

**ISPITIVANJE UTICAJA RAZLIČITIH ADJUVANASA NA IMUNOGENOST  
VAKCINE PROTIV VIRUSA PARAINFLUENCE 3 KOD GOVEDA\***  
*EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT ADJUVANTS ON THE  
IMMUNOGENICITY OF VACCINES AGAINST PARAINFLUENZA 3 VIRUS IN CATTLE*

Nišavić Jakov, Kustudić – Nikoletić Nataša, Milić Nenad, Zorić Andrea\*\*

*Cilj naših istraživanja je bilo ispitivanje uticaja različitih adjuvanasa na imunogenost vakcine protiv parainfluence virusa 3 kod goveda. U ispitivanjima je korišćena komercijalna vakcina *Respi-ol* protiv virusa *PI3* goveda, proizvođača *VZS* iz Subotice i eksperimentalna vakcina protiv navedenog virusa pripremljena sa gotovim adjuvansom *Emulsigen-om*. Ispitivanja su vršena na dve ogledne grupe teladi od po 12 životinja koje su dvokratno imunizovane u razmaku od 21 dan. Treća grupa teladi od ukupno 6 životinja je služila kao kontrola u ispitivanjima. Rezultati izvršenih ispitivanja su pokazali da je manja količina adjuvansa *Emulsigen-a* po dozi vakcine omogućavala postizanje zadovoljavajuće visine titra virus neutralizujućih antitela u uzorcima krvnog seruma vakcinisanih teladi u poređenju sa propisanom, većom količinom standardnog uljnog adjuvansa sadržanog u komercijalnoj vakcini *Respi-ol*.*

*Ključne reči: virus parainfluence 3, vakcine, adjuvans Emulsigen*

**Uvod / Introduction**

Virus parainfluence 3 izaziva respiratorne infekcije goveda, ovaca, konja i ljudi. Pripada familiji *Paramyxoviridae*, redu *Mononegavirales* i rodu *Respirovirus*. Posедуje jednonlačani molekul RNK i spoljašnji omotač – peplos u čijem sastavu se nalaze glikoproteinski hemaglutininsko-neuraminidazni i fuzioni antigeni koji imaju ključnu ulogu u procesu virusne infekcije ćelije. Virus parainfluence 3 je široko rasprostranjen u populaciji goveda. Izvor infekcije virusom parainfluence 3 (*PI3*) su obolele životinje koje putem sekreta iz respiratornog trakta prenose

\* Rad primljen za štampu 14.09.2016.

\*\* Dr sc. vet. med. Jakov Nišavić, profesor, Nataša Kustudić – Nikoletić, dr spec. vet., dr sc. vet. med. Nenad Milić, profesor, dvm Andrea Zorić, asistent, Katedra za Mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Srbija

infekciju na zdrave jedinke. Obolele životinje imaju povišenu temperaturu, dispneju, pojačano suzenje i serozni iscedak iz nosa. Navedeni simptomi bolesti traju tri do četiri dana posle čega uglavnom dolazi do potpunog oporavka obolele životinje, dok se kod teladi oboljenje najčešće manifestuje pojavom bronhopneumonije sa sekundarnom bakterijskom infekcijom što se uglavnom završava letalnim ishodom. Nespecifični faktori spoljašnje sredine kao što su uzgoj životinja u neadekvatnim uslovima smeštaja ili njihov transport u prenatrpanim prevoznim sredstvima, deluje predisponirajuće za izbijanje infekcije goveda virusom PI3 (Vainionpää i sar., 1994). Virus parainfluence 3 se najbolje umnožava u kulturama tkiva poreklom od teladi (bubreg) ili goveđeg fetusa (bubreg i pluća). Prvi znak razmnožavanja virusa PI3 u kulturi tkiva su citopatogene promene u vidu pojave ćelijskih sincicijuma. Citopatogene promene su bolje izražene ukoliko je virus dobro prilagođen kulturi tkiva. Virus PI3 izaziva aglutinaciju eritrocita zamorca, teleta, kokoši, čoveka, ovce, miša, pacova, majmuna, svinje i kunića. U cilju detekcije prisustva virusa PI3 u ispitivanom materijalu, u laboratorijskim uslovima, koriste se testovi hemaglutinacije i inhibicije hemaglutinacije, ELISA-test, test imunofluorescencije kao i molekularne metode laboratorijske dijagnostike (Morrison i sar. 2003, Harwood i sar., 2008, Gafer i sar., 2009, Šamanc i sar., 2009). Sprovođenje mera aktivne veštačke imunizacije goveda protiv infekcije izazvane virusom parainfluence 3 ima veliki ekonomski značaj imajući u vidu direktne i indirektne štete koje navedeno oboljenje izaziva u ekstenzivnoj i intenzivnoj govedarskoj proizvodnji. One se manifestuju pojavom uginuća, gubitkom telesne težine i smanjenjem prirasta kod obolelih jedinki. Iz navedenih razloga, danas se na farmama u Republici Srbiji sprovode mere aktivne veštačke imunizacije teladi i junadi protiv infekcije izazvane virusom parainfluence 3 (PI3).

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

##### **Vakcine**

Kao materijal u ispitivanjima korišćena je komercijalna vakcina Vakcina Respi-ol, proizvođača Veterinarskog zavoda Subotica. To je inaktivisana vakcina sa adjuvansom koji se sastoji od mineralnog ulja (Ondina), Arlacel-a A i Tween-a 85. Jedna doza vakcine Respi-ol od 5mL sadrži 3 mL adjuvansa, odnosno oko 60% po dozi.

Tokom ispitivanja je korišćena i eksperimentalna inaktivisana vakcina protiv virusa parainfluence 3 koja sadrži adjuvans Emulsigen (proizvođača MVP Technologies, SAD), čija koncentracija u jednoj dozi vakcine iznosi oko 20%. Obe vakcine sadrže isti titar vakcinalnih sojeva virusa parainfluence 3 od  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml.

### **Vakcinacija oglednih životinja**

Ispitivanje uticaja različitih adjuvanasa na imunogenost vakcine protiv virusa parainfluence 3 kod goveda su vršena na 30 eksperimentalnih teladi, starosti od 3 do 4 meseca, rase domaće šareno goveče u tipu simentalca, podeljenih na dve ogledne grupe od po 12 jedinki, dok je 6 oglednih teladi služilo kao kontrola u ispitivanjima. Prva ogledna grupa od 12 životinja je dvokratno vakcinisana sa komercijalnom vakcinom Respi-ol<sup>®</sup>, dok je druga ogledna grupa od 12 teladi dvokratno vakcinisana eksperimentalnom vakcinom protiv virusa parainfluence 3 sa Emulsigen<sup>®</sup> – om kao adjuvansom. Uzorci krvnog seruma obe ogledne grupe teladi i teladi iz kontrolne grupe prikupljeni su na dan vakcinacije, 21. dana od prve vakcinacije i 21. dana posle revakcinacije.

### **Referentni soj virusa PI3**

Za izvođenje testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa) u cilju utvrđivanja visine titra specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 korišćen je referentni soj SD2 virusa parainfluence 3, titra od  $4 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml umnožen na primarnoj kulturi tkiva telećeg bubrega.

### **Uzorci krvnog seruma vakcinisane teladi**

Uzorci krvnog seruma teladi prikupljeni su na dan vakcinacije, 21. dana od prve vakcinacije i 21. dana posle revakcinacije venepunkcijom vene jugularis. Sakupljeni uzorci krvog seruma teladi su zatim čuvani u epruvetama na sobnoj temperaturi u cilju izdvajanja seruma.

### **Ispitivanje hemaglutinacionih aktivnosti virusa parainfluence 3**

Hemaglutinaciona aktivnost virusa PI3 je ispitivana standardnom metodom direktne hemaglutinacije po B. Mihajloviću (1984). U sva udubljenja mikrotitracionih ploča sa „U“ dnom, najpre je sipano po 25 $\mu$ l rastvarača PBS-a. U prva udubljenja mikrotitracionih ploča je zatim dodato po 25 $\mu$ l suspenzije virusa PI3. Ove dve tečnosti su izmešane da bi zatim količina od 25 $\mu$ l tečnosti bila preneti u sledeće udubljenje mikroploče i tako redom do 11. bazenčića iz koga je odbačeno 25 $\mu$ l tečnosti. U sva udubljenja je posle toga dodato po 25 $\mu$ l PBS-a, čime je postignuta količina od po 50 $\mu$ l tečnosti u svakom udubljenju. Time je virus razređen od 1:4 do 1:4096. Dva bazenčića mikrotitracionih ploča su služila kao kontrola virusa i kontrola eritrocita. U sve bazenčiće mikroploče je zatim dodato po 50 $\mu$ l 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Ploča je blago protresana radi homogenizacije sadržaja i inkubisana na sobnoj temperaturi tokom vremenskog perioda od 40 minuta. Posle završene inkubacije očitavani su rezultati.

### Test inhibicije hemaglutinacije (HI test)

Određivanje titra specifičnih antitela protiv antigena virusa PI3 u uzorcima krvnog seruma ogleđnih goveda vršeno je standardnom metodom inhibicije hemaglutinacije (HI testa) po B. Mihajloviću, 1984. Za izvođenje ove reakcije neophodno je pripremiti razređenje antigena-virusa koje sadrži 4HJ (hemaglutinacione jedinice). Ako je titar virusa u reakciji hemaglutinacije bio, na primer, 1:128, treba ga razrediti na sledeći način:  $128:4=1/32$ . U sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano je po 25 $\mu$ l PBS-a, posle čega je u prve bazenčiće mikroploče pojedinačno dodato po 25 $\mu$ l uzoraka krvnog seruma goveda, koji su prvo izmešani sa rastvaračem PBS-om, a zatim su u količini od 25 $\mu$ l preneti kroz naredna udubljenja mikroploče sa PBS-om čime su dobijena razređenja seruma od početnog 1:2 do 1:512. U sva udubljenja su zatim dodati uzorci od po 25 $\mu$ l virusa koji sadrže po 4HJ/0,1ml. Poslednja tri bazenčića mikrotitracione ploče služila su kao kontrola virusa, eritrocita i seruma. Ovako pripremljene mikrotitracione ploče su inkubisane u vremenskom periodu od 30 minuta na sobnoj temperaturi posle čega je u sve bazenčiće mikrotitracione ploče sipano po 50 $\mu$ l 0,5% suspenzije eritrocita zamorca. Posle 45 minuta inkubisanja uzoraka na sobnoj temperaturi, očitavani su rezultati.

### Analiza dobijenih rezultata

Analiza dobijenih rezultata vršena je komparacijom srednjih vrednosti HI titra specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 utvrđenih u ispitivanim uzorcima krvnog seruma eksperimentalne teladi izraženih kao  $-\log_2 n$  (1:2 = 1, 1:4 = 2 itd).

#### Rezultat / Results

Uzorci krvnog seruma svih ogleđnih grupa teladi ispitani su na dan vakcinacije na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 primenom testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa). Kod kontrolne grupe od 6 životinja visine titra specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 iznosile su na dan vakcinacije 1:0. Kod tri uzorka krvnog seruma poreklom od teladi iz prve ogleđne grupe na dan vakcinacije komercijalnom vakcinom Respi-ol ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PI3 čiji su titri pojedinačno iznosili 1:8, 1:16 i 1:32. Visina titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma ostalih životinja iz prve ogleđne grupe na dan vakcinacije navedenom vakcinom je iznosila 1:0. Kod druge ogleđne grupe teladi na dan vakcinacije eksperimentalnom vakcinom protiv virusa PI3 sa adjuvansom Emulsigen<sup>®</sup>-om, visina titra specifičnih antitela je iznosila 1:0, a kod jednog teleta 1:2 (Tabela 1).

Posle 21 dan od vakcinacije, prikupljeni su uzorci krvnog seruma od teladi iz obe ogleđne grupe i teladi iz kontrolne grupe. Kod kontrolne grupe od 6 životinja visina titra specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 iznosila je 1:0, izuzev jednog teleta kod koga je ustanovljena visina titra specifičnih antitela koja je iznosila 1:8. Kod ogleđne grupe teladi vakcinisane komercijalnom vakcinom Respi-ol u

Tabela 1. Rezultati visine titra specifičnih antitela protiv virusa P13 na dan vakcinacije  
 Table 1. Results of the titre height of specific antibodies against virus P13 on the day of vaccination

Redni broj Number	Titir specifičnih antitela protiv virusa P13 ustanovljen na dan vakcinacije Titre height of specific antibodies against virus P13 found on the day of the vaccination					
	Kontrola Control		Vrednosti titra specifičnih antitela protiv virusa P13 u uzorcima krvnog seruma teladi na dan vakcinacije Respi-ol vakcinom Specific antibodies against virus P13 titre values in calves blood serum samples on the day of vaccination with Respi-ol vaccine		Vrednosti titra specifičnih antitela protiv virusa P13 u uzorcima krvnog seruma teladi na dan vakcinacije eksperimentalnom vakcinom sa gotovim adjuvansom Emulsigen-om Specific antibodies against virus P13 titre values in calves blood serum samples on the day of vaccination with experimental vaccine with completed adjuvant Emulsigen	
	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result
1	55	1:0	61	1:0	73	1:0
2	56	1:0	62	1:0	74	1:0
3	57	1:0	63	1:8	75	1:0
4	58	1:0	64	1:0	76	1:0
5	59	1:0	65	1:0	77	1:0
6	60	1:0	66	1:0	78	1:0
7			67	1:0	79	1:2
8			68	1:0	80	1:0
9			69	1:32	81	1:0
10			70	1:0	82	1:0
11			71	1:0	83	1:0
12			72	1:16	84	1:0
Srednja vrednost titra izraženih kao $-\log_2$ Mean value of the titre expressed as $-\log_2$	0		1		0.08	

\*ID – identifikacioni broj

Tabela 2. Rezultati visine titra specifičnih antitela virusa protiv PI3 21 dan posle vakcinacije  
 Table 2. Results of the titre height of specific antibodies against virus PI3 on the 21st day after

Redni broj Number	Visine titra specifičnih antitela protiv virusa PI3 ustanovljene 21. dana posle vakcinacije Titre height of specific antibodies against virus PI3 found on the 21st day after the vaccination					
	Kontrola Control		Respi-ol® vakcina Respi-ol® vaccine		Eksperimentalna vakcina sa adjuvansom Emulsigen Experimental vaccine with adjuvant Emulsigen	
	Identifikacioni broj grla Cattle ID	Rezultat Result	Identifikacioni broj grla Cattle ID	Rezultat Result	Identifikacioni broj grla Cattle ID	Rezultat Result
1	55	1:0	61	1:128	73	1:64
2	56	1:0	62	1:64	74	1:128
3	57	1:0	63	1:128	75	1:128
4	58	1:8	64	1:128	76	1:64
5	59	1:0	65	1:128	77	1:128
6	60	1:0	66	1:32	78	1:0
7			67	1:128	79	1:64
8			68	1:128	80	1:128
9			69	1:128	81	1:64
10			70	1:128	82	1:64
11			71	1:64	83	1:128
12			72	1:128	84	1:64
Srednja vrednost titra izraženih kao – log <sub>2</sub> Mean value of the titre expressed as – log <sub>2</sub>	0.5 0.5		6.66 SD 0.65 6.66 SD 0.65		5.92 SD 1.93 P vrednost 0.2152 5.92 SD 1.93 P value 0.2152	

uzrocima krvnog seruma utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PI3 čiji su se titri kretali od 1:32 do 1:128. Kod ogledne grupe teladi vakcinisane eksperimentalnom vakcinom protiv virusa PI3 sa adjuvansom Emulsigen®-om visine titra specifičnih antitela kretale su se od 1:64 do 1:128 (Tabela 2).

Srednja vrednost titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma teladi protiv virusa PI3 izraženih kao  $-\log_2$  je iznosila za kontrolnu grupu 0.5, za oglednu grupu teladi vakcinisanu komercijalnom vakcinom Respi-ol 6.66 i 5.92 za oglednu grupu vakcinisanu eksperimentalnom vakcinom sa adjuvansom Emulsigen®-om.

Tabela 3. Rezultati visine titra specifičnih antitela protiv PI3 42 dana nakon vakcinacije  
Table 3. Results of the titre height of specific antibodies against virus PI3 42 days after

Redni broj Number	Visine titra specifičnih antitela protiv virusa PI3 ustanovljene 42 dana posle vakcinacije <i>Titre height of specific antibodies against virus PI3 42 days after vaccination</i>					
	Kontrole Control		Vakcina Respi-ol® Respi-ol® vaccine		Eksperimentalna vakcina sa adjuvansom Emulsigen-om <i>Experimental vaccine with adjuvant Emulsigen</i>	
	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result	ID* grla Cattle ID*	Rezultat Result
1	55	1:0	61	1:256	73	1:64
2	56	1:0	62	1:256	74	1:128
3	57	1:0	63	1:256	75	1:256
4	58	1:8	64	1:256	76	1:256
5	59	1:0	65	1:128	77	1:256
6	60	1:0	66	1:64	78	1:0
7			67	1:256	79	1:256
8			68	1:256	80	1:256
9			69	1:256	81	1:128
10			70	1:256	82	1:128
11			71	1:256	83	1:256
12			72	1:256	84	1:256
Srednja vrednost titra izraženih kao $-\log_2$ Statistička značajnost Student t test <i>Mean value of titre expressed as <math>-\log_2</math> Statistical significance Student t test</i>	0.5 0.5		7.75 SD 0.62 7.75 SD 0.62		6.92 SD 2.27 P vrednost = 0.2338 6.92 SD 2.27 P value = 0.2338	

\*ID – identifikacioni broj / identification number

Posle 42 dana od vakcinacije, odnosno 21 dan od revakcinacije prikupljeni su uzorci krvnog seruma od teladi iz obe ogledne grupe i teladi iz kontrolne grupe. Kod kontrolne grupe od 6 životinja visina titra specifičnih antitela protiv virusa parainfluence 3 iznosila je 1:0, izuzev jednog teleta kod koga je ustanovljena visina titra specifičnih antitela koja je iznosila 1:8. Kod ogledne grupe teladi vakcinisane komercijalnom vakcinom Respi-ol® u uzorcima krvnog seruma utvrđeno je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa PI3 čije su se visine titara antitela kretale od 1:64 do 1:256. Kod ogledne grupe teladi vakcinisane eksperimentalnom vakcinom protiv virusa PI3 sa adjuvansom Emulsigen®-om visine titra specifičnih antitela kretale su se od 1:64 do 1:256 (Tabela 3).

Srednja vrednost titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma teladi protiv virusa PI3 izraženih kao  $-\log_2$  je 42. dana od vakcinacije iznosila 7.75 u uzorcima krvnog seruma teladi vakcinisanih standardnom vakcinom, odnosno 6.92 u serumima jedinki vakcinisanih eksperimentalnom vakcinom sa adjuvansom Emulsigen®-om.

Analizom varijanse primenom Student t testa utvrđivana je razlika između vrednost titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma teladi protiv virusa PI3, izraženih kao  $-\log_2$ , vakcinisanih standardnom vakcinom, odnosno eksperimentalnom vakcinom sa adjuvansom Emulsigen®-om. Izračunata P vrednost razlike vrednosti titra specifičnih antitela 21. dana nakon vakcinacije standardnom i eksperimentalnom vakcinom iznosila je 0.2152, a 42. dana nakon prve vakcinacije i 21. dana od revakcinacije iznosila je 0.2338. Dobijene vrednosti pokazuju da nema statistički značajne razlike vrednost titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma teladi protiv virusa PI3 vakcinisanih standardnom i eksperimentalnom vakcinom sa adjuvansom Emulsigen®-om.

#### **Diskusija / Discussion**

Peters i sar. (2004.) su vršili ispitivanje dužine trajanja imuniteta nakon aplikacije četvorovalentne vakcine protiv goveđeg herpesvirusa 1, virusa parainfluence 3 goveda, virusa goveđe virusne dijareje i goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa. Ispitivanja su vršena na teladima kojima nije uskraćen kolostrum. Telad uzrasta između 7 nedelja i 6 meseci su pojedinačno dvokratno vakcinisane komercijalnom četvorovalentnom vakcinom u razmacima od 21 dan, a 6 do 12 meseci posle vakcinacije izvršen je ogled veštačke infekcije životinja viruslentnim sojevima virusa sadržanih u vakcini. Dužina trajanja imuniteta protiv goveđeg herpesvirusa 1, virusa parainfluence 3 goveda i virusa goveđe virusne dijareje iznosila je preko 6 meseci, dok je trajanje imuniteta protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa trajao i do 12 meseci od imunizacije. McGonigle i sar. (2006) su vršili poređenje uticaja različitih adjuvanasa u stimulaciji imunološkog odgovora organizma na virus svinjskog gripa. Vakcinisano je ukupno 36 seronegativnih jedinki, starosti od tri nedelje, koje su bile podeljene u 6 grupa. Prve četiri grupe oglednih životinja su imunizovane vakcinama u čijem



su sastavu bili inaktivisani, liofilizovani H1N1 i H3N2 sojevi antigena svinjskog gripa i adjuvansi: Emulsigen<sup>®</sup>-D, Emulsigen<sup>®</sup>-BCL, Emulsigen<sup>®</sup> sa aluminijum hidroksidom i Polygen<sup>®</sup>. Peta grupa ogleđnih životinja je bila vakcinisana komercijalnom vakcinom protiv svinjskog gripa, dok je šesta grupa životinja primila placebo vakcinu (samo PBS). Sve životinje su 0. dana bile vakcinisane sa po 2 mL vakcine, a 21. dana revakcinisane istom dozom. Krv im je vađena 0., 21. i 42. dana ogleđda radi izvođenja testa inhibicije hemaglutinacije (HI testa). Rezultati su pokazali da su sve vakcine sa adjuvansima izazvale stvaranje imuniteta kod vakcinisanih životinja protektivnog karaktera, s tim da je kod životinja koje su bile vakcinisane vakcinama koje sadrže Emulsigen<sup>®</sup>-D i Emulsigen<sup>®</sup>-BCL, titar specifičnih antitela bio značajno viši u odnosu na kontrolnu (petu) grupu. Na osnovu rezultata ovih ispitivanja moglo se zaključiti da su Emulsigen<sup>®</sup>-D i Emulsigen<sup>®</sup>-BCL adjuvansi izbora koji poboljšavaju imunostimulatorno dejlovanje vakcine posle imunizacije životinja. Rezultati naših ispitivanja ukazuju na postojanje pozitivnog uticaja gotovog adjuvansa Emulsigen<sup>®</sup>-a na imunogenost vakcine protiv virusa PI3. Utvrđeno je da manja koncentracija adjuvansa E<sup>®</sup>-a po dozi vakcine izaziva postizanje zadovoljavajućeg titra antitela u uzorcima krvnog seruma imunizovane teladi u poređenju sa visinom titra antitela u uzorcima krvnog seruma životinja posle imunizacije vakcinom Respi-ol sa većom koncentracijom adjuvansa po jednoj dozi vakcine. U svojim istraživanjima Salt i sar. (2007) su ispitivali efikasnost polivalentne vakcine sa protiv infekcije goveda izazvane goveđim herpesvirusom 1, (BHV 1), virusom parainfluence 3 (PI3), virusom goveđe dijareje (BVDV) i goveđim respiratornim sincicijalnim virusom (BRSV) sa uljanim adjuvansom. Navedena ispitivanja su vršena na teladima starosti od 2 do 9 meseci koja su bila podeljena na dve ogleđne grupe od po 9-15 životinja. Prva grupa ogleđne teladi je dvokratno imunizovana u razmaku od tri nedelje, dok je druga ogleđna grupa nevakcinisane teladi, tretirana sterilnim slanim rastvorom (placebom), služila kao kontrolna grupa životinja. Tri do pet nedelja posle druge vakcinacije, izvršen je ogleđd veštačke infekcije imunizovanih teladi virulentnim sojem virusa parainfluence 3. Životinje su klinički opservirane najmanje dve nedelje. U uzorcima krvnog seruma ogleđnih teladi je ustanovljeno povećanje visine titra specifičnih antitela protiv navedenih vrsta virusa i skraćenje vremenskog perioda izlučivanja vakcinalnog soja virusa iz organizma vakcinisanih životinja što je bilo praćeno pojavom blagih kliničkih simptoma oboljenja prolaznog karaktera. Slična istraživanja su vršili Stilwell i sar. (2008.) su ispitivali efikasnost polivalentne vakcine Rispoval 41 protiv goveđeg herpesvirusa 1, goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa, virusa goveđe dijareje i parainfluenca 3 virusa, pripremljene sa uljanim adjuvansom. Ukupno je vakcinisano 120 ogleđnih teladi i revakcinisano u periodu od 21 do 27 dana od vakcinacije, dok je drugih 148 kontrolnih teladi tretirano sa fiziološkim rastvorom. Posle vakcinacije teladi je izvršen ogleđd veštačke infekcije virulentnim sojevima prethodno navedenih vrsta virusa. Kod vakcinisanih životinja je posle izvođenja ogleđda veštačke infekcije utvrđen nizak stepen morbiditeta i mortaliteta. Xue i sar. (2010) koji su ispitivali imunogenost modifikovane žive vakcine protiv virusa goveđe dijareje tipa 1 i 2, goveđeg herpesvirusa 1, virusa parainfluence 3

i goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa posle njene intranazalne aplikacije ogleđnim teladima od 3 do 8 dana starosti. Posle 3-5 nedelja od imunizacije, telad su veštački inficirana virulentnim sojevima navedenih vrsta virusa. Rezultati ispitivanja su potvrdili značajno smanjenje intenziteta kliničkih simptoma bolesti kod vakcinisane i veštački inficirane teladi. Pored ovoga, kod ovih životinja je ustanovljeno značajno smanjenje ekskrecije virusa u spolajšnju sredinu. Rezultati naših ispitivanja su pokazali da nema značajnijih razlika u visini titara specifičnih antitela protiv virusa PI3 u uzorcima krvnog seruma ogleđne teladi vakcinisane komercijalnom Respi-ol vakcinom i eksperimentalnom vakcinom sa gotovim adjuvansom Emulsigen. Kod dve vakcinisane životinje titar antitela je bio veći kod vakcinacije eksperimentalnom vakcinom i iznosio je 1:128, kod tri imunizovana teleta je bio isti i iznosio je 1:128, dok je kod šest teladi bio manji i iznosio je 1:64 u odnosu na vrednosti titara specifičnih antitela u poređenju sa onim utvrđenim u uzorcima krvnog seruma teladi imunizovanih komercijalnom vakcinom Respi-ol. Prethodno navedeni rezultati pokazuju da je eksperimentalna vakcina sa gotovim adjuvansom u koncentraciji od 20% po dozi vakcine omogućila postizanje zadovoljavajuće visine titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma imunizovanih životinja. Rezultati ispitivanja visine titra specifičnih antitela u uzorcima krvnog seruma ogleđnih teladi protiv virusa PI3 posle 21 od revakcinacije su pokazali veći nivo titra antitela u uzorcima krvnog seruma kod pet životinja vakcinisanih Respi-ol vakcinom u poređenju sa titrom antitela postignutim korišćenjem eksperimentalne vakcine sa gotovim adjuvansom, dok je kod šest teladi titar bio isti i kod teladi vakcinisanih komercijalnom i eksperimentalnom vakcinom, dok je kod jednog teleta ustanovljen veći titar antitela utvrđen posle imunizacije eksperimentalnom vakcinom. Dobijeni rezultati su pokazali da je eksperimentalna vakcina sa Emulsigen-om kao adjuvansom u koncentraciji od 20% po dozi vakcine u poređenju sa rezultatima vakcinacije ogleđne teladi komercijalnom vakcinom, omogućila postizanje sličnih ili istih vrednosti visine titra antitela u uzorcima krvnog seruma imunizovanih životinja. Iako predmet ovih ispitivanja nije bio način pripreme i opis proizvodnje vakcina korišćenih u njima, može se reći da bi eventualno korišćenje gotovog adjuvansa u pripremi vakcine moglo ubrzati proces njene proizvodnje i smanjiti troškove proizvodnje preparata, a da pri tom biološki efekti aplikacije dobijenog proizvoda ne budu različiti u odnosu na one koji su postignuti korišćenjem već postojećih komercijalnih vakcina, što su naša ispitivanja i potvrdila.

#### Literatura / References

1. Gafer JAM, Husein HA, Reda IM. Isolation and identification of PI3 virus from sheep and goats. *International Journal of virology*. 2009; 5 (1) 28 – 35.
2. Gupta RK, Rost BE. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. In: O'Hagan DT, ed. *Methods in Molecular Medicine. Vaccine Adjuvants—Preparation Methods and Research Protocols*. Totowa NJ: Humana Press. 2000; 42: 65-89. 2000.
3. Horwood PF, Graveland JL, Mahony TJ. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *Journal of General Virology*. 2008; 89: 1643-48.

4. McGonigle JD, Lin BC, Brown KK, White RG, Siedlik LM, Hrabrik CM. Comparison of adjuvants for stimulation of HI antibody to SIV. Proceedings of the 19<sup>th</sup> IPVS Congress, Copenhagen, Denmark, 2006. Volume 2.
5. Mihajlović B. Priručnik za laboratorijsku dijagnostiku – standardizacija dijagnostičkih metoda za bakterijske, virusne i parazitske bolesti životinja čije je suzbijanje propisano zakonom. Beograd, 1984.
6. Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 1614: 73-84.
7. Peters AR, Thevasagayam SJ, Viceman A, Salt JS. Duration of immunity of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. *Preventive veterinary medicine*. 2004; 66(1-4):63-77.
8. Salt JS, Thevasagayam SJ, Wiseman A, Peters AR. Efficacy of a quadrivalent vaccine against respiratory diseases caused by BHV-1, PI3V, BVDV and BRSV in experimentally infected calves. *Veterinary Journal*. 2007; 174 (3): 616-26.
9. Stilwell G, Matos M, Carolino N, Lima MS. Effect of a quadrivalent vaccine against respiratory virus on the incidence of respiratory disease in weaned beef calves. *Prev. vet. med.* 2008; 85(3-4):151-7.
10. Šamanc H, Milić N, Stojić V, Knežević D, Vujanac I, Dimitrijević B, Nišavić J, Radojičić M. Utvrđivanje prisustva antitela protiv goveđeg respiratornog sincicijalnog virusa (BRSV), virusa parainfluenze 3 (Pi3) i goveđeg herpesvirusa 1 (BHV 1) u krvnom serumu junadi primenom indirektno imunoenzimske probe. *Veterinarski glasnik*. 2009; 63(3-4):145-52.
11. Vainionpää R, Hyypia T. Biology of parainfluenza viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1994; 265-75.
12. Xue W, Ellis J, Mattick D, Smith L, Brady R, Trigo E. Immunogenicity of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in young calves. *Vaccine*. 2010; 28(22):3784-92.

ENGLISH

**EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF DIFFERENT ADJUVANTS ON THE IMMUNOGENICITY OF VACCINES AGAINST PARAINFLUENZA 3 VIRUS IN CATTLE**

**Nišavić Jakov, Kustudić – Nikoletić Nataša, Milić Nenad, Zorić Andrea**

The objective of our research was to examine the influence of different adjuvants on immunogenicity of vaccine against parainfluenza 3 virus in cattle. In the research there was used the commercial vaccine *Respi-ol* against PI3 virus in cattle, produced by VZS from Subotica as well as the experimental vaccine against the same virus prepared with completed adjuvant *Emulsigen*. The research was performed on two experimental groups of 12 calves each. The animals were immunized twice, in the interval of 21 days. The third group of 6 calves was a control. The results of the research showed that a smaller amount of adjuvant *Emulsigen* per vaccine dose provided a satisfactory height of titre of virus neutralizing antibodies in the blood serum samples of vaccinated calves in regard to prescribed greater amount of standard oil adjuvant contained in commercial *Respi-ol* vaccine.

Key words: parainfluenza 3 virus, vaccine, adjuvant *Emulsigen*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ АДЬЮВАНТОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ПАРАГРИППА-3 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**Нишавич Яков, Кустудич – Николетич Наташа, Милич Ненад, Зорич Андреа**

Целью наших исследований являлось изучение влияния различных адьювантов на иммуногенность вакцины против вируса парагриппа-3 у крупного рогатого скота. При проведении исследований использовалась коммерческая вакцина Respi-ol против вируса PI-3 крупного рогатого скота, производства компании VZS, г. Суботица, и экспериментальная вакцина против указанного вируса, изготовленная с использованием готового адьюванта Emulsigen. Исследования проводились на двух экспериментальных группах телят из 12 животных, которые подвергались двукратной иммунизации с интервалом 21 день. Третья группа телят, состоящая из 6 животных, являлась контрольной группой. Результаты проведенных исследований показали, что меньшее количество адьюванта Emulsigen на дозу вакцины обеспечивало достижение удовлетворительного уровня титра нейтрализующих вирус антител в образцах сыворотки крови вакцинированных телят при сопоставлении с рекомендуемым, большим количеством стандартного масляного адьюванта, содержащимся в коммерческой вакцине Respi-ol.

Ключевые слова: вирус парагриппа-3, вакцины, адьювант Emulsigen