

**UPOREDNO ISPITIVANJE IMUNOLOŠKOG ODGOVORA
TELADI U RAZLIČITIM INTERVALIMA IZMEĐU PRIMARNE
I SEKUNDARNE IMUNIZACIJE INAKTIVISANOM VAKCINOM
PROTIV GOVEĐEG HERPES VIRUSA-1***

*COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF IMMUNE RESPONSE OF
CALVES AT DIFFERENT INTERVALS BETWEEN PRIMARY AND
SECONDARY IMMUNIZATION USING INACTIVATED BOVINE
HERPESVIRUS 1 VACCINE*

**D. Bugarski, T. Petrović, S. Boboš, Dubravka Milanov, D. Orlić,
M. Radinović, S. Lazić****

Goveđi herpesvirus-1 (BHV-1) je jedan od značajnijih uzročnika infekcija respiratornog sistema goveda i u suzbijanju ove infekcije imunoprofilaksa ima ključnu ulogu. Intenzitet imunološkog odgovora protiv BHV-1 nakon imunizacije inaktivisanim komercijalnim vakcinama varira zavisno od vrste vakcine, ali se generalno smatra da pružaju dobru zaštitu od razvoja kliničkog oblika infekcije i da su bezbedne. U radu je prikazan razvoj humoralnog imunološkog odgovora kod teladi u tovu koja su imunizovana protiv goveđeg herpesvirusa-1 (BHV-1) u različitim intervalima između primarne i sekundarne imunizacije. Telad je vakcinisana komercijalnom vakcinom, a zatim podeljena u dve grupe koje su revakcinisane 14, odnosno 21. dana. Tokom 120 dana trajanja oglada, krv i nosna sluz su uzorkovani 11 puta. Uzorci krvnih seruma su ispitani na antitela za BHV-1 testom neutralizacije virusa (VN), a uzorci nosne sluzi VN testom i ELISA metodom. Nakon revakcinacije utvrđen je porast titra antitela u krvi svih oglednih životinja i on se održao na visokom nivou sve do kraja ispitivanja (120. dan). U krvnim serumima, srednje vrednosti titra antitela utvrđene su 30. dana kod grupe revakcinisane 14. dana i 45. dana kod grupe revakcinisane 21. dana. U nosnoj sluzi,

* Rad primljen za štampu 19. 03. 2012. godine

** Dejan Bugarski, T. Petrović, Naučni institut za veterinarstvo "Novi sad", Novi Sad; S. Boboš, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad; Dubravka Milanov, D. Orlić, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad; M. Radinović, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad; S. Lazić, Naučni institut za veterinarstvo „Novi sad”, Novi Sad

testom neutralizacije virusa, antitela su najranije utvrđena 14 dana posle vakcinacije, a ELISA metodom tek nakon revakcinacije. Najviši titar antitela u nosnoj sluzi utvrđen je 45. dana u grupi revakcinisanoj 21. dana i 120. dana u grupi revakcinisanoj 14. dana. U odnosu na utvrđene vrednosti titra antitela, revakcinacija teladi inaktivisanom vakcinom protiv BHV-1 može se izvesti već 14. dana.

Ključne reči: anti BHV-1 vakcine, revakcinacija, antitela

Uvod / Introduction

Govedi herpesvirus-1 (BHV-1) je jedan od značajnijih uzročnika infekcija respiratornog sistema goveda i u suzbijanju ove infekcije imunoprofilaksa ima ključnu ulogu (Jones i Chowdhury, 2008). Razvoj različitih tipova vakcina protiv BHV-1 je konstantan od pedesetih godina XX veka, a klasične atenuirane i inaktivisane vakcine i dalje imaju svoju primenu, naročito u preventivi respiratornog sindroma junadi u tovu. Intenzitet imunog odgovora protiv BHV-1 nakon imunizacije inaktivisanim komercijalnim vakcinama varira zavisno od vrste vakcine, ali se generalno smatra da pružaju dobru zaštitu od razvoja kliničkog oblika infekcije i da su bezbedne (Soulebot i sar., 1982; Patel, 2005). Nedostatak zbog kojeg se inaktivisane vakcine smatraju manje efikasnim, odnosi se na duži vremenski period potreban da se postigne odgovarajuća zaštita (Van Drunen Littel – Van Den Hurk i sar. 1993), a kod teladi koja su tek primljena u tovilište, neophodno je obezbediti odgovarajuću zaštitu u najkraćem vremenu. Imunološki odgovor na inaktivisane vakcine odlikuje stvaranje pretežno IgG₁ izotipa, niska proliferacija limfocita i niska koncentracija interferona (Pontarollo i sar., 2002). Revakcinacijom se postiže pojačano stvaranje antitela i povećanje njihovog aviditeta (Özkul i sar., 2008), što je takođe od značaja u zaštiti od virusnih infekcija (Delgado i sar., 2009). Stoga se u praksi postavlja pitanje koji je vremenski interval potreban između primarne i sekundarne imunizacije kako bi se postigla željena zaštita u što kraćem vremenu. Interval između vakcinacije i revakcinacije protiv BHV-1 nije tačno definisan i proizvođači vakcina daju različite preporuke, ali se smatra da ne treba da bude kraći od 30 dana (Patel, 2005; Straub, 2007). Dosadašnja praksa u pogledu sekundarne imunizacije protiv BHV-1 se svodi na različito određivanje vremena između dve imunizacije atenuiranim ili inaktivisanim vakcinama – 3 nedelje (Lazić i sar., 2001; Castrucci i sar., 2002; Salt i sar., 2007; Stillwel i sar., 2008), 4 nedelje (Kaashoek i sar., 1995; Patel i sar., 2005) ili duže (Petzhold i sar., 2001). Cilj ovog rada je praćenje razvoja humoralnog imunološkog odgovora kod teladi u tovu primenom inaktivisane anti BHV-1 vakcine u različitim intervalima revakcinacije.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ogledne životinje / Experimental animals

Ispitivanja su izvedena na teladi simentalske rase uzrasta 4-5 meseci i prosečne telesne mase između 200 kg i 250 kg. Dvadeset šest teladi je podeljeno u 3 grupe – po 10 u dve ogledne grupe i 6 u kontrolnoj grupi. Telad je smeštena u izolovan prostor komercijalnog tovilišta. U uzorcima krvnih seruma sve teladi pre početka ogleda nije utvrđeno prisustvo antitela protiv BHV-1.

Imunizacija / Immunization

Telad oglednih grupa je vakcinisana supkutanom aplikacijom 5 mL vakcine Respi-ol® (Veterinarski zavod Subotica) prema uputstvu proizvođača. Vakcina sadrži inaktivisane viruse BHV-1 i Pi-3. U obe ogledne grupe vakcinacija je izvršena istog dana, a revakcinacija 14. dana (grupa S/c14) i 21. dana (grupa S/c21). Telad kontrolne grupe nije vakcinisana.

Uzorkovanje materijala za ispitivanje / Sampling of material for investigations

Kod teladi iz oglednih grupa, krv i nosna sluz su uzorkovani prvi put na dan vakcinacije (0 dan). U grupi S/c14, uzorkovanje je ponovljeno 4, 8, 14, 17, 19, 21, 28, 30, 45. i 120. dana ogleda, a u grupi S/c21 4, 8, 14, 21, 24, 26, 28, 30, 45. i 120. dana. Od teladi kontrolne grupe uzorci su uzeti 0, 14, 21, 30, 45. i 120. dana. Ovakav raspored uzorkovanja je uslovljen ispitivanjem pojave antitela u krvi i nosnoj sluzi nakon vakcinacije i revakcinacije i njihovom perzistencijom.

Krv je uzorkovana punkcijom *v. jugularis*, a nosna sluz upotrebom sterilnih tampona od sunđera, dimenzija 7 cm x 3 cm x 2,5cm. Tamponi su ubacivani u jednu nozdrvu odakle su vađeni nakon 10 minuta. Sluz je zatim ceđena u sterilne epruvete. Uzorci sluzi u kojima je bilo primesa krvi nisu uzimani za ispitivanje, već je postupak uzorkovanja bio ponovljen iz druge nozdrve.

U laboratoriji su uzorci nosne sluzi centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja na sobnoj temperaturi. Svi uzorci nosne sluzi i krvnih seruma su do početka ispitivanja čuvani na - 22°C.

Utvrđivanje antitela protiv BHV-1 / Establishing antibodies against BHV-1

Specifična antitela protiv BHV-1 u uzorcima krvnih seruma određivana su metodom virus-neutralizacije (VN), a u nosnoj sluzi VN i ELISA metodom. Za izvođenje metode VN korišćene su MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) ćelije supkultivisane 72 časa, tretirane rastvorom tripsin EDTA i resuspendovane u hranljivom medijumu za rast kultura ćelija (Eagel MEM, SIGMA Aldrich, USA) sa 10% fetalnog telećeg seruma. Koncentracija resuspendovanih ćelija koja je korišćena u radu je iznosila 300.000 ćelija u 1 ml medijuma. Za izvođenje VN korišćen je TN-41 laboratorijski soj virusa BHV-1 (American Bio Research, USA). Titar virusa se kretao između 10^5 i 10^6 TCID₅₀ u mL. Za potrebe VN upotreblja-

vano je 100 – 200 TCID₅₀ radnog virusa u 0,1 mL suspenzije. Uzorci krvnih seruma su inaktivisani na temperaturi od 56°C u trajanju od 30 minuta, zatim titrirani u dvostrukim razređenjima od 1 : 2 do 1 : 256. Ispitivana razređenja seruma su sa dodatim radnim virusom inkubirana tokom 1 sata na 37°C. Nakon isteka ovog perioda na mešavinu virusa i seruma u svaki bazenčić na mikrotitar ploči su dodavane MDBK ćelije u suspenziji od 300.000 u 1 ml i u količini od 100 µl. Nakon ovih postupaka mikrotitar ploča sa uzorcima je inkubirana na 37°C u toku 3 dana. Nakon 3 dana reakcije su očitavane tako što je kao titar VN antitela uzeta recipročna vrednost krajnjeg razređenja ispitivanog seruma koje je u potpunosti neutralisalo aktivnost radnog virusa. Rezultat ispitivanja virus neutralizacionim testom prikazan je kao logaritamska vrednosti titra specifičnih antitela – log₂ (Sjurin, 1966).

Ispitivanje titra specifičnih antitela u nosnoj sluzi obavljeno je istom metodologijom kao što je opisano za ispitivanje titra u krvi. Za ispitivanje specifičnih antitela protiv BHV-1 u nosnoj sluzi korišćen je i komercijalni ELISA set HerdChek* Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR)/Bovine Herpesvirus-1 (BHV-1) gB Antibody ELISA Test Kit IDEXX, po uputstvu proizvođača. Rezultat ispitivanja ELISA metodom je iskazivan kao pozitivan ili negativan nalaz prisustva specifičnih antitela.

Statistička ispitivanja / Statistical investigations

Za obradu dobijenih rezultata korišćeni su metodi deskriptivne statistike, Anderson-Darlingov test normalnosti, za ispitivanje značajnosti razlika neparametrijski Mann-Witney-Wilcoxon test, a korelacija između titra antitela u krvi i nosnoj sluzi određivana je neparametrijskim Spirmanovim testom. Statistička obrada podataka je vršena računarskim programom EduStat 2.04. Kao statistički značajna smatrana je vrednost $p < 0.05$.

Rezultati ispitivanja / Investigation results

Nakon imunizacije ni kod jednog teleta se nisu pojavile sistemske promene zdravstvenog stanja, dok se na mestu aplikacije kod pojedinih životinja razvio slab, netemperiran otok koji se spontano povukao kroz nekoliko dana.

U tabeli 1 prikazan je broj životinja sa nalazom antitela protiv BHV-1 posle supkutane imunizacije kod obe ogledne grupe. Primarna vakcinacija je rezultirala pojavom antitela u krvi 14. dana nakon vakcinacije kod ukupno 40% životinja, a 21. dana od vakcinacije u grupi S/c21 antitela u krvi su prisutna kod 90% teladi. Revakcinacija izvršena 14. dana izazvala je jak buster efekat i 17. dana od početka ogleada kod sve teladi grupe S/c14 utvrđena su antitela u krvi. Ipak, posle 28. dana kod jednog teleta nije bilo moguće utvrditi titar antitela u krvi sve do kraja ogleada. Kod teladi grupe S/c 21, specifična antitela za BHV-1 ustanovljena su 30. dana od početka ogleada kod svih jedinki. I u ovoj grupi 120. dana nisu utvrđena antitela u krvi jedne životinje.

Tabela 1. Broj životinja sa nalazom specifičnih antitela u krvnom serumu i nosnoj sluzi re-vakcinisanih 14. odnosno 21. dana./

Table 1. Number of animals with findings of specific antibodies in blood serum and nasal mucus, revaccinated on day 14 or 21

Dani ogleda / Day of experiment	Broj životinja sa utvrđenim specifičnim antitelima / Number of animals with established specific antibodies					
	S/c14 (N10)			S/c21 (N10)		
	Nosna sluz / Nasal mucus		Krv / Blood	Nosna sluz / Nasal mucus		Krv / Blood
	ELISA	VN	VN	ELISA	VN	VN
0.	0	0	0	0	0	0
4.	0	0	0	0	0	0
8.	0	0	0	0	0	0
14.	0	1	4	0	1	4
17.	0	2	0	-	-	-
19.	0	3	10	-	-	-
21.	3	2	10	0	6	9
24.	-	-	-	1	2	8
26.	-	-	-	1	4	8
28.	6	1	9	1	2	9
30.	7	0	9	5	2	10
45.	3	2	9	6	7	10
120.	4	5	9	8	8	9

Dan revakcinacije / Day of revaccination; - - nije vršeno uzorkovanje / no samples were taken

U obe ogleadne grupe, prosečna vrednost titra antitela u krvi raste nakon revakcinacije (tabela 2). Statistički značajan porast titra antitela utvrđen je 5. i 7. dana u grupi S/c14 i 7. dana u grupi S/c21 ($p < 0,05$). Poređenjem vrednosti dve ogleadne grupe, značajna razlika je utvrđena jedino 21. dana ogleada ($p < 0,05$).

Posle primarne vakcinacije, antitela su u nosnoj sluzi prvi put utvrđena VN metodom 14. dana posle imunizacije kod 10% životinja, a u grupi S/c21 do revakcinacije antitela su u nosnoj sluzi prisutna kod 60% teladi (tabela 1). Do revakcinacije ELISA metodom nisu utvrđena antitela u nosnoj sluzi ni u jednoj grupi. Sedam dana posle revakcinacije izvršene 14. dana, ELISA metodom su utvrđena prva antitela u nosnoj sluzi, a u grupi revakcinisanoj 21. dana samo kod jedne životinje sve do 30. dana ogleada. Ni u jednom danu antitela u nosnoj sluzi nisu utvrđena kod svih imunizovanih životinja. Maksimalan broj životinja sa nalazom antitela u nosnoj sluzi utvrđen je u grupi revakcinisanoj 21. dana 120. dana ogleada (80%) primenom obe metode.

Tabela 2. Titar antitela (\log_2) u krvnom serumu subkutano imunizovanih i revakcinisanih 14. odnosno 21. dan /

Table 2. Antibody titer (\log_2) in blood serum of subcutaneously immunized animals, revaccinated on day 14 or 21

Dani ogleđa / Day of experiment	S/c14 (N10)		S/c21 (N10)		Značajnost razlike / Significance of difference
	x	SD	x	SD	
0.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ
4.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ
8.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ
14.	0,5	0,71	0,4	0,52	NZ
17.	0,00	0,00	-	-	NZ
19.	2,5*	1,08	-	-	NZ
21.	2,9*	0,88	1,8	0,92	p<0,05
24.	-	-	1,6	0,97	NZ
26.	-	-	1,6	0,97	NZ
28.	2,9	1,45	2,7*	1,16	NZ
30.	4,0	2,05	3,2	1,23	NZ
45.	3,6	1,71	4,3	1,7	NZ
120.	2,8	1,48	3,9	1,52	NZ

- - nije vršeno uzorkovanje / no samples were taken; * - statistički značajna razlika u odnosu na dan revakcinacije (određivano samo za prva tri uzorkovanja nakon revakcinacije) / statistically significant difference against day of revaccination (determined only for first three samplings following revaccination)

Dan revakcinacije / Day of revaccination; NZ - razlika između dve grupe nije statistički značajna / difference between two groups is not statistically significant

Sedam dana nakon revakcinacije nije utvrđen značajan porast titra antitela u nosnoj sluzi (tabela 3). Povećanje prosečne vrednosti titra antitela u nosnoj sluzi, utvrđeno u grupi S/c21, 45. i 120. dana ogleđa, rezultat je povećanja broja jedinki kod kojih su antitela utvrđena u nosnoj sluzi, a ne povećanja vrednosti titra antitela kod pojedine teladi.

Tabela 3. Titar antitela (\log_2) u nosnoj sluzi supkutano imunizovanih i revakcinisanih 14. odnosno 21. dana /

Table 3. Antibody titer (\log_2) in nasal mucus of subcutaneously immunized animals, revaccinated on day 14 or 21

Dani ogleđa / Day of experiment	S/c14 (N10)		S/c21 (N10)		Značajnost razlike / Significance of difference
	x	SD	x	SD	
0.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ
4.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ
8.	0,00	0,00	0,00	0,00	NZ

nastavak tabele 3 / cont. Table 3

Dani ogleda / Day of experiment	S/c14 (N10)		S/c21 (N10)		Značajnost razlike / Significance of difference
	x	SD	x	SD	
14.	0,1	0,32	0,1	0,32	NZ
17.	0,2	0,42	-	-	NZ
19.	0,3	0,48	-	-	NZ
21.	0,3	0,67	1,00	1,05	NZ
24.	-	-	0,3	0,67	NZ
26.	-	-	0,7	0,95	NZ
28.	0,2	0,63	0,3	0,67	NZ
30.	0,00	0,00	0,3	0,67	NZ
45.	0,2	0,42	1,50	1,08	p<0,05
120.	1,00	1,15	1,3	1,16	NZ

- - nije vršeno uzorkovanje / no samples were taken; **Dan revakcinacije / Day of revaccination**; NZ – razlika nije statistički značajna / difference is not statistically significant

Između titra antitela u krvi i nosnoj sluzi nije utvrđena statistički značajna korelacija.

Kod teladi kontrolne grupe nisu utvrđena specifična antitela protiv BHV-1.

Diskusija / Discussion

Prisustvo BHV-1 infekcije kod goveda u pojedinim područjima i dalje čini imunoprofilaksu protiv ove infekcije opravdanom merom (Kamaraj i sar., 2009). Savremene vakcine stvaraju uglavnom jak humoralni, a slabiji ćelijski imunološki odgovor, te se smatra da je uspeh vakcinacije srazmeran sposobnosti stvorenih neutralizirajućih antitela da pruže zaštitu (van Drunen Littel – van den Hurk, 2006). Ispitivanja sa atenuiranim vakcinama protiv BHV-1 pokazala su da je i jednostruka imunizacija dovoljna da pruži zaštitu od kliničkog razvoja infekcije (Makoschey i sar., 2006), ali za inaktivisane vakcine je neophodna revakcinacija (Patel, 2005). Svojtvo imunološkog pamćenja se koristi u imunoprofilaksi kako bi se sekundarnom imunizacijom pojačao imunološki odgovor i time obezbedio veći stepen zaštite i njena dugotrajnost (Pulendran i Ahmed, 2006).

U ovom ispitivanju, u prvim danima nakon imunizacije nisu utvrđena specifična antitela, što ukazuje na to da pre vakcinacije telad nije bila u dodiru sa BHV-1 i da se po vakcinaciji razvija primarni imunološki odgovor. Prvi nalaz specifičnih antitela u krvi utvrđen je 14. dana posle imunizacije, što je u skladu sa drugim ispitivanjima supkutane imunizacije inaktivisanim BHV-1 vakcinama

(Kaashoek i sar., 1995; Patel, 2005; Del Medico Zajac i sar., 2006), iako su ona pojedinačno dokazivana i 7. dana od vakcinacije (Fulton i sar., 1995).

Jasan buster efekat u ovom ogledu je dobijen 5. dana nakon revakcinacije izvršene 14. dana, odnosno 7. dana u slučaju revakcinacije 21. dana ogleđa. Prvi nalaz specifičnih antitela u nosnoj sluzi dobijen je VN testom 14. dana, a ELISA metodom tek nakon revakcinacije. Antitela u nosnoj sluzi supkutano imunizovane teladi poreklom su iz krvotoka, odakle dospevaju na površinu sluzokože, a utvrđena su i u drugim ispitivanjima u kojima je vršena imunizacija inaktivisanom vakcinom protiv BHV-1 (Del Medico Zajac i sar., 2006). U grupi revakcinisanoj 21. dana ogleđa, 45. dana ogleđa je dobijen statistički značajno viši titar antitela nego u grupi revakcinisanoj 14. dana posle primarne vakcinacije i kod većeg broja jedinki je utvrđeno prisustvo antitela u nosnoj sluzi. Poreklo ovih antitela je iz krvotoka i intenzitet njihovog prelaska na površinu sluzokože je uslovljen uticajem više činilaca (Persson i sar., 1998). Stoga je teško reći da li je tokom ogleđa na povremene intenzivnije prodore antitela iz krvotoka na površinu sluzokože uticao još neki činilac (koji nije razmatran). Takođe, u literaturi se navode nedoumice oko tehnika uzorkovanja nosne sluzi i kakav je uticaj primenjene tehnike uzorkovanja na nalaz antitela u uzorcima (Jericho i Babiuk, 1983).

Dobijena razlika u detekciji antitela različitim metodama može se tumačiti kao prisustvo različitih klasa imunoglobulina koji se pojavljuju sa razvojem imunološkog odgovora. Virus-neutralizacija dokazuje antitela svih izotipova, dok većina komercijalnih ELISA testova ne otkriva specifična IgM i IgA antitela, koja se prva javljaju (Kramps i sar., 1993). S druge strane, neutralizirajuća antitela čine manju frakciju u odnosu na vezujuća antitela koja se dokazuju ELISA metodom (Pinna i sar., 2009). Time se može objasniti veći broj pozitivnih vezujućih antitela utvrđenih ELISA metodom nego VN testom, što je naročito izraženo 30. dana ogleđa.

Zaključak / Conclusion

Dobijeni rezultati ukazuju na to da u imunoprofilaksi infekcije BHV-1 inaktivisanim vakcinama revakcinacija izvršene 14. ili 21. dana pružaju sličan imunološki odgovor i da se u praksi, ako se uzima u obzir visina titra antitela, može primenjivati revakcinacija 14. dana. Ipak, za pouzdaniju preporuku ovakvog režima revakcinacije potrebna su dalja ispitivanja kako bi se odredila efikasnost u slučaju infekcije.

ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT:

Ispitivanje je izvršeno u okviru projekta pod evidencionim brojem 31084 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. /
Investigations were performed within Project Number 31084 financed by the Ministry for Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Castrucci G, Frigeri F, Salvatori D, Ferrari M, Sardonini Q, Cassai E, Lo DM, Rotola A, Angelini R. Vaccination of calves against bovine herpes virus-1: assesment of the protective value of eight vaccines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2002; 25(1): 29-41.
2. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, Diaz L, Trento A, Chang HY, Mitzner W, Rawetch J, Melero JA, Irusta PM, Polack FP. Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med* 2009; 15(1): 34-41.
3. Del Medico Zajac MP, Puntel M, Zamorano PI, Sadir AM, Romera SA. BHV-1 vaccine induces cross-protection against BHV-5 disease in cattle. *Res Vet Sci* 2006; 81: 327-34.
4. Fulton RW, Confer AW, Burge LJ, Perino LJ, d'Offay JM, Payton ME, Mock RE. Antibody responses by cattle after vaccination with commercial viral vaccines containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhea virus, parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. *Vaccine* 1995; 13: 725-33.
5. Jericho KW, Babiuk LA. The effect of dose, route and virulence of bovine herpesvirus 1 vaccine on experimental respiratory disease in cattle. *Can J Comp Med* 1983; 47, 133-9.
6. Jones C, Chowdhury S. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim Health Res Rev* 2008; 8(2): 187-205.
7. Kaashoek MJ, Moerman A, Madic J, Weerdmeester K, Maris-Veldhuis M, Rijsewijk FAM, van Oirschot JT. An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* 1995; 13(4): 342-6.
8. Kamaraj G, Rana SK, Srinivasan VA. Serological response in cattle immunized with inactivated oil and Algel adjuvant vaccines against infectious bovine rhinotracheitis. *New Microbiol* 2009; 32: 135-41.
9. Kramps JA, Quak S, Weerdmeester K, van Oirschot JT. Comparative study on sixteen enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to bovine herpesvirus 1 in cattle. *Vet Microbiol* 1993; 35(1-2): 11-21.
10. Lazić S, Ašanin R, Šajgalik M, Gagić M, Vidić B, Milanov D. Effects of vaccination of highly pregnant cows with anti BHV-1 vaccines: 2. humoral response on the vaccine 'Borinak'. *Acta Veterinaria* 2001; 1(51): 27-34.
11. Makoschey B, Munoz Bielsa J, Didlick S, Patel J. Results from a controled comparative study of two different vaccination schedules with Bovilis®IBR marker. *Proceedings of 24th World Buiatrics Congress, Budapest, Hungaria, 6-10 July 2006*; 31.
12. Özkul A, Demir B, Karaoglu T, Alkan F, Dincer E, Oncel T, Burgu I. Maturation of immunoglobulin G avidity after inactive gE deleted bovine herpes virus type 1 (BHV-1) marker vaccination. *Viral Immunol* 2008; 21(1): 3-11.
13. Patel JR. Relative efficacy of inactivated bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine. *Vaccine* 2005; 23: 4054-61.

14. Persson CGA, Erjefalt JS, Greiff L, Erjefalt I, Korsgren M, Linden M, Sundler F, Andersson M, Svensson C. Contribution of plasma-derived molecules to mucosal immune defence, disease and repair in the airways. *Scand J Immunol* 1998; 47(4): 302-13.
15. Petzhold SA, Reckziegel PE, Prado JAP, Teixeira JC, Wald VB, Esteves PA, Spilki FR, Roehe PM. Neutralizing antibodies to bovine herpesviruses types 1 (BHV-1) and 5 (BHV-5) induced by an experimental, oil-adjuvanted, BHV-1 vaccine. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001; 38(4): 184-7.
16. Pinna D, Corti D, Jarrossay D, Sallusto F, Lanzavecchia A. Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. *Eur J Immunol*, 2009; 39: 1260-70.
17. Pontarollo RA, Babiuk LA, Hecker R, Van Drunen Littel-Van Den Hurk S. Augmentation of cellular immune responses to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D by vaccination with CpG-enhanced plasmid vectors. *J Gen Virol*, 2002; 83(Pt 12): 2973-81.
18. Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell* 2006; 124: 849-63.
19. 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. *Vet J* 2007; 174(3): 616-26.
20. Sjurin VN. Rukovodstvo po veterinarnoj virusologiji. Moskva: Izdateljstvo „Kolos“, 1966.
21. Soulebot JP, Guillemin F, Brun A, Dubourget P, Espinasse J, Terre J. Infectious bovine rhinotracheitis: study on the experimentally induced disease and its prevention using an inactivated, adjuvanted vaccine. *Dev Biol Stand* 1982; 52: 463-83.
22. 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.
23. Straub KO. From coital exanthema to BHV-1 infections – a scientist's personal history. In: Infection with bovine herpesvirus type 1. In: Lazić SM, Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, 2007; 19-25.
24. Van Drunen Littel – Van Den Hurk S, Tikoo SK, Liang X, Babiuk LA. Bovine herpesvirus-1 vaccines. *Immunol Cell Biol* 1993; 71(5): 405-20.
25. Van Drunen Littel – Van den Hurk S. Rationale and perspectives on the success of vaccination against bovine herpesvirus-1. *Vet Microbiol* 2006; 113(3-4): 275-82.

ENGLISH

COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF IMMUNE RESPONSE OF CALVES AT DIFFERENT INTERVALS BETWEEN PRIMARY AND SECONDARY IMMUNIZATION USING INACTIVATED BOVINE HERPESVIRUS 1 VACCINE

D. Bugarski, T. Petrović, S. Boboš, Dubravka Milanov, D. Orlić, M. Radinović, S. Lazić

Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) is one of the most significant causes of infections of the respiratory tract of cattle and immunoprophylaxis has a key role in curbing this

infection. The intensity of the immune response against BHV-1 following immunization using inactivated commercial vaccines varies depending on the type of vaccine, but it is generally believed that they provide good protection from the development of the clinical form of the infection, and that they are safe. The paper present the development of the humoral immune response in fattening calves that were immunized against bovine herpesvirus 1 (BHV-1) at different time intervals between the primary and the secondary immunization. Calves were administered a commercial vaccine, and then they were divided into two groups which were revaccinated on days 14 or 21. Over a course of the 120 days of the duration of the experiment, blood and nasal mucus were sampled 11 times. The blood serum samples were examined for antibodies to BHV-1 using the virus neutralization (VN) test, and the nasal mucus samples were analyzed using the VN test and the ELISA method. Following revaccination, it was established that there was an increase in the antibody titer in blood of all experimental animals, and it was maintained at a high level up until the very end of the experiment (day 120). In the blood serums, maximum mean values for the antibody titer were determined on day 30 in the group that was revaccinated on day 14, and on day 45 in the group of calves revaccinated on day 21. In nasal mucus, antibodies were established at the earliest, using the virus neutralization test, on day 14 following vaccination, and using the ELISA method only after revaccination. The highest antibody titer in nasal mucus was established on day 45 in the group revaccinated on day 21, and on day 120 in the group revaccinated on day 14. Based on the established antibody titer values, calves can be revaccinated using the inactivated BHV-1 vaccine already on day 14.

Key words: anti BHV-1 vaccines, revaccination, antibodies

РУССКИЙ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА ТЕЛЯТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИНТЕРВАЛАХ МЕЖДУ ПЕРВИЧНОЙ И ВТОРИЧНОЙ ИММУНИЗАЦИЕЙ ИНАКТИВАЦИОННОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ГОВЯЖЕГО ГЕРПЕС ВИРУСА - I

Д. Бугарски, Т. Петрович, С. Бобош, Дубравка Миланов, Д. Орлич, М. Радинович, С. Лазич

Говяжий герпесвирус-I (ГГВ-I) - один из значительных возбудителей инфекций респираторной системы крупного рогатого скота и в преодолении этой инфекции иммунопрофилактика имеет ключевую роль. Интенсивность иммунного ответа против ГГВ-I после иммунизации инактивационными коммерческими вакцинами варьирует зависимо от вида вакцины, но генерально считается, что оказывают хорошую охрану от развития клинической формы инфекции и что безопасные. В работе показано развитие гуморального иммунного ответа у телят в откорме, иммунизированные против говяжьего герпесвируса-I (ГГВ-I) в различных интервалах между первичной и вторичной иммунизацией. Телята вакцинированы коммерческой вакциной, а затем разделены в двух группах, которые ревакцинированы 14, т.е. 21 дня. Течением 120 дня продолжительности опыта, кровь и носовая слизь образчикованы II раз. Образчики кровяных серумов испытаны на антитела для ГГВ-I тестом нейтрализации вируса (ВН), а образчики носовой слизи ВН тестом и ELISA методом. После ревакцинации утверждён рост титра антител в крови всех опытных животных

и он удержался на высоком уровне вплоть до конца испытания (120 день). В кровяных сыворотках, максимальные средние стоимости титра антител утверждены 30 дня у группы ревакцинированной 14 дня, и 45 дня у группы ревакцинированной 21 дня. В носовой слизи, тестом нейтрализации вируса, антитела раньшее всего утверждены 14 дня после вакцинации, а ELISA методом только после ревакцинации. Наибольший титр антител в носовой слизи утверждён 45 дня в группе ревакцинированной 21 дня и 120 дня в группе ревакцинированной 14 дня. В отношении утверждённой стоимости титра антител, ревакцинация телят инактивационно вакциной против ГГВ-1 можно вывести уже 14 дня.

Ключевые слова: анти ГГВ-1, вакцины, ревакцинация, антитела