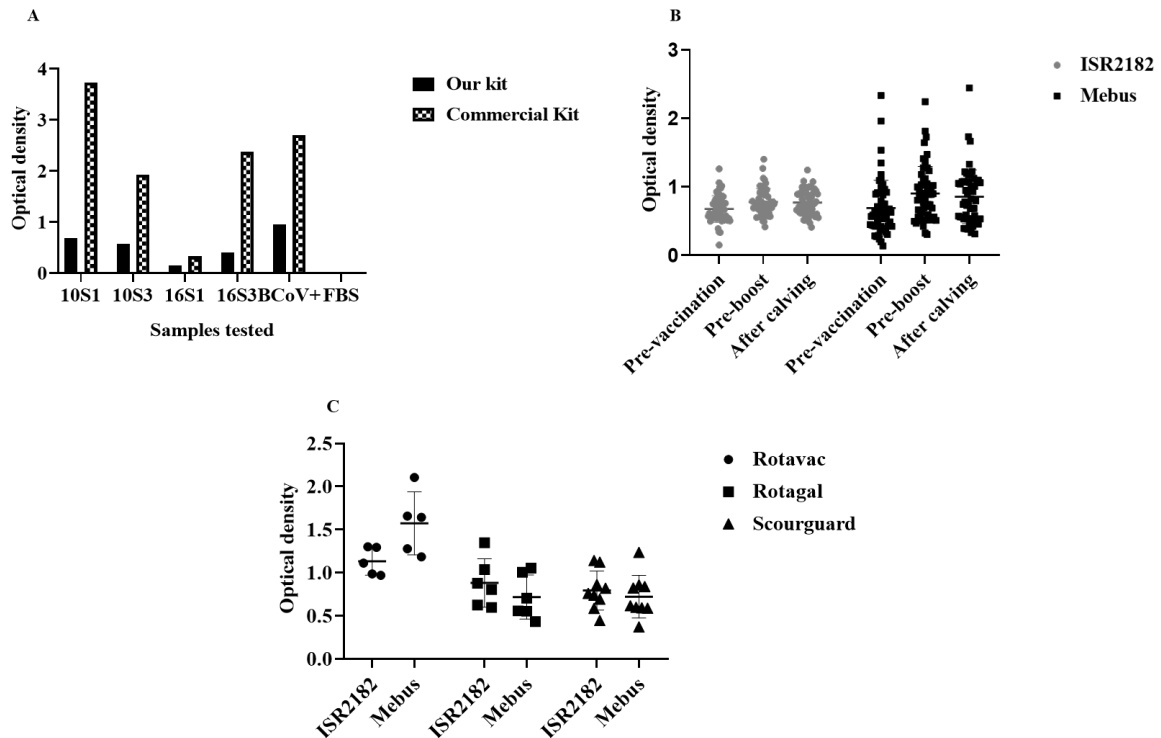
ניתוח תוצאות RT-qPCR הראו כי 13.5% ו-21% מהפרות היו חיוביות להימצאות BCoV בצואה ובהפרשות האף, בהתאמה, לפני החיסון. שלושה שבועות לאחר המנה הראשונה, מספר בעלי החיים החיוביים ל-BCoV בצואה ובהפרשות האף עלה ל-19% ו-38.5%, בהתאמה (איור 4), כאשר יותר מקרים נרשמו בבעלי חיים שקיבלו את החיסון ScourGuard (איור 4). כמו כן, כמחצית מהפרות שהיו חיוביות ל-BCoV בבדיקת מטוש אף טרום הבוסט כבר סבלו מ-BCoV לפני תחילת החיסון.



**Figure 4.** BCoV prevalence in dams vaccinated with three different commercial BCoV vaccines. (A) Overall prevalence in rectal and nasal swabs. (B) Prevalence in rectal swabs. (C) Prevalence in nasal swabs. The swabs were collected before vaccination and three weeks after the first dose and tested for BCoV RNA by a Real-Time reverse transcription PCR (RT-qPCR) reaction.

לצורך בחינה של הימצאות נוגדנים ספציפיים כנגד BCoV ערכנו מבחני קישור מסוג ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). ערכות ELISA מסחריות לבחינת המצאות נוגדנים כנגד BCoV קימות בשוק, אולם ערכות אלו מכילות סוג אחד של אנטיגן ועל כן אינו יכולת לשמש לבחינת המצאות נוגדנים כנגד זני BCoV שונים. כיוון שכך, פיתחנו מבחן ELISA שבו נגיפי ה-BCoV המקומיים אותם גידלנו בתרביות תאים משמשים כאנטיגן לבדיקת המצאות נוגדנים. אמינות הבדיקה החדשה שלנו אומתה על ידי בדיקה חוזרת של כמה דגימות טרום עם ערכת BCoV ELISA מסחרית (SVANOVIR BCV-Ab, INDICAL) (BIOSCIENCE). יש לציין ששתי הערכות הניבו תוצאות דומות, כפי שמוצג באיור 5. התוצאות הראשוניות של ELISA בסרום עם הערכה שלנו הראו שלרוב הפרות שנדגמו היו רמות ניתנות למדידה של נוגדנים בסרום נגד נגיף BCoV מקומי (ISR2182) וזן ה-Mebus עוד לפני החיסון (איור 5), מה שמרמז שהן נדבקו באופן טבעי לפני שקיבלו החיסונים. כמו כן, בבעלי חיים רבים שנדגמו, לא הייתה עלייה בתגובת נוגדנים הספציפית ל-BCoV לאחר חיסון (איור 5). תוצאות ראשוניות של בדיקת דגימות קולוסטרום חשפו רמה גבוהה יותר של נוגדנים ספציפיים ל-BCoV נגד זן Mebus, במיוחד אצל מקבלי חיסון Rotavac (איור 5).

## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב



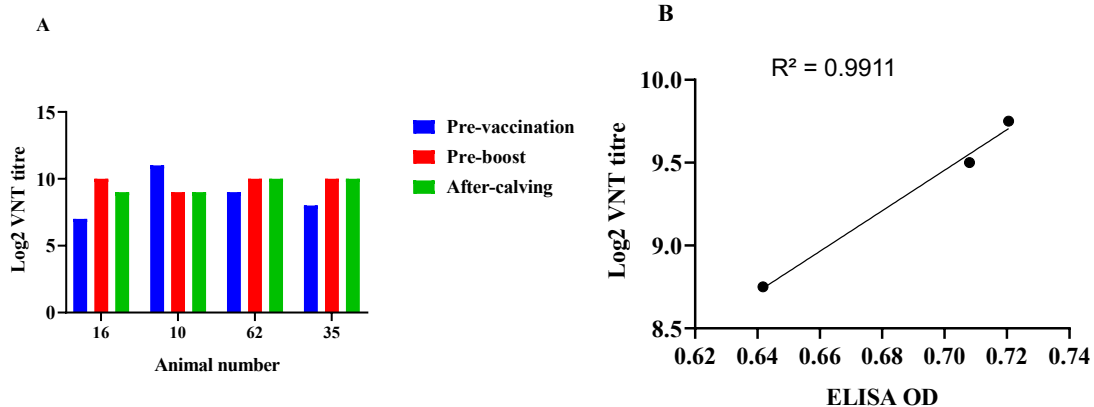
**Figure 5.** ELISA binding experiments. (A) Validation experiments were conducted with four serum samples using our kit coated with local BCoV isolate (ISR2182) as an antigen and commercial ELISA kit. (B) ELISA of serum from vaccinated animals against the Israeli ISR2182 and Mebus virus cultured in BSR-T7 cells. For each animal, three time points were tested - pre-vaccination, pre-boosting, and after-calving. C) ELISA of colostrum harvested from vaccinated dams against ISR2182 and Mebus strains

### מבחני נטרול (neutralization assays)

אחת התוצאות הנראות לעין של הדבקה בנגיף היא היצירה של אפקט ציטופאטי (cytopathic effect (CPE)) בתאי המארחים. תופעה זו נוצלה באופן נרחב בחקר נגיפים ככלי זול לחקר שכפול נגיפים ולביצוע מחקרים פונקציונליים כגון בדיקות נוגדנים מנטרלים לנגיפים (virus neutralizing antibody (VNT)). עם זאת, מכיוון שנגיף ה BCoV אינו גורם ל-CPE בשורות תאים רבות, במיוחד תאי HRT-18G, הקושי לכמת את רמת הנוגדנים המנטרלים כנגד זנים רבים נותר בעינו. בשל עובדה זו, פיתחנו פרוטוקול VNT חדש שאינו מסתמך על CPE אלא משתמש ב-RT-qPCR למדידת תגובות הנטרול של דגימות הסרום והקולוסטרם שנאספו. תוצאות ראשוניות עם סרום של ארבע חיות מחוסנות הצביעו על הבדלים ניכרים בפרופיל של נוגדנים מנטרלים כנגד BCoV בהשוואה בין שלוש נקודות הזמן (איור 6). בדומה לבדיקת ELISA, ה-VNT גילה שהחיות נדבקו באופן טבעי לפני החיסון. במחציתם, לא הייתה עלייה משמעותית בטיטר VNT לאחר חיסון (איור 6).



## דו"ח מדעי מסכם עבור מענק מספר 828-0001 מטעם מועצת החלב

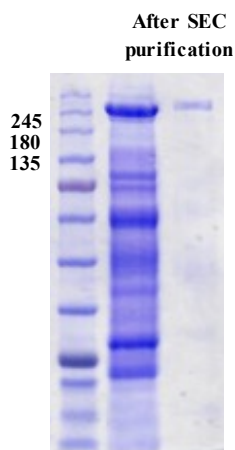


**Figure 6.** Serum Virus neutralization test experiments. (A) VNT on the serum of four animals against Israeli BCoV strain (ISR2182). The serum was collected at pre-vaccination, pre-boost, and after calving. (B) Correlation plot of VNT titer at three serum collection points against their ELISA optical densities. The plot reveals a strong relationship between the VNT and ELISA test outcomes.

**מטרה 3: אפיון ביוכימי ומבני של אפיטופי נטרול בחלבוני המעטפת הנגיפית הממוקדים בנטרול נוגדנים (nAbs).**

### מטרה 3.1: ביטוי רקומביננטי של חלבוני BCoV spike.

אפיון ברזולוציה גבוהה של אפיטופי הנטרול חיוני כדי לתמוך בתכנון הרציונלי של חלבוני המעטפת ובפיתוח של חיסון מניעתי, דבר הדורש ביטוי רקומביננטי של חלבון המעטפת ונוגדנים מנטרלים ברמות ביטוי וניקיון גבוהים. עם זאת, הביטוי של חלבוני מעטפת נגיפית רקומביננטית הוא מאתגר מכיוון שהם בדרך כלל חלבונים חוצי ממברנה גדולים, לא יציבים ובעלי גליקוזילציה כבדה. לפיכך, יש צורך לייצב את חלבון המעטפת ולבטא אותו במערכות ביטוי חלבון אופטימליות (מערכות ביטוי יונקים וחרקים), ולייעל את פרוטוקול הביטוי. התפרצות מגפת COVID-19 הגדילה מאוד את הידע שלנו על הביטוי של חלבוני נגיף הקורונה. מספר פרוטוקולים לביטוי חלבוני ה Spike ממקור אנושי (hCoV) זמינים { Esposito, 2020 #82; Schaub, 2021 #83} ושימשו אותנו לצורך כיוול פרוטוקול הביטוי של חלבון ה BCoV Spike. חלבון Spike במצב שלפני האיחוי (CoV prefusion Spike) הוא היעד העיקרי לפיתוח חיסון ונוגדנים טיפוליים. עם זאת, קשה לייצר באופן רקומביננטי את חלבון Spike המלא היציב. לפיכך, מחקרים ביוכימיים ומבניים של hCoV Spikes התמקדו בביטוי החלק החוץ תאי של חלבון ה Spike (soluble ectodomain) כחלבון מסיס. מחקרים שונים מצאו כי מספר שינויים (designs) ומוטציות נקודתיות תורמות לייצוב חלבון ה Spike במצב prefusion [28, 29]. על בסיס מחקרים אלו

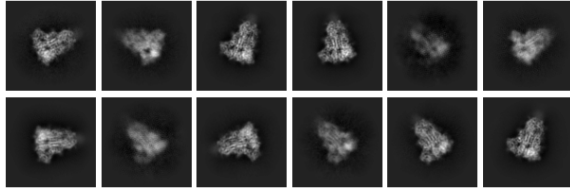


**Figure 7.** SDS PAGE analysis of the stabilized Mebus Spike Ecto purification experiment that was expressed in Expi-CHO cells. The size of the Spike Ecto is approximately 160kDa.

עיצבו וביטאו את חלבוני ה BCoV spike ectodomain (S Ecto) של זן ה Mebus והזן המקומי ISR2182. החלבוני ה S Ecto בוטאו בתאי Exi293, שורות תאי יונקים המתמחים בביטוי ביתר של חלבונים. החלבון הופרש למדיום גידול. בשלב בהא החלבון נוקה באמצעות קולונת אפיניות Strep Tactin ולאחר מכן באמצעות קולונת Gel Filtration (איור 7).

**מטרה 3.2: פתרון המבנה של חלבון ה Spike של הזן המקומי ISR2182.**

החלבונים המנוקים שימשו לצורך קביעת המבנה של חלבוני ה S Ecto באמצעות מיקרוסקופית אלקטרונית (Cryo Electron Microscopy, Cryo-EM). בשלב ראשון הקפאנו את חלבון ה S Ecto של זן ה Mebus ו ISR2182. חלבון ה S Ecto של נגיף ה IRS2182 קפא בצורה הומוגנית ועל כן המשכנו לאסוף מידע מבני עבורו. חלבון ה S Ecto של זן ה Mebus קפא באופן לא הומוגני (preferred orientation) דבר שמנע את המשך איסוף המידע המבני. התוצאות הראשוניות ברזולוציה נמוכה הראו שהמבנה של חלבון ה S Ecto של נגיף ה IRS2182 דומה למבנה הקנוני של חלבוני S של נגיפי הקורונה (איור 8).



אנו ממשיכים עם הניסויים המבנים על מנת לשפר את הרזולוציה וכן לקבל מידע מבני לגבי חלבון ה S Ecto של זן ה Mebus.

**Figure 8.** Single-particle cryo-EM 2D classifications of ISR2182 Spike ecto.

## תוכניות להמשך

### בחינת התגובה החיסונית המנטרלת

על מנת להמשיך ולבחון את התגובה החיסונית המנטרלת או מפתחים מערכת של פסודו-נגיפית (in vitro) הדבקה המכילים את חלבון ה-Spike על המעטפת של החלקיק. מערכת זאת מיועדת לצורך בחינת היכולת של נוגדנים לנטרל את ההדבקה הנגיפית. החוזה של מערכת זו היא היכולת לבחון את התגובה החיסונית הספציפית כנגד חלבון ה-Spike וכן לבחון את הנטרול של מספר רב של נגיפים כולל נגיפים שלא הצלחנו לגדל בתרביות תאים. תוצאות מבחני נטרול אלו יבססו את המסקנות שלנו לגבי יכולת הנטרול של הנוגדנים הקיימים בסרום וקולסטרום של הפרות המחוסנות.

### אפיון מבני של אפיטופי הניטרול בחלבון ה-Spike

אנו נמשיך בניסיונות הביטוי של חלבוני S Ecto של נגיפים שונים ובקביעת המבנה של חלבון ה-Spike ברזולוציה גבוהה. כמו כן אנו נבטא את אזור ה-receptor binding domain של חלבון ה-Spike של זנים שונים לצורך בידוד של נוגדנים מנטרלים.

לצורך אפיון ביוכימי ומבני של אפיטופים מנטרלים, נבודד נוגדנים מנטרלים מדם של פרות שהראו תגובת ניטרול גבוהה. ראשית, נעשיר תאי B ספציפיים ל-Spike מדגימות דם על ידי שימוש ב-single-cell sortin באמצעות ה-Spike Ecto-המבוטא ברקומביננטי שיסומן על ידי פלואורופורים. לאחר מכן אנו נרצף את הרצף של השרשרת הכבדה והקלה של הנוגדנים מהתאי B המבודדים ונשבט את הגן שלהם לתוך פלסמיד לביטוי. הנוגדנים יבוטאו במערכות הביטוי של יונקים הזמינות במעבדה שלנו והנוגדנים ינוקו האמצעות קולונת אפיניות.

אנו נשתמש בשיטות ביוכימיות ומבניות לאפיון ברזולוציה גבוהה של אפיטופי נטרול. מידע זה ישמש במחקרים עתידיים כדי לעצב את חלבוני המעטפת לייצר אנטיגנים המעוררים תגובה חיסונית מנטרלת טוב יותר, ובכך יהוו בסיס לפיתוח חיסון יעיל יותר נגד BCoV. בשלב ראשון נחזור על ניסויי הקישור והנטרול שנערכו באמצעות דגימות הסרום (מטרה 2) תוך שימוש בנוגדנים הרקומביננטיים. נוגדנים נבחרים יקודמו למחקרים מבניים לאפיון ברזולוציה גבוהה של אפיטופי נטרול באמצעות Cryo EM. אנו נייצר קומפלקסים של חלבון ה-Spike ביחד עם הנוגדנים, נפתור את המבנה שלהם ובאמצעות אנליזה מבנית נאפיין את אפיטופי הנטרול.

## **Materials and Methods**

### **Isolation and *in vitro* replication of bovine coronaviruses**

B CoV was isolated from positive swabs and organ samples using the previously described procedure by serial passaging with HRT-18G cells (ATCC® CRL11663™) [16]. Briefly, 1 mL of membrane-filtered (0.45 μm) samples were incubated at 37 °C, and 5% CO<sub>2</sub> with confluent HRT-18G cells, seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunc, USA). After one hour, the monolayer was washed and maintained on Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (ATCC® 30-2002™) for 5-7 days. After two to three blind passages in HRT-18G, viral RNA was extracted, and Real-Time reverse transcription PCR (RT-qPCR) B CoV detection was performed. An increase in the RNA log copy number of the B CoV N gene with cell passage implied successful virus isolation. To test the replication efficiency of the isolated B CoV strains, confluent HRT-18G cells seeded in 6 well plates were infected with 1 mL of the isolated virus diluted (1: 10) in DMEM and incubated at 37°C for 72 hours. The Virus replication was confirmed by an RT-qPCR as described above. A similar procedure was used to replicate the cell-adapted B CoV strains in BSR-T7 cells maintained using Eagles minimum essential medium (EMEM) (ATCC® 30-2003™).

### **Sequencing of the complete spike and HE genes**

The complete S and HE genes were amplified from the total RNA of B CoV-positive samples using Quanta qScript XLT 1-Step RT-PCR Kit (QuantaBio, Beverly, MA, USA). Following RT-PCR, the amplicons were verified by electrophoresis on 1% agarose gel; the clear bands were excised and purified using a MEGAquick Spin Plus fragment DNA purification kit (iNTRON, Seoul, Korea). Purified PCR products were vacuum-dried, and concentrated DNA was sent for next-generation sequencing (NGS) (Genotypic Technology, India). The shorter reads from the Illumina sequencing were subjected to de novo assembly using Geneious Prime software version 2022.2.2 (Biomatters, CA, USA). The consensus sequences of the contigs were assembled to reconstruct the original sequence of the genes. The resultant nucleotide sequences were translated into amino acid residues, which were later assembled to the Mebus reference sequence using the protein alignment tool in Geneious Prime software (Biomatters, CA, USA) to identify polymorphisms and differences between the local B CoV isolates. The varying amino acid residues were then used to construct a phylogenetic tree based on the neighbor-joining method with a 70% support threshold and 1000 bootstrapping replicates.

### **ELISA for detection of antibodies against B CoV in serum and colostrum**

We developed and customized the ELISA assay to measure total antibodies in serum and colostrum. The assay was performed on 96 wells, half area, clear, high binding microplate (Greiner Bio-one, Germany). The plates were coated with 50 μL of filtered B CoV-infected BSR-T7 cell supernatants diluted (1: 25 to 1: 50) in 1X Phosphate buffered saline (PBS) and incubated overnight at 4°C on a shaker. Filtered mock cell supernatant was used as a negative antigen control. Following the overnight incubation, the unbound antigen was disposed

of, and the plates were incubated for 10 minutes with 3.7% Paraformaldehyde (PFA) to inactivate the bound viruses. The plates were washed five times with 100  $\mu$ L of 1X PBS containing 0.05% tween20 (PBST) and blocked at room temperature for one hour with 100  $\mu$ L of 10% fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries, Israel) prepared in 1X PBST. Following blocking, the plates were washed five times with PBST and incubated for one hour at room temperature with 50  $\mu$ L colostrum or serum samples diluted 1:100 with 1% FBS in 1X PBST. The wells were washed six times with 100  $\mu$ L of PBST, properly dried, and incubated for one hour at room temperature with 50  $\mu$ L goat anti-bovine HRP secondary antibody (diluted 1:50,000 in 1% FBS-PBST). The plate wells were again washed five times with 1XPBST and incubated at room temperature with TMB substrate (Biolegend, San Diego, USA). After 15 minutes, the reaction was stopped with 50  $\mu$ L of 2M sulfuric acid (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The absorbance was read at 450nm with a SynergyH1 microplate reader and analyzed using Gen5 version 3.09 software (BioTek Instruments, Inc, Vermont, USA).

#### **Extraction of colostrum immunoglobulins**

Due to the toxic effects of some colostrum components on cell culture [30], it was imperative to extract only the immunoglobulins from the collected colostrum samples for the following in vitro studies. Briefly, frozen colostrum samples were thawed at room temperature and defatted by centrifugation at  $\times 15,000G$  for 15 minutes. Defatted colostrum was incubated for 2 hours at 37  $^{\circ}C$  with Rennex, followed by centrifugation at  $\times 10,000G$  to extract whey. The immunoglobulins in the whey were extracted by salting out using ammonium sulfate based on a previously published protocol [31]. The precipitated immunoglobulins were dissolved in PBS (Biological Industries, Israel) and stored at -80  $^{\circ}C$  for further analysis.

#### **Virus infectivity-neutralization antibody test (VNT)**

The VNT was performed in BSR-T7 cells using a modification of an established protocol [22]. The serum and colostrum immunoglobins from the vaccinated cows were incubated at 56 $^{\circ}C$  for 30 min for complement inactivation and diluted 1:4 in EMEM growth medium supplemented with antibiotic-antimycotics. Serum from an infected cow and fetal bovine serum (FBS) were used as positive and negative controls, respectively. A two-fold serial dilution of the samples was prepared in 1.5 mL microcentrifuge tubes, and a virus sample containing 150 units of TCID<sub>50</sub> was added to them. The serum-virus mixture was incubated at room temperature for 30 min, and 200  $\mu$ L of it was added in duplicates to the confluent BSR-T7 cell monolayer seeded in 48 well plates. The plates were incubated at 37  $^{\circ}C$  and 5% CO<sub>2</sub> for 72 hours. RT-qPCR was then performed to determine the viral RNA copy numbers. The infectivity neutralization titer of the serum or colostrum immunoglobulin was determined by expressing the value of dilution that completely inhibited viral growth as reciprocal.

## References

1. A. N. Vlasova, L. J. Saif, Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Front. Vet. Sci.* **8**, 643220 (2021).
2. I. Toftaker, I. Holmoy, A. Nodtvedt, O. Osteras, M. Stokstad, A cohort study of the effect of winter dysentery on herd-level milk production. *J. Dairy. Sci.* **100**, 6483-6493 (2017).
3. H. Tsunemitsu, L. J. Saif, Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch. Virol.* **140**, 1303-1311 (1995).
4. L. J. Saif, Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **26**, 349-364 (2010).
5. C. A. Mebus, R. G. White, E. L. Stair, M. B. Rhodes, M. J. Twiehaus, Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **67**, 173-174 passim (1972).
6. D. David *et al.*, Israeli Roussetus aegyptiacus Pox Virus (IsrRAPXV) Infection in Juvenile Egyptian Fruit Bat (*Rousettus aegyptiacus*): Clinical Findings and Molecular Detection. *Viruses* **13**, (2021).
7. R. W. Fulton *et al.*, Detection and characterization of viruses as field and vaccine strains in feedlot cattle with bovine respiratory disease. *Vaccine* **34**, 3478-3492 (2016).
8. A. N. Vlasova, L. J. Saif, Bovine Coronavirus and the Associated Diseases. *Front Vet Sci* **8**, 643220 (2021).
9. C. A. Mebus, R. G. White, E. L. Stair, M. B. Rhodes, M. J. Twiehaus, Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. *Vet Med Small Anim Clin* **67**, 173-174 passim (1972).
10. C. A. Mebus, E. L. Stair, M. B. Rhodes, M. J. Twiehaus, Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. *Am J Vet Res* **34**, 145-150 (1973).
11. X. Lin, K. L. O'Reilly, M. L. Burrell, J. Storz, Infectivity-neutralizing and hemagglutinin-inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 357-362 (2001).
12. L. J. Saif, R. A. Heckert, K. L. Miller, M. M. Tarek, Cell culture propagation of bovine coronavirus. *J. Tissue Cult. Methods* **11**, 139-145 (1988).
13. F. Yang *et al.*, The Multiplicity of Infection of Recombinant Vaccinia Virus Expressing the T7 RNA Polymerase Determines the Rescue Efficiency of Vesicular Stomatitis Virus. *Front Microbiol* **13**, 846426 (2022).