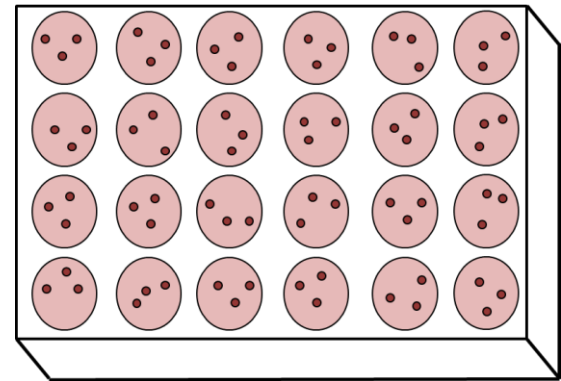
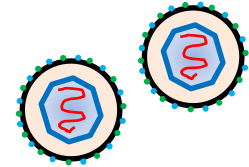
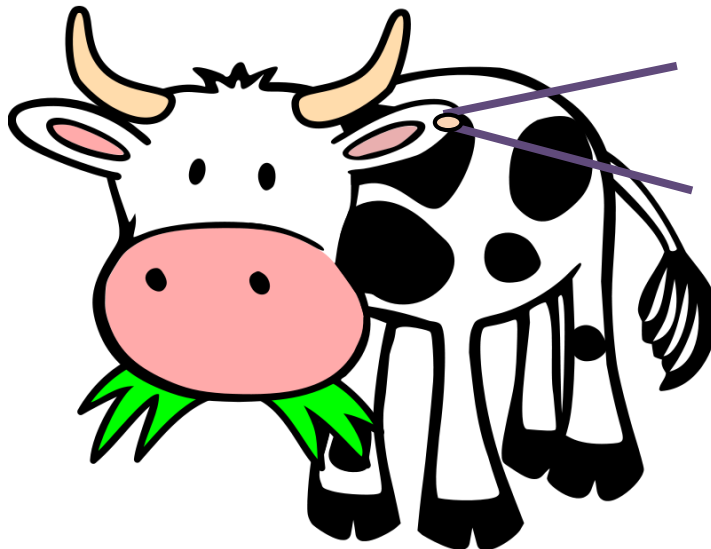




מערכת חוץ-גופית למחקר התרבות נגיף הרפס 4 בבקר

שרון קרניאלי

החטיבה לוירולוגיה, המכון הווטרינרי ע"ש קימרון



נגיפי הרפס: נפוצים מאד בעולם החי

סדרה: *Herpesvirales*

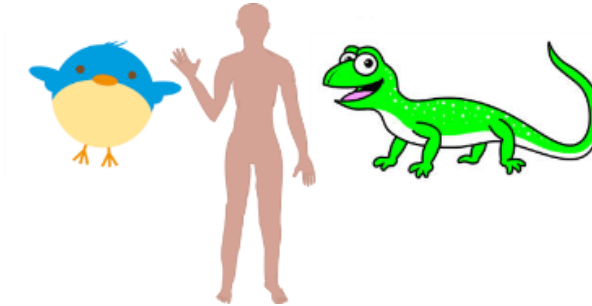
משפחות:

Alloherpesviridae



דגים ודו-חיים

Herpesviridae



זוחלים, עופות ויונקים

Malacoherpesviridae



רכיכות

נגיפי הרפס: תכונות משותפות

רדומים לאחר הדבקה
ראשונית



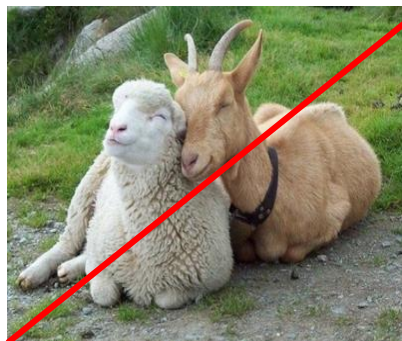
הדבקה במגע קרוב



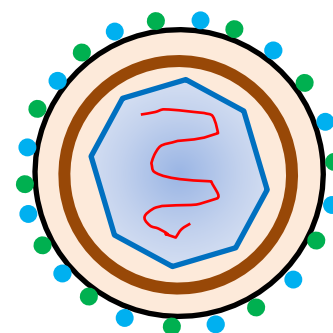
גנום: דנ"א
דו-גדילי



שפעול בתנאי
עקה



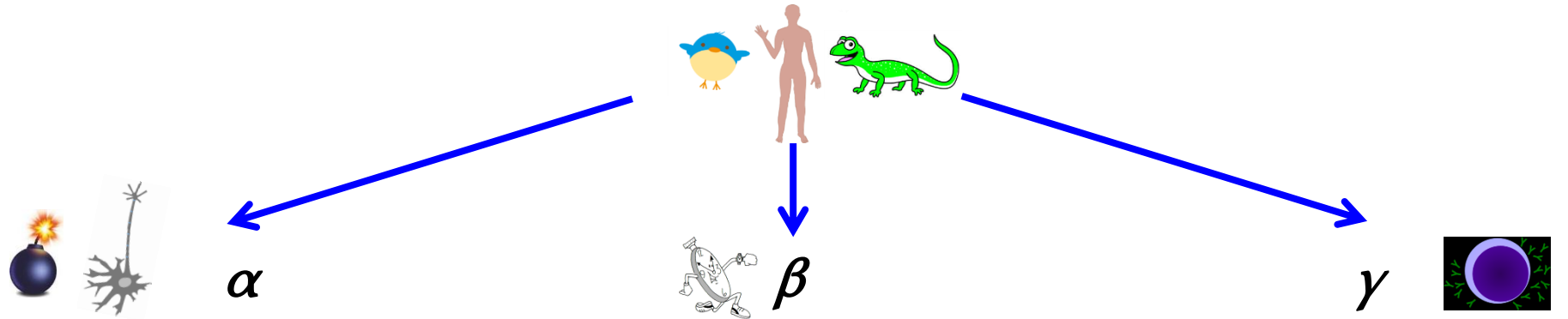
ספציפיות למאכסן
(לרוב)



מעטפת
שומנית

נגיפי הרפס בבקר

משפחה: *Herpesviridae*

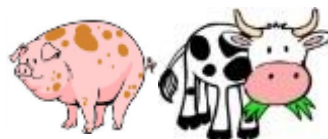


הרפס 1 של בקר
(IBR, IPV)

הרפס 2 של בקר
(Bovine mammillitis
/pseudo-lumpy skin disease
virus)

הרפס 5 של בקר
(Bovine Encephalitis virus)

הרפס מחלת אוז'סקי
(Pseudorabies)



הרפס 4 של בקר

הרפס 6 של בקר
(Bovine lymphotropic virus)

נגיף הרפס 4 בבקר בישראל

- הנגיף בודד מפרות שסבלו מדלקות בושת ("נשיכת התן") ומדלקות נרתיק ("דנ"ן") לעתים בודדו במקביל חיידקים שונים ומיקופלסמה
- 2016-7: רפת גשור (דלקת בושת, דלקות נרתיק), כפר-מנחם (דלקת בושת)



גשור: יוני 2016

נגיף הרפס 4 בבקר: גורם מחלה?

- בודד ברחבי העולם מפרות שסבלו ממגוון מחלות: במערכות הרבייה, נשימתיות, בעור, דלקות בלחמית וסרטן הלימפה



אולם:

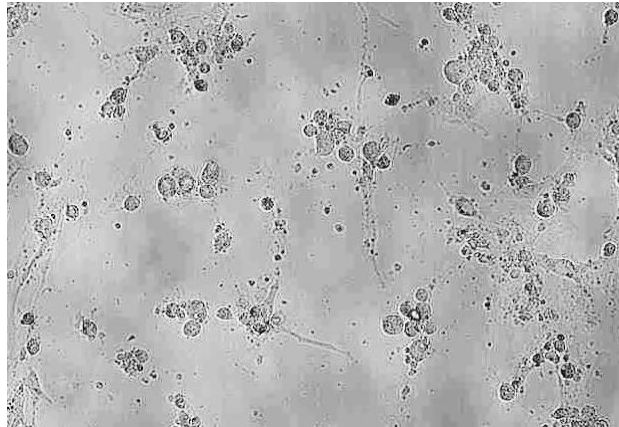
- עד כה לא שוחזרו המחלות בהדבקה ניסיונית
- לעיתים בודד הנגיף מרקמות של פרות שלא הראו סימני מחלה

האם הרפס 4 אורם לדלקות בושט ונרתיק בבקר?

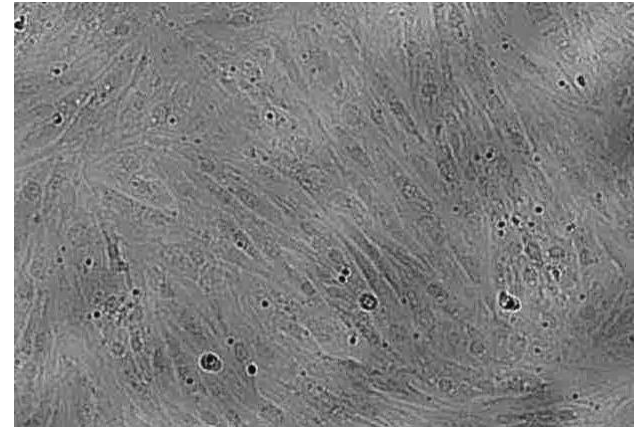
האם הרפס 4 יכול להתרבות בתאים ממקור אניטלי של בקר?

הרפס 4 מדביק ביעילות תאים ראשוניים מרקמות ממערכת המין הנקבית של בקר

הרפס 4 (3 ימים)

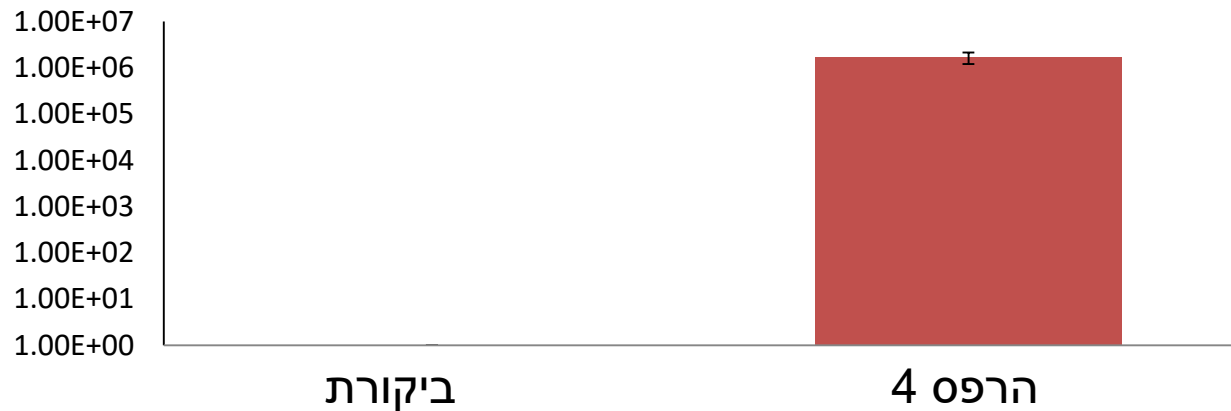


ביקורת



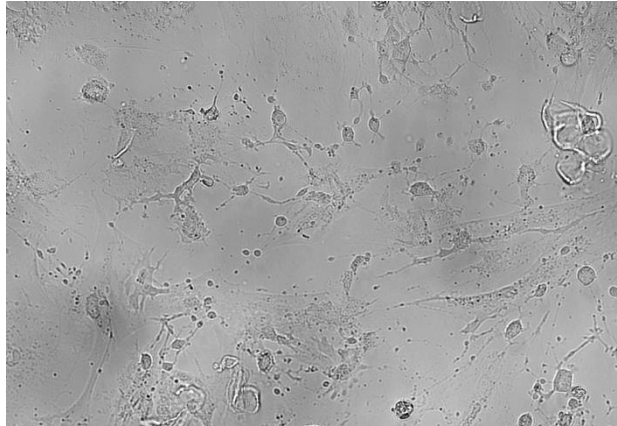
תאים ראשוניים
מרקמת בושת

כייל נגיף
(TCID₅₀/ml)

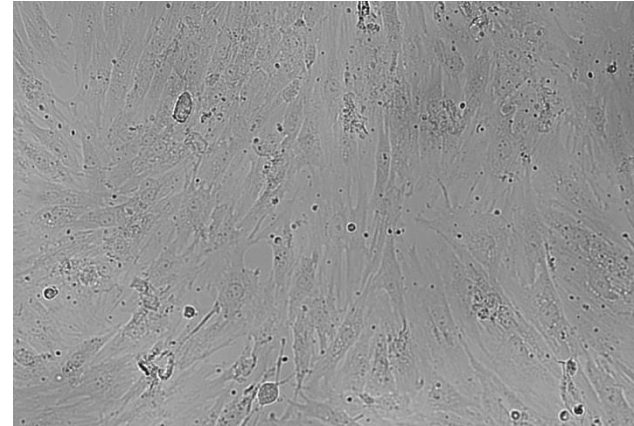


הרפס 4 מדביק ביעילות תאים ראשוניים מרקמות ממערכת המין זכרית של בקר

הרפס 4 (3 ימים)



ביקורת



תאים ראשוניים
מרקמת עורלה

הרפס 4 יכול להתרבות בתאים ראשוניים מרקמות בקר.

האם הנאיף יכול להתרבות ברקמה שלא?

תרביות חוץ גופיות *Ex-vivo* cultures



חתכים דקים (מאות מיקרונים) מאברים/מרקמות חיות
המוחזקים במצע גידול במשך ימים עד שבועות

יתרונות מרכזיים ככלי מחקרי של התרבות ואלימות נגיפים

שמירה על מבנה הרקמה

אפשרות לבחון פעולות גומלין בין הנגיף למגוון סוגי תאים

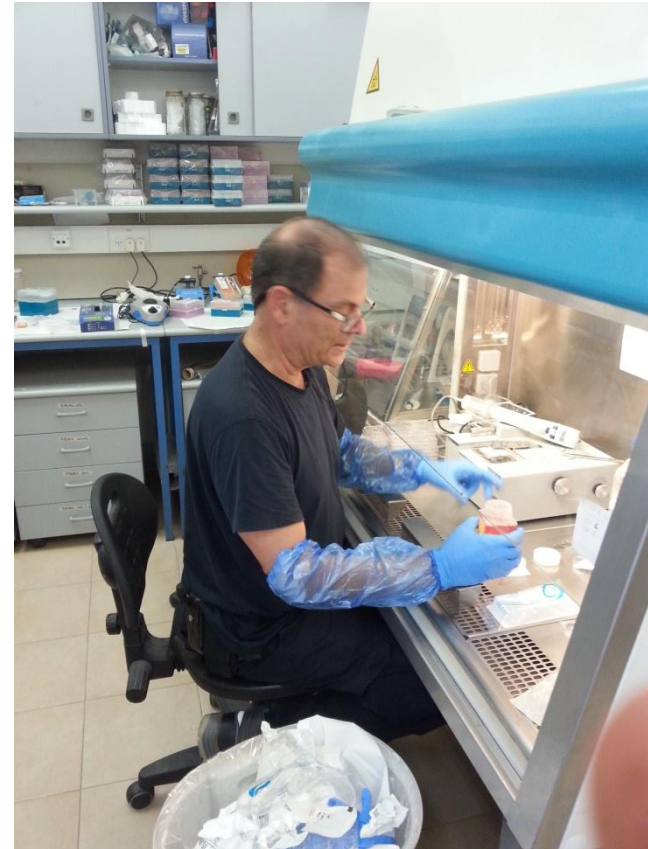
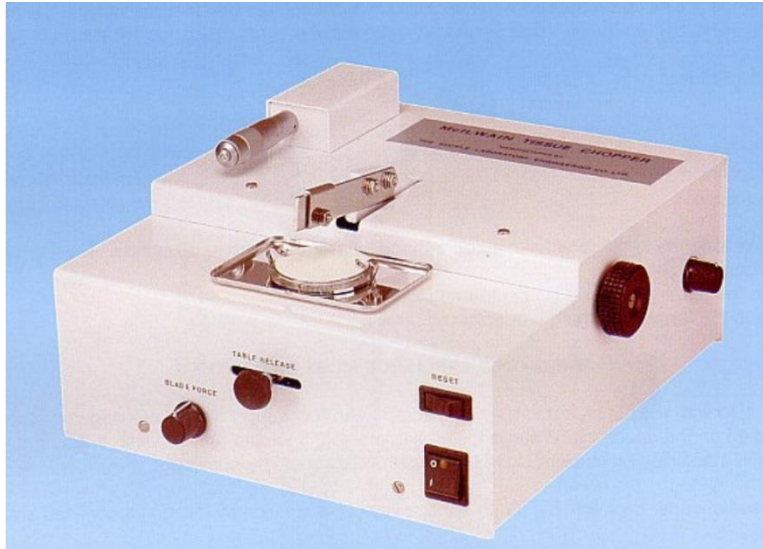
אפשרות ללמוד על התגובה החיסונית המולדת של הרקמה

עלות נמוכה, אפשרות לבחון מגוון משתנים (ביחס לניסויים בבע"ח)

לא ניתן ללמוד על התגובה החיסונית המערכתית (נרכשת)

תרביות חוץ גופיות

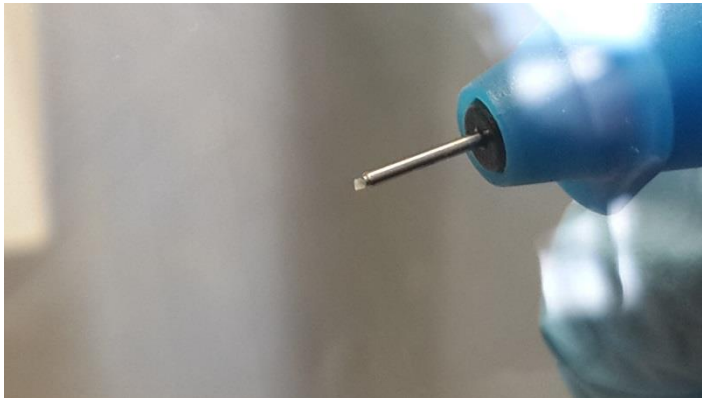
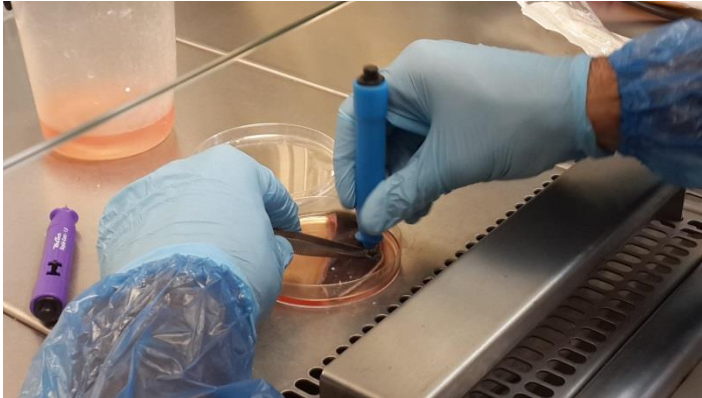
McIlwain Tissue Chopper קוצץ רקמות



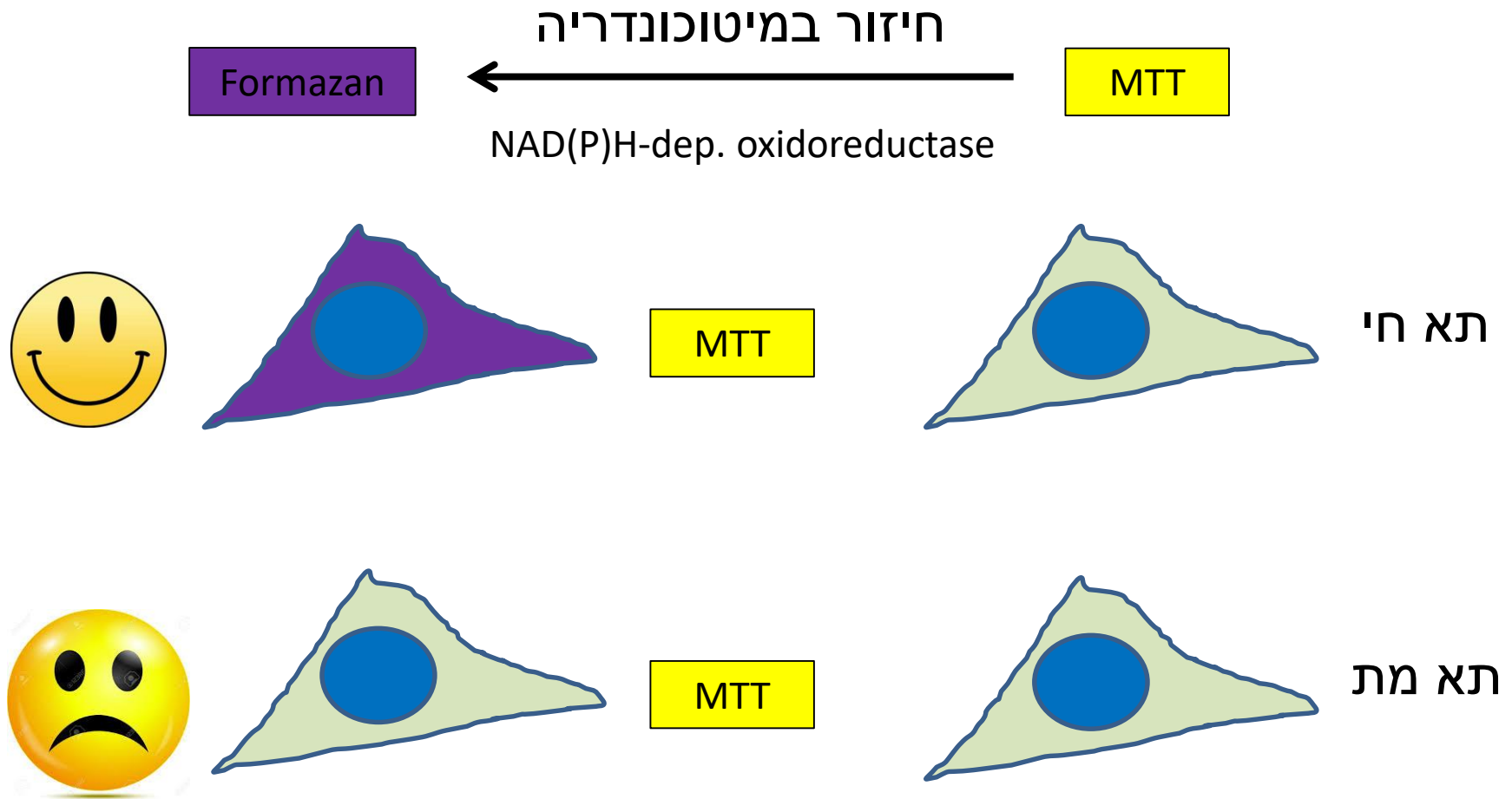
ד"ר עזרא רוזנבלוט

תרביות חוץ גופיות

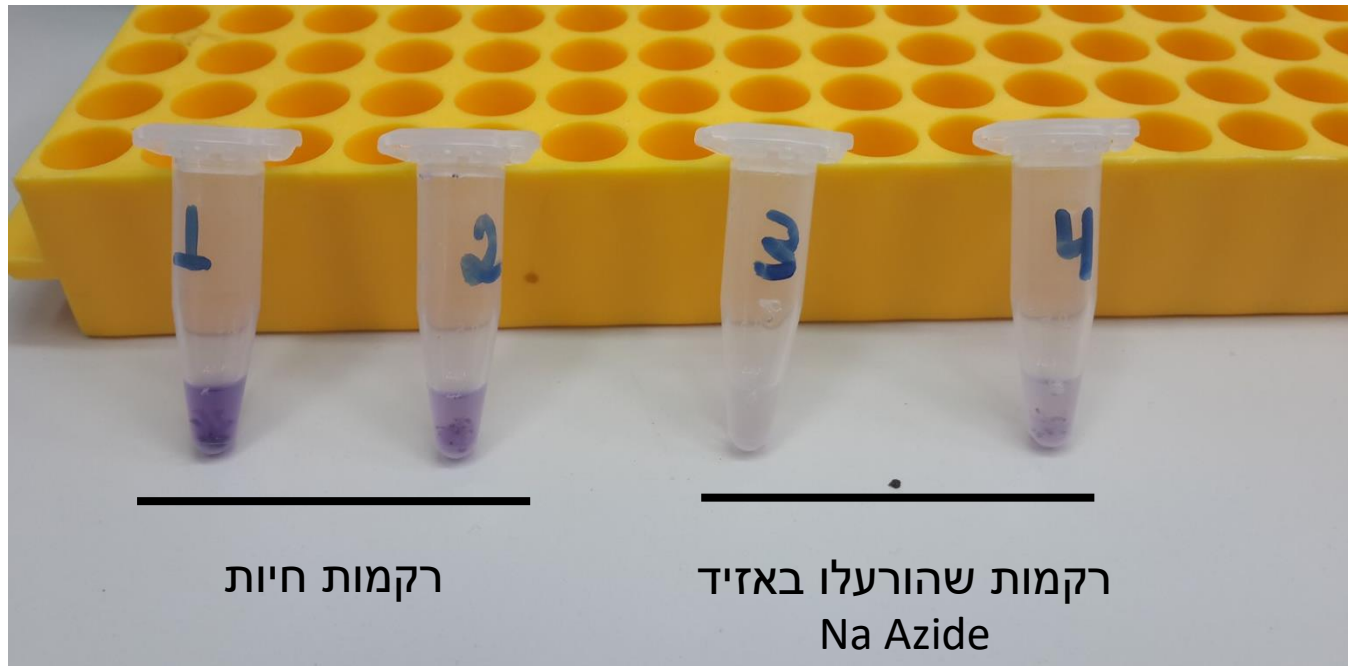
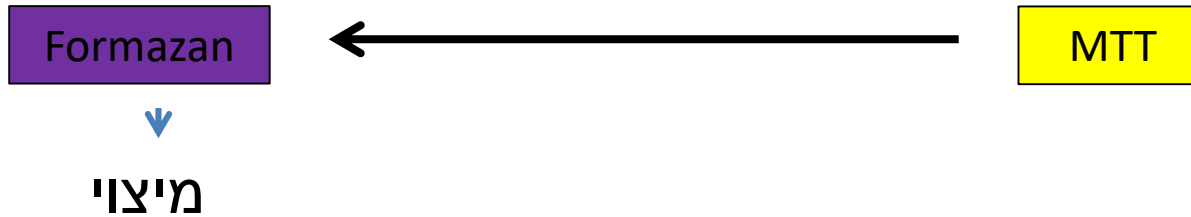
ביופסית נקב Biopsy punch



האם חתכי הרקמה חיים? מבחן MTT

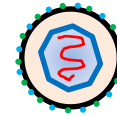


האם חתכי הרקמה חיים? מבחן MTT



האם הרפס 4 מתרבה בחתכי הרקמה?

מהלך הניסוי:



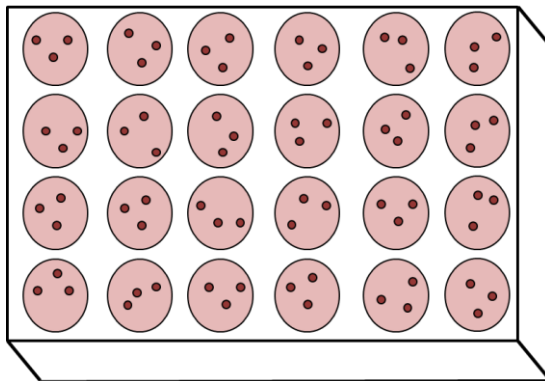
הדבקה נגיף הרפס 4 (גשור)

ספיחה 4 שעות

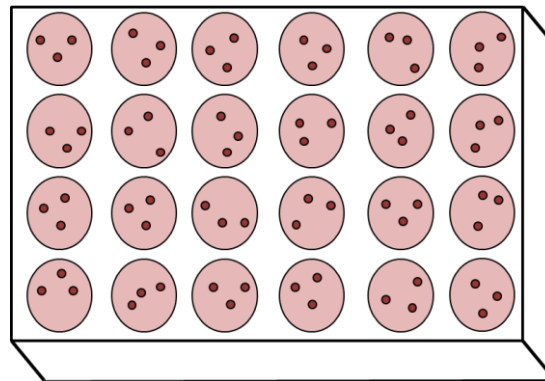
שטיפה

הדגרה עם מצע גידול חדש

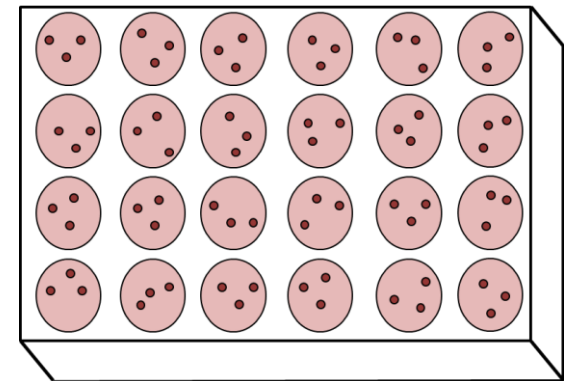
יום=6



יום=3



יום=0

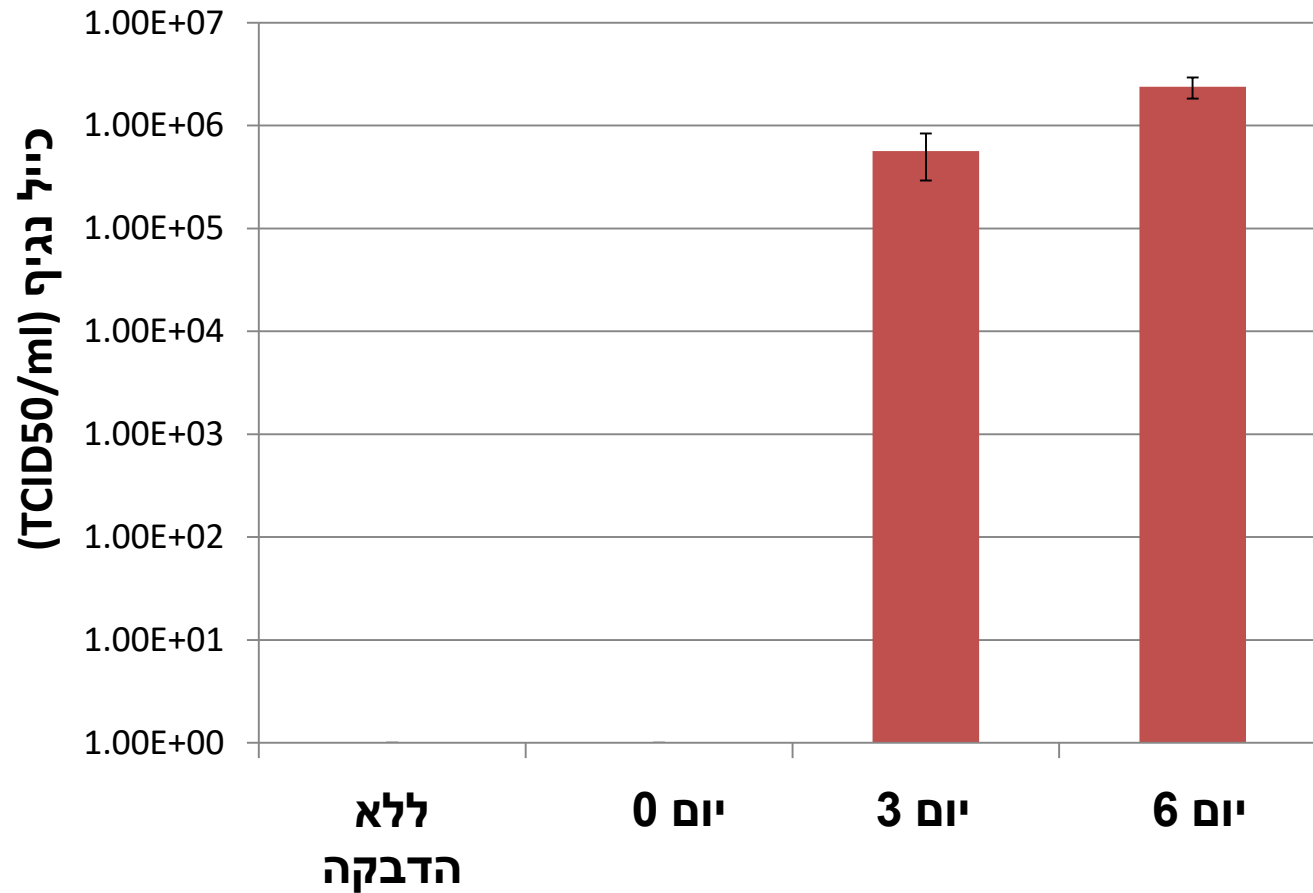


נאסף מצע גידול: כייל נגיף

נאספו חתכי הרקמה: מיצוי ח. גרעין, קיבוע וצביעה

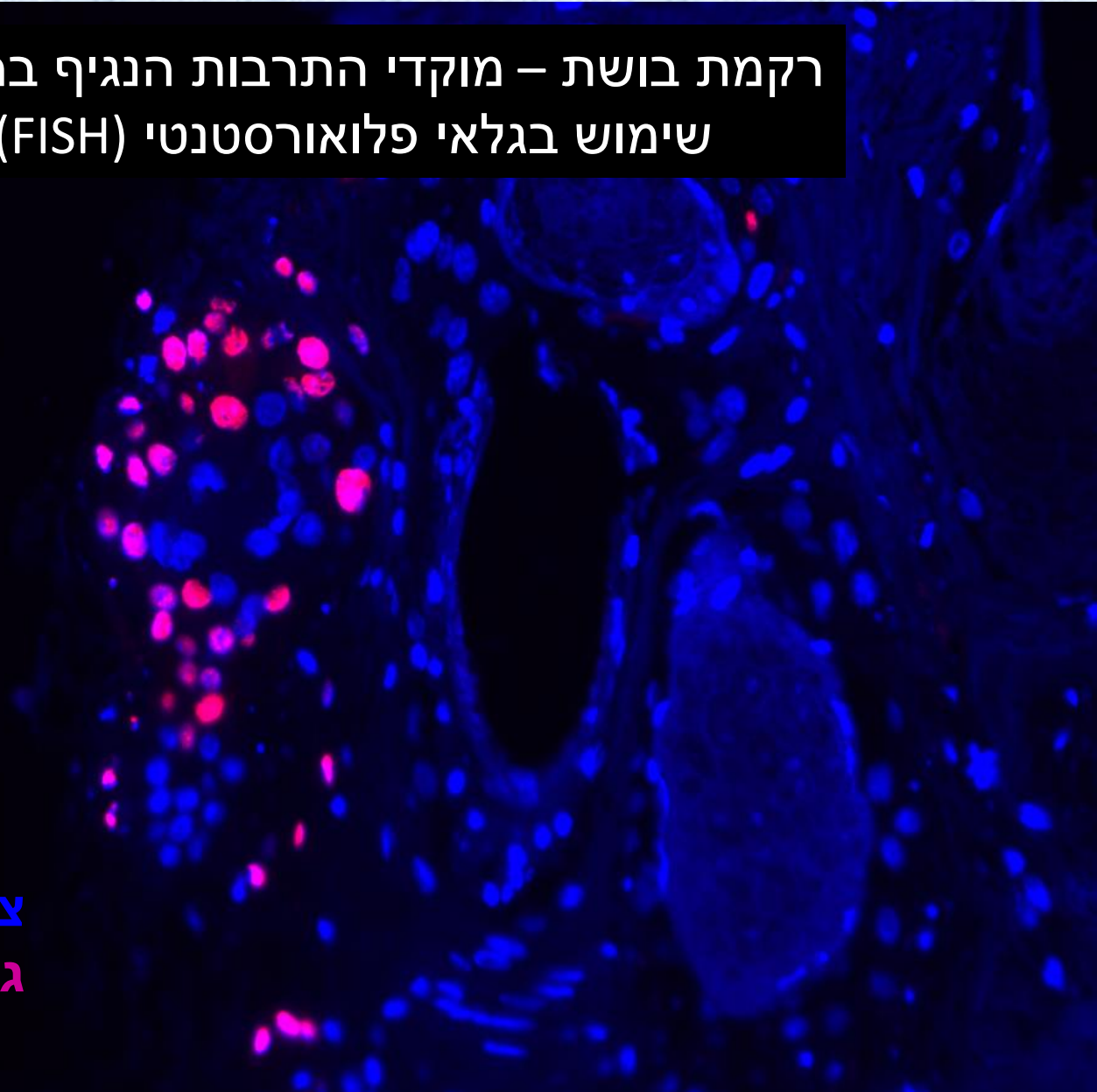
הרפס 4 מתרבה ביעילות בחתכי הרקמה

רקמת בושת – הפרשת נגיף למצע הגידול



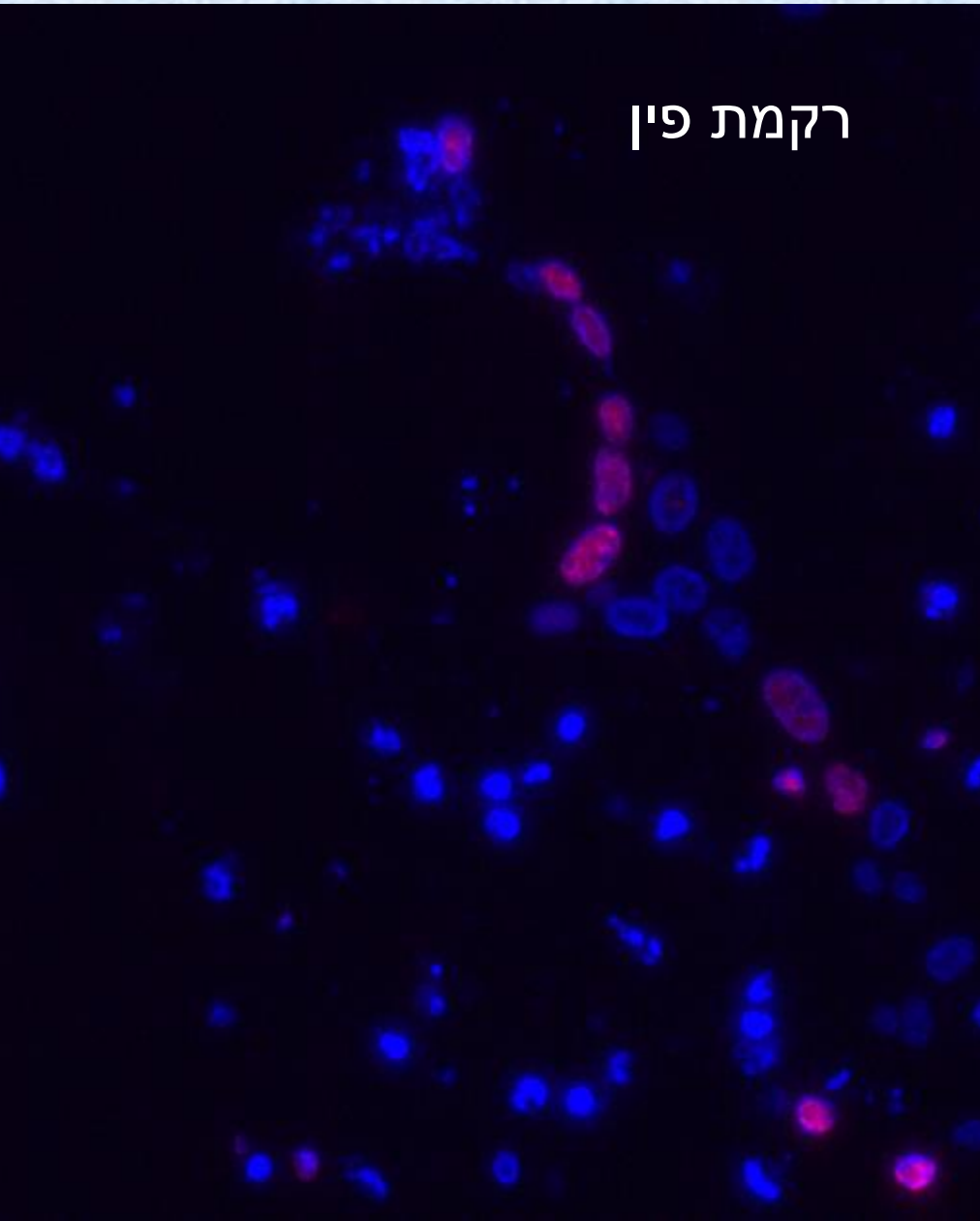
הרפס 4 מתרבה ביעילות בחתכי הרקמה

רקמת בושת – מוקדי התרבות הנגיף ברקמה
שימוש בגלאי פלואורסטנטי (FISH)

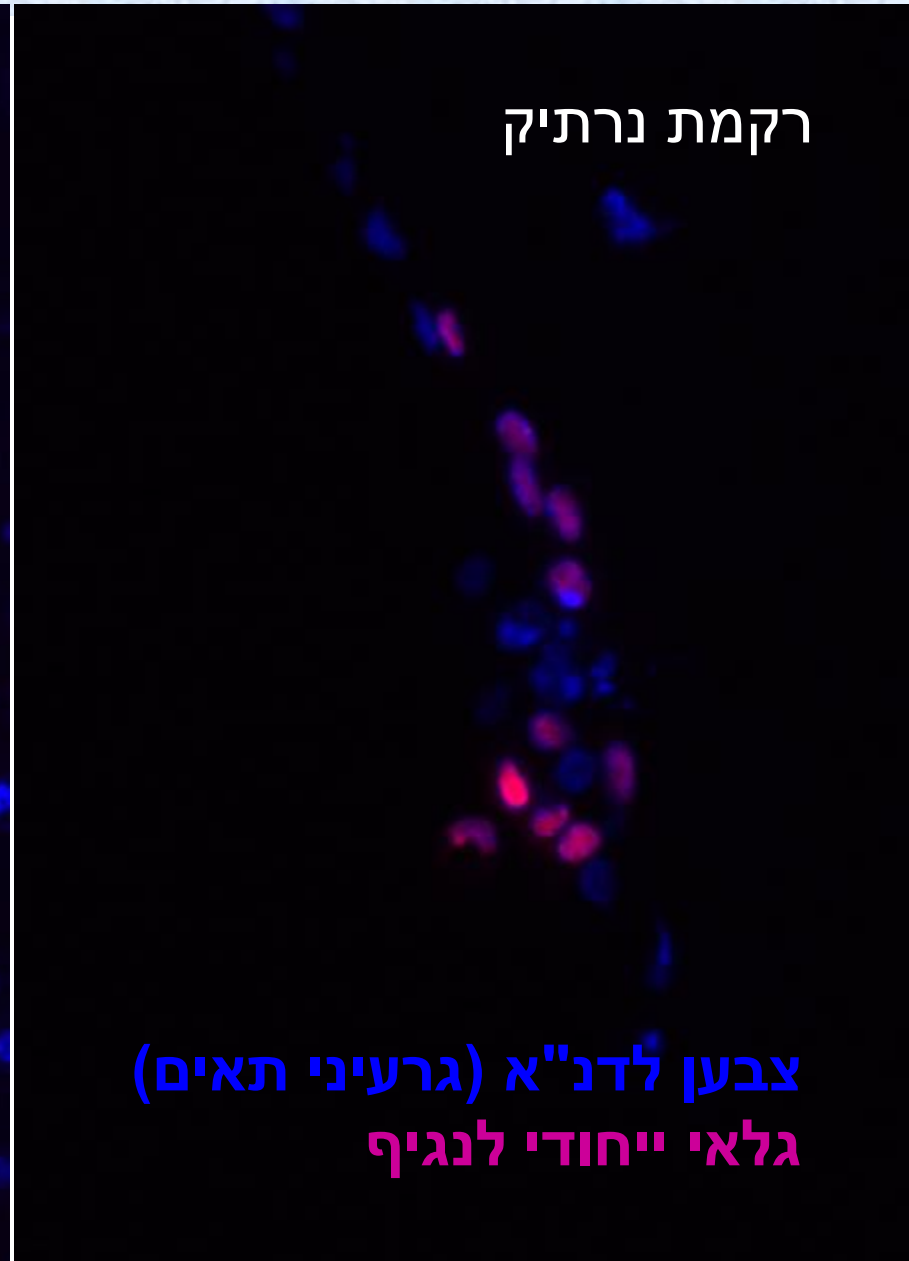


צבען לדנ"א (גרעיני תאים)
גלאי ייחודי לנגיף

הרפס 4 מתרבה ביעילות בחתכי הרקמה



רקמת פין



רקמת נרתיק

צבען לדנ"א (גרעיני תאים)
גלאי ייחודי לנגיף

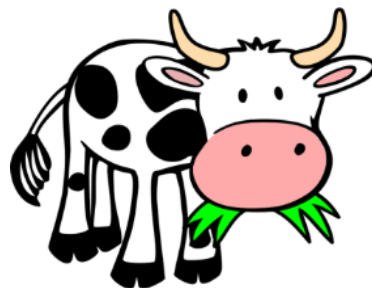
הרפס 4 בבקר : סיכום

- הנגיף בודד מדלקות בושת ונרתיק בפרות
- הנגיף מתרבה ביעילות בתרביות תאים ראשוניות שהוכנו מרקמות ממערכת המין של בקר
- הצלחנו לקיים חתכי רקמה מבקר בתנאים חוץ-גופיים
- הנגיף מתרבה ביעילות בחתכי הרקמה ומופרש למצע הגידול
- ניתן לעקוב אחר התרבות הנגיף בחתכי הרקמה ע"י גלאי פלואורסצנטי
- התרבות הנגיף בתאים ובחתכי רקמה ממערכת המין הזכרית מעלה אפשרות, שהנגיף יכול להיות מועבר מינית מזכרים לנקבות

הרפס 4 בבקר: תכניות עתידיות

תרבויות חוץ- גופיות:

- לבחון את אופן התפשטות הנגיף ברקמות (טרופיזם, אופן מעבר בין תאים)
- לבחון השפעת הנגיף על חיות תאים ברקמה
- לבחון תגובת הרקמה להתרבות הנגיף בה (מערכת חיסון מולדת)
- בחינת יכולת עיכוב התרבות הנגיף ע"י סרום מבקר ממנו בודד הנגיף



תודות!

שו"ט בשדה לשכת

גליל-גולן

בוריס אבן טוב

ליאור זמיר

לשכת הר ושפלה

צביקה בן אור

"החקלאית"

אבי רם

ניר אלפרט

אילן דגוני

רפת גשור

רפת כפר - מנחם

המכון הווטרינרי

עזרא רוזנבלוט

אבי אלדר

אסף ברקוביץ

יבגני חניניץ'

בוריס גלמן

מריסול רובינשטיין- גואיני

אולגה זלסקי

סלסביל ותד

היברידיזציה באתר עם גלאי פלואורסצנטי:

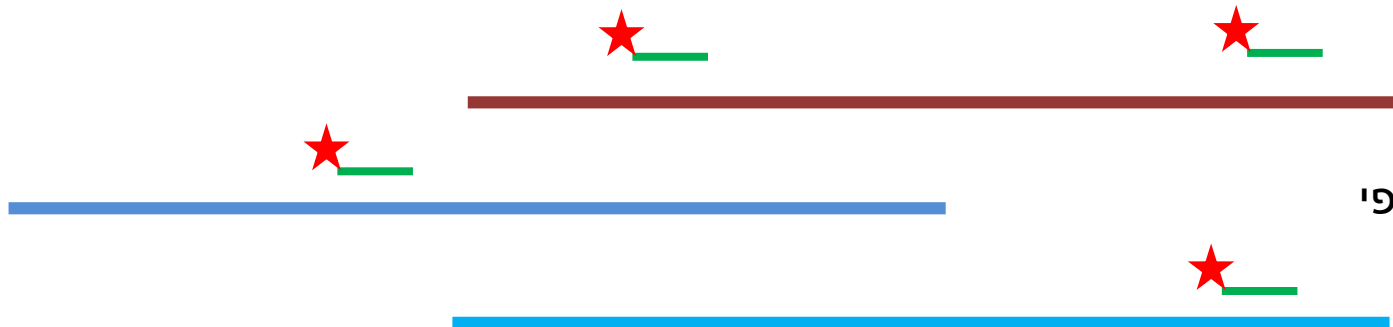
FISH – Fluorescent In Situ Hybridization

אות פלואורסצנטי חזק



קישור לתעתיק המטרה

אות פלואורסצנטי חלש



קישור לא ספציפי

בחירת תעתיק כסמן להדבקה בהרפס 4

	IE2	gB	RNA 1.7
שכיחות יחסית (RT-qPCR)	1	24	180

DIC

BoHV4-1.7
Quasar 570

DAPI

