

# CJEPIVA U VETERINARSKOJ MEDICINI - TIPOVI, RAZVOJ I PRIMJENA

---

Lončarić, Vanja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:760180>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Vanja Lončarić

CJEPIVA U VETERINARSKOJ MEDICINI – TIPOVI, RAZVOJ I PRIMJENA

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik Zavoda: izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: prof. dr. sc. Ljubo Barbić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović
2. izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
4. izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina (zamjena)

## **ZAHVALE**

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Ljubi Barbiću na ukazanom povjerenju, usmjeravanju, savjetima i velikoj pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i sestri na neizmjerne podršci što su mi je pružali za vrijeme studiranja.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i kolegama što su me podupirali do kraja studija.

## **POPIS SLIKA I TABLICA**

**Slika 1.** Hodogram razvoja cjepiva od odabira patogena do rane faze razvoja (preuzeto iz Francis, 2020.)

**Slika 2.** Hodogram razvoja cjepiva od rane faze razvoja do plasmana na tržište (preuzeto iz Francis, 2020.)

**Tablica 1.** Pregled mehanizma djelovanja, ključnih prednosti i nedostataka konvencionalnih metoda cijepljenja s primjerima

**Tablica 2.** Pregled mehanizma djelovanja, ključnih prednosti i nedostataka rekombinantnih cjepiva s primjerima

## **POPIS KRATICA**

ATC code (eng. The Anatomical Therapeutic Chemical code) – Anatomsko-terapijsko-kemijska klasifikacija

CAV-1– pseći adenovirus 1

CAV-2– pseći adenovirus 2

CDV – Virus štenećaka

CDVo – Onderstepoort soj virusa štenećaka

CDVr – Rockborn soj virusa štenećaka

DIVA (eng. Differentiating Infected from Vaccinated Animals) – razlikovanje inficirane od cijepljene životinje

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

EAV – Virus virusnog arteritisa konja

EHV-1 – Konjski alfaherpesvirus 1

EIV – Virus influence konja

EU – Europska unija

FAO (eng. Food and Agriculture Organisation of the United Nations) – Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda

FCV – Mačji kalicivirus

FeLV – Virus mačje leukemije

FHV-1 – Mačji herpesvirus 1

FPV – Mačji virus panleukopenije

FVRCP – Kombinirano cjepivo protiv mačjeg rinotraheitisa, mačjeg kalicirusa i panleukopenije mačaka

gE – Glikoprotein E

HA – Hemaglutinin

IgA – Imunoglobulin A

IgG – Imunoglobulin G

IgM – Imunoglobulin M

IL-1 – Interleukin – 1

IL-2 – Interleukin – 2

NA – Virusna neuraminidaza

ORF (eng. Open reading frame) – Otvoreni okvir čitanja

PCR – Lančana reakcija polimeraze

PCV – Cirkovirus svinja

PRRS – Respiratorni i reproduktivni sindrom svinja

PRRSV-1 – Europski tip 1 genotip virusa respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja

PRRSV-2 – Sjevernoamerički tip 2 genotip virusa respiratornog i reproduktivnog sindroma svinja

RABV G – Glikoprotein virusa bjesnoće

RNK – Ribonukleinska kiselina

TCRV – Cjepivo protiv govede kuge u tkivnoj kulturi

TeNT – Tetanus toksin

TH1 - T pomoćničke stanice tip 1

TH2 - T pomoćničke stanice tip 2

Tk – Toplinski osjetljiv mutant konjskog alfaherpesvirusa – 1

Ts – Timidin kinaza negativni mutanti

VICH (eng. Veterinary International Conference on Harmonisation)

VP2 – Protein kapside psećeg parvovirusa

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija

WOAH – Svjetska organizacija za zdravlje životinja

WSAVA – Svjetska organizacija veterinarata male prakse



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RAZVOJ CJEPIVA.....</b>	<b>3</b>
2.1 POVIJEST.....	3
2.2 PROCES RAZVOJA CJEPIVA.....	5
<b>3. TIPOVI CJEPIVA .....</b>	<b>8</b>
3.1 CJEPIVA KOJA SADRŽAVAJU ŽIVE MIKROORGANIZME .....	8
3.2 MODIFICIRANA ŽIVA CJEPIVA .....	9
3.3 CJEPIVA KOJA SADRŽAVAJU MRTVE/INAKTIVIRANE MIKROORGANIZME.....	18
3.3.1 <i>Inaktivirana bakterijska cjepiva</i> .....	22
3.4 DIVA CJEPIVA .....	24
3.5 REKOMBINANTNA CJEPIVA .....	26
3.5.1 <i>Vektorska cjepiva</i> .....	26
3.5.2 <i>Subjedinična cjepiva</i> .....	29
3.5.3 <i>Cjepiva od umjetno sintetiziranih peptida</i> .....	31
3.5.4 <i>DNK cjepiva</i> .....	31
3.6 TOKSOIDNA CJEPIVA .....	32
<b>4. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>37</b>
<b>5. SAŽETAK .....</b>	<b>38</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>39</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>41</b>

## 1. UVOD

Imunosni sustav vrlo je složen obrambeni sustav sačinjen od bioloških procesa u međusobnoj interakciji koji se pokreću nakon izlaganja za organizam stranoj tvari, odnosno antigenu. Svrha imunskog sustava zaštita je organizma od patogenih mikroorganizama, a čine ga dvije povezane cjeline, urođena i stečena imunost. Urođena imunost evolucijski je najstariji oblik imunskog odgovora, a sastoji se od fizičke zaštite, primjerice kože ili sluznice, izlučevina žlijezda, te mehanizma upalnog odgovora. Stečena imunost evolucijski je mlađa, više specifična, a njenu osnovu čine limfatične stanice T- limfociti i B-limfociti te protutijela. Bitna odlika stečenog imunskog odgovora je imunsko pamćenje. Kad organizam ponovo dođe u doticaj s istim mikroorganizmom, imunsko pamćenje omogućuje sekundarni imunski odgovor koji je brži i učinkovitiji od primarnoga imunološkog odgovora. Primjena ovog fenomena najznačajnija je u uspješnoj primjeni cijepljenja (DAY i SCHULTZ, 2011.).

Cijepljenje je postupak kojim se određeni antigeni materijal unosi u organizam putem cjepiva radi stvaranja specifične imunosti na određenog uzročnika zarazne bolesti. Cjepivo je ljekoviti pripravak koji sadržava žive oslabljene ili mrtve uzročnike zaraznih bolesti, njihove izlučevine, dijelove ili upute za biosintezu antigena zapisane u nukleinskoj kiselini ili rekombinantnom virusu (POLLARD i BIJKER, 2020.). Djelotvornost cjepiva ovisi o stvorenom imunitetu kojeg čine protutijela i o stvaranju memorijskih stanica koje će u ponovljenoj interakciji s antigenom protiv kojeg je cijepljenje obavljeno potaknuti imunološki odgovor, te osigurati dugotrajnost otpornosti na infekciju.

Interakcija ljudi i životinja zauzima vrlo važnu ulogu u stečenim spoznajama o cijepljenju u protekla dva stoljeća. Okoliš, ljudi i životinje nerazdvojna su cjelina u kojoj zdravlje jednog izravno ovisi o drugome. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 75% emergentnih bolesti koje su se pojavile u ljudi u zadnjih desetak godina uzrokovano je patogenim mikorganizmima koji potječu od životinja ili od proizvoda životinjskog podrijetla (WARIMWE i sur., 2021.). Organizacija za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO) procjenjuje da će do 2025. godine svjetska populacija doseći osam milijardi stanovnika, što podrazumijeva sve veće zahtjeve za namirnicama animalnog podrijetla. Prema podacima FAO, svjetska proizvodnja mesa dosegla je 337 milijuna tona u 2019., što je povećanje od 44 posto, ili 103 milijuna tona u usporedbi s 2000. godinom (FAO, 2021.). Veterinarska cjepiva imaju ključnu ulogu u očuvanju zdravlja životinja, poboljšavanju proizvodnosti životinja te kroz navedeno osiguravanju potrebnih količina namirnica animalnog podrijetla (ROTH, 2011.). Uz

navedeno sve veća je zabrinutost oko rezistencije na antibiotike povezanoj s ekstenzivnom i neracionalnom upotrebom istih u humanoj i veterinarskoj medicini (SINGER i sur., 2003.). Upotrebom cjepiva smanjujemo potrebu za korištenjem antibiotika u velikoj i maloj praksi. Cijepljenjem kućnih ljubimaca osiguravamo njihovu zaštitu od bolesti životinja i zoonoza, uključujući neke koje mogu imati smrtne posljedice kao što je slučaj kod bjesnoće. Uz sprječavanje pojave i širenja zaraznih bolesti, izbjegavamo troškove liječenja te sprječavamo kontaminaciju okoliša uzročnicima bolesti. Držanje farmskih životinja kao i motivi za cijepljenjem uvelike se razlikuju u odnosu na držanje kućnih ljubimaca. Osim što je svrha uzgoja proizvodnja animalnih namirnica prikladnih za prehranu ljudi što je ranije navedeno, upravljanje uzgojem farmskih životinja svodi se na to da se jedinke u uzgoju promatraju kao cjelina. Veći broj životinja nalazi se u objektima u kojima ne borave kontinuirano zajedno s čovjekom, stoga je neke znakove bolesti teško uočiti na vrijeme. Upravo je stoga i cijepljenje jedna od značajnijih metoda prevencije oboljenja, važna ne samo zbog očuvanja zdravlja samih životinja i ljudi, već se na taj način smanjuju dodatni troškovi koji poskupljuju sam proces proizvodnje, a u konačnici i završni proizvod. U provedbi cijepljenja farmskih životinja naglasak je na suzbijanju zaraznih bolesti izazvanih uzročnicima pobačaja te respiratornih infekcija. U Republici Hrvatskoj, kao zemlji članici Europske unije, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede donosi strategiju nadzora i osiguravanja zdravlja životinja, propisuje mjere za rano otkrivanje i sprječavanje pojave, kontrolu, nadziranje, praćenje te istraživanje izbijanja zaraznih bolesti životinja uključujući i zoonoze, analizira podatke o pojavi bolesti životinja i iste dostavlja Europskoj komisiji, Svjetskoj organizaciji za zdravlje životinja (WOAH), susjednim zemljama i drugim zainteresiranim stranama u zemlji i inozemstvu. Mjere uključuju i propisivanje pojedinih zaštitnih cijepljenja, a njihovo provođenje ima važnost kako u gospodarstvu tako i u međunarodnom prometu i trgovini životinjama te proizvodima životinjskog podrijetla. Iz svega navedenog proizilazi koliko je cijepljenje životinja važna i najisplativija metoda sprječavanja zaraznih bolesti, ali i značajan postupak za javno zdravstvo zbog suzbijanja zoonoza i posljedično očuvanja zdravlja ljudi (MANOHAR i sur., 2022.).

Cilj ovog preglednog diplomskog rada je prikazati razvoj cjepiva kroz povijest, osnovne vrste cjepiva kao i indikacije za njihovu primjenu u veterinarskoj medicini.

## 2. RAZVOJ CJEPIVA

### 2.1 POVIJEST

Razvoj cjepiva i programa cijepljenja usavršava se stoljećima, a povijest cijepljenja može se prema načinu razvoja podijeliti u dvije faze: empirijsku fazu, sačinjenu od metoda pokušaja i promašaja temeljenu na istraživanju mogućnosti izolacije, atenuacije, inaktivacije i frakcioniranja patogena u svrhu stvaranja cijepnog antigena te takozvanu racionalnu eru razvoja cjepiva (DE GREGORIO i RAPPUOLI, 2014.).

Povijest cijepljenja usko je vezana uz virus velikih boginja. Zamijećeno je kako preboljenjem boginja osoba ostaje imuna na reinfekciju (MC VEY i SHI, 2010.). Namjerna inokulacija usitnjenih osušenih krasta ili sadržaja pustula iglom u kožu pacijenata rezultirala je blažim oblikom bolesti i znatno smanjenom smrtnosti u odnosu na prirodnu infekciju. Ovo je prvi poznati namjerni pokušaj da se spriječi bolest ovakvim metodama, a naziva se variolizacija iz latinskog naziva za boginje, *variola*. Konkretniji dokazi o variolizaciji u obliku medicinskih spisa zabilježeni su u "The Golden Mirror of Medicine" objavljenom 1742. iako neki autori navode kako najraniji podaci o variolizaciji potječu još iz 10. stoljeća. Prakticirana je u Africi i Indiji, a u nedostatku boljih metoda usvojena je u Europi i njenim kolonijama oko 1700. godine (EAGLE i GAD, 2014.). Variolizaciju je u Englesku uvela 1721. godine Mary Wortley Montagu koja se s metodom susrela u Carigradu. Značajan korak u povijesti medicine napravio je engleski liječnik Edward Jenner kada je 1796. godine cijepio osmogodišnjeg dječaka cjepivom pripremljenim od sadržaja papula seoske mljekarice Sarah Nelmes uzrokovanih kravljim boginjama. Ovo je načinio jer su seoski liječnici primjetili kako mljekarice zaražene kravljim boginjama ne oboljevaju od velikih boginja. Nakon dva tjedna blagih kliničkih simptoma, dječak je bio zaštićen od virusa velikih boginja. Jenner je takav pripravak nazvao vakcinom, riječju izvedenom iz latinskog "vacca" - krava, a termin se zadržao i danas. Tako pripravljeno cjepivo proizvodio je i slao na zahtjev, a kroz naredne četiri godine korišteno je u većini europskih zemalja. Iako Jenner nije prvi znanstvenik koji je pokušao proizvesti cjepivo od kravljih boginja zasluge mu se pripisuju zbog toga što je bio prvi koji je znanstveno istražio hipotezu i promicao njegovu široku upotrebu (MORGAN i POLAND, 2011.). Neki autori pak smatraju kako Jenner ipak nije bio prvi te da je prvo pravo cijepljenje Benjamin Jesty izveo na svojoj supruzi i djeci 1774., a da se Jenneru pripisuju zasluge zbog bolje povezanosti i prestižnije pozicije u društvu (PEAD, 2003.). Jenner je 1798. objavio svoja otkrića u samoizdanom izvještaju koji je dočekan različitim reakcijama. Neki su unošenje kravljeg virusa u ljude smatrali kontroverznim. Poznat je i satiričan strip Jamesa Gillraya koji prikazuje kako

dijelovi krava izlaze iz cijepljenih osoba. Protivnici cijepljenja bili su i pojedinci s financijskim interesima u praksi variolacije. Jennerovo cjepivo ipak označava važan preokret u medicini, koji je u konačnici i doveo do eradikacije velikih boginja 1980. godine (HENDERSON, 2011.).

Prošlo je gotovo stotinu godina do slijedećeg vrlo važnog otkrića kada je Louis Pasteur modernizirao cijepljenje slučajnim uspjehom u pronalaženju cjepiva za koleru peradi korištenjem atenuirane kulture *Pasteurella multocida*. Ovo otkriće otvorilo je mnoga vrata u potrazi za održivim metodama mogućnosti korištenja cjepiva dovodeći ga do razvitka cjepiva protiv bedrednice 1881. godine. Izlaganje bakterije *Bacillus anthracis* nepovoljnim temperaturama te inokulacijom istih u preživače postignuta je zaštita pri eksperimentalnom izlaganju punovirulentnom uzročniku, a čovječanstvu omogućilo prvo cjepivo protiv vrlo značajne i smrtonosne zoonoze (STERNBACH, 2003.). Ovo otkriće pokrenulo je ekspanziju razvoja atenuiranih cjepiva protiv bakterijskih bolesti čije uzročnike nije bilo izazovno kultivirati u laboratorijima, a prethodila su i razvoju virusnih cjepiva (ENTRICAN i FRANCIS, 2022.). Vjerojatno najpoznatije Pasteurevo postignuće cjepivo je protiv bjesnoće, antirabična vakcina, prvi puta testirana 1885. godine. Protokol cijepljenja sastojao se od višestruke primjene sve virulentnijih pripravaka osušene zečje leđne moždine (HICKS i sur., 2012.). Nakon ovih uspjeha, ubrzo dolazi do razvitka inaktiviranih cjepiva na bazi toksoida za zaštitu od klostridijskih bolesti koje zbog svoje smanjene imunogenosti zahtijevaju ugradnju adjuvansa kako bi potakle imuni odgovor (DI PASQUALE i sur., 2015.).

Sredinom 20. stoljeća u razvoj cjepiva uključuju se uporaba staničnih kultura koje omogućuju primjenu stečenih spoznaja u olakšanoj izradi atenuiranih te inaktiviranih cjepiva protiv virusnih bolesti, što u konačnici dovodi do vrlo značajnog postignuća u veterinarskoj medicini 1960. godine kada Sir Walter Plowright razvija TCRV (eng. tissue culture rinderpest vaccine - cjepivo protiv goveđe kuge na tkivnoj kulturi) što u konačnici dovodi i do eradikacije goveđe kuge 2011. godine (ROEDER, 2013.). Osnovni principi i način izrade ovih cjepiva zadržan je do danas pa tako većina humanih i veterinarskih cjepiva koja su trenutno u upotrebi razvijena su na ovaj način.

Pojava tehnologije korištenja rekombinantne deoksiribonukleinske kiseline (DNK) 1970. godine omogućuje velik napredak u razvoju cjepiva (BERG i sur. 1974.). Do ovog otkrića dolazi se istovremeno s inovacijama u informacijskim znanostima i napretku obrade podataka te označava početak druge faze, takozvane racionalne ere razvoja cjepiva, obilježene mogućnostima sinteze nukleotidnih slijedova DNK, manipuliranja genomom patogena te

ekspresijom rekombinantnih proteina u oblicima koji oponašaju ekspresiju proteina u slučaju prirodne infekcije, čime se uklanja potreba za uzgojem patogena u proizvodnji cjepiva (DE GREGORIO i RAPPUOLI, 2014.).

Ranih 1980.-ih Bernard Moss i suradnici prvi ističu koncept virusnih vektora kada su prikazali kako se virus vakcinije može konstruirati tako da prenosi i eksprimira strane gene (MACKETT i sur., 1982.). Od tada, ova tehnologija iskorištavala se za primjenu na nizu porodica virusa i stranih gena, uključujući i one koji kodiraju antigene patogena. Ovom tehnikom za brojne DNK i RNK viruse razvijena su vektorska cjepiva (SHEPPARD, 1999.).

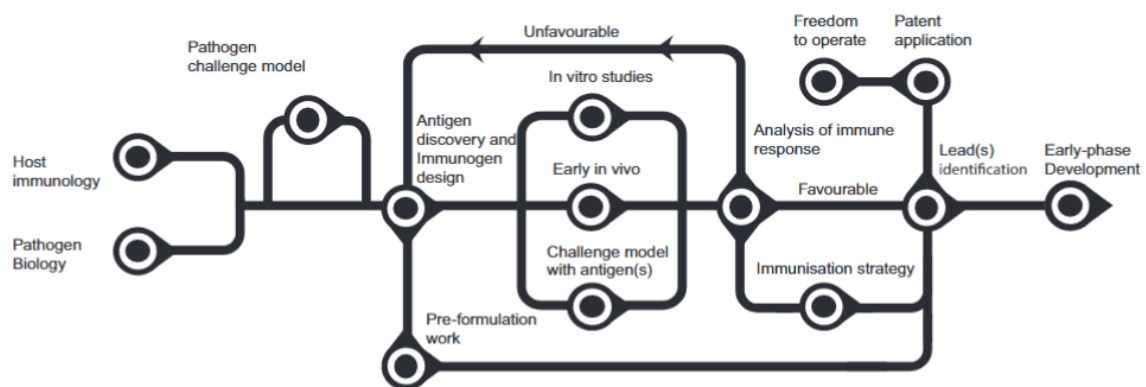
Godine 1991. razvijeno je rekombinantno podjedinično retrovirusno cjepivo koje štiti mačke od infekcije virusom mačje leukemije (FeLV). Kao antigen korišten je protein glikoproteinske ovojnice FeLV podskupine A ekspimiran u bakteriji *Escherichia coli*, te adsorbiran na aluminijev hidroksid u kombinaciji sa saponin adjuvansom (MARCIANI i sur., 1991.).

Značaj razvoj i primjene cjepiva u veterinarskoj medicini očituje se svakodnevno, pa i u današnje vrijeme. Jedan od novijih primjera uspjeha je i uvođenjem programa oralne vakcinacije lisica, kojim je uz obavezno cijepljenje pasa te praćenje podataka putem Nacionalnog informacijskog sustava Lysacan za registraciju cijepljenja pasa, mačaka i pitomih vretica protiv bjesnoće, Republika Hrvatska od 16. travnja 2021. godine provedbenom odlukom Europske komisije postaje zemlja slobodna od bjesnoće te uvrštena na listu drugih europskih zemalja koje posjeduju taj status.

## **2.2 PROCES RAZVOJA CJEPIVA**

Proces razvoja cjepiva može se podijeliti u nekoliko faza. Otkriće, prva faza, odvija se unutar akademskih i znanstvenih institucija. U ovoj fazi vrlo je važno uključiti stručnjake koji poznaju regulatorne propise kako bi se izbjegla mogućnost pogrešnih postupaka koje mogu učiniti cjepivo neprikladnim za registraciju. Slijedeća je faza izvedivosti, koja zajedno sa fazom otkrića zamjenjuje pretkliničku fazu u razvoju cjepiva u ljudi. Ona se provodi na laboratorijskim životinjama, a ključna je razlika između ova dva razvojna procesa ta što se u razvoju veterinarskih cjepiva odmah uključuju ciljni domaćini kako bi se postigla rana demonstracija učinkovitosti željenog proizvoda jer su heterologni laboratorijski životinjski modeli često loši pokazatelji sigurnosti i zaštitne učinkovitosti cjepiva unutar ciljne vrste. Još jedan vrlo važan

dio faze otkrića jest razumijevanje imunog odgovora ciljane životinjske vrste na antigen. Stoga nakon pronalaska odgovarajuće imunogene formulacije projekt prelazi u fazu izvedivosti koji uključuje studije sigurnosti i učinkovitosti unutar ciljanih vrsta za cjepivo. Imunološki odgovor potaknut cjepivom mora biti u korelaciji sa zaštitom domaćina, što u konačnici rezultira identifikacijom vodeće formulacije cjepiva za nastavak razvoja. Kada kandidat za eksperimentalno veterinarsko cjepivo izazove odgovarajući imunološki odgovor čime pruža odgovarajuću zaštitu, cjepivo prelazi u ranu fazu razvoja (FRANCIS, 2020.).



**Slika 1.** Hodogram razvoja cjepiva od odabira patogena do rane faze razvoja

(preuzeto iz Francis, 2020.)

Unutar Europske unije postoje tri ključna elementa regulatornog procesa proizvodnje i mogućnosti primjene cjepiva: kvaliteta, sigurnost i učinkovitost. Podaci o kvaliteti odnose se na čistoću i sljedivost konačnog proizvoda, uključuju kvalitativne i kvantitativne pojedinosti o sastojcima, početnim materijalima, testiranjima kontrole kvalitete, okvirni opis proizvodnog procesa, te osiguravaju da svaka serija cjepiva odgovara namjeni (WOODLAND, 2011.). Istraživanje sigurnosti trebalo bi se provoditi u skladu s načelima dobre laboratorijske prakse, a ovisi o vrsti cjepiva (KNIGHT-JONES i sur., 2014.). Ono uključuje pojedinačne i ponovljene studije na životinjama minimalne dobi te životinjama koje su gravidne ili u fazi nesivosti. Dodatne studije o živim cjepivima trebale bi uključivati podatke o izlučivanju cjepnog uzročnika, mogućnosti vraćanja virulencije i bioloških svojstava, učinke cjepiva na normalne

imunološke funkcije te njegovu sigurnost za krajnje korisnike i okoliš. Podaci o učinkovitosti cjepiva uključuju podatke o početku i trajanju imuniteta s minimalnim titrom proizvoda za svaku kategoriju životinja kojima je namijenjeno, kolika je učinkovitost s obzirom na prisustvo materlnih protutijela, postoji li potreba za docjepljivanjem i istraživanje imunoloških mehanizama uključenih u odgovor domaćina na cjepivo. Ove studije moraju biti provedene za svaki način primjene cjepiva i svaku komponentu polivalentnog cjepiva ako ono sadrži antigene više podtipova istog uzročnika (FRANCIS, 2020.). Podaci iz rane faze razvoja koriste se u aplikaciji za ATC kod pri WHO za provođenje terenskih ispitivanja cjepiva kao dio kasne faze razvoja. To je jedinstveni kod u sustavu klasifikacije lijekova koji se dodjeljuje svakom lijeku prema organu ili organskom sustavu na koji djeluje i kako djeluje (<https://www.ema.europa.eu/en/glossary/atc-code>). Zahtjev za ATC mora sadržavati pojedinosti o svim podacima koji su relevantni za sigurnost proizvoda. Može uključivati i obrazloženje zašto se takvi podaci ne mogu generirati u laboratorijskom okruženju, već postoji potreba za terenskim ispitivanjima. Ona se provode u skladu sa VICH smjernicama (smjernice sukladno međunarodnom programu usmjerenom na usklađivanje tehničkih zahtjeva za registraciju veterinarskih proizvoda). Na ovaj način osigurava se jedinstveni standard između zemalja Europske unije, Ujedinjenog Kraljevstva, Japana, Australije i Novog Zelanda te Sjedinjenih Američkih Država što olakšava međusobno prihvaćanje podataka o kliničkim ispitivanjima od strane regulatornih tijela (FRANCIS, 2009.). Nakon provedbe terenskih ispitivanja, u fazi registracije lijeka prikupljaju se i procjenjuju podaci o sigurnosti, indikacijama za primjenu, preporučenoj dozi i putu aplikacije lijeka za svaku kategoriju životinja kojoj je cjepivo namijenjeno prije konačnog plasmana na tržište.



**Slika 2.** Hodogram razvoja cjepiva od rane faze razvoja do plasmana na tržište

(preuzeto iz Francis, 2020.)



### 3. TIPOVI CJEPIVA

Cjepiva se razvrstavaju u nekoliko različitih skupina: prema vrsti uzročnika zarazne bolesti, gdje razlikujemo cjepiva protiv bakterijskih, virusnih i parazitarnih uzročnika. Razlikuju se i ovisno o stupnju oslabljenosti uzročnika tako da cjepiva mogu biti živa, koja su najčešće oslabljena (atenuirana), i mrtva (inaktivirana). Prema načinu proizvodnje dijele se na one proizvedene ili izlučene iz biološkog izvora (konvencionalna) te ona pripravljena biotehnološkim postupcima. Prema načinu primjene razlikujemo cjepiva koja se u organizam unose pod kožu, u mišić, kroz usta te sluznicu nosa. S obzirom na broj antigena koje cjepivo sadrži razlikujemo monovalentna cjepiva koja sadrže antigene jednog uzročnika, polivalentna koja sadrže antigene više podtipova istog uzročnika te kombinirana cjepiva kojima unosimo antigene dva ili više uzročnika (PENG i sur., 2021.) Idealno cjepivo trebalo bi biti bez dugotrajnih ili kratkotrajnih nuspojava, jednostavno za proizvodnju, a trošak proizvodnje je nizak. Trebalo bi djelovati promptno i osiguravati cjeloživotni imunitet, lako se detektirati u organizmu, te biti učinkovito protiv svih varijanti patogena. Unešene antigenske komponente trebale bi imati dobru imunogenost te štiti domaćina od horizontalnog i vertikalnog prijenosa (BLOME i sur. 2017.).

#### 3.1 Cjepiva koja sadržavaju žive mikroorganizme

Variolizacija, prvi zabilježeni pokušaj inokulacije živog virulentnog, uzročnika u svrhu sprječavanja pojave bolesti, tehnologija je koja se za pojedina malobrojna cijepjenja zadržala do danas. Temeljena je na spoznaji kako infekcija virusom iz porodice *Orthopoxviridae* može pružiti zaštitu od infekcije drugim virusom iz iste porodice (PHELPS i sur., 2017.). Ova cjepiva danas su najmanje zastupljena jer se u njima nalazi živi virulentni uzročnik pa postoji značajan rizik od cijepnih bolesti. Ipak, jedan od rijetkih primjera upotrebe ovakvog cjepiva koji se provodi i danas je ektimatizacija ovaca i koza. Zarazni ektim virusna je bolest ovaca i koza koja se klinički očituje bolnim lezijama najčešće na ustima janjadi i jaradi koje mogu onemogućiti sisanje te uzrokovati smanjeni prirast i uginuća. Ovce koje sišu zaražena janjad mogu razviti mastitis, što donosi dodatne ekonomske gubitke (TIZARD, 2021.a). U populacijama u kojima je virus prisutan životinje se imuniziraju sadržajem krasta oboljelih životinja, pri čemu se uzročnik iz krasta bolesnih životinja nanese na kožu koja nije prekrivena vunom, najčešće na unutarnju stranu bedra, a koja se prethodno površinski izgrebe (DAY i SCHULTZ, 2011.b).

Infektivni terenski soj koji se nalazi u krastama umnaža se u cijepljenom organizmu, čime se oponašaju uvjeti kao kod prirodne infekcije, ali u pravilu ne uzrokuje oboljenje te u slučaju da i dođe do razvoja bolesti ona će ipak biti blažeg tijeka, zbog neprirodnih ulaznih vrata. Zbog zoonotskih značajki ove bolesti osobe koje provode cijepljenje trebaju se zaštititi odgovarajućom opremom uz poštovanje biosigurnosnih mjera. U stadima u kojima virus nije prisutan ovakvo cijepljenje je kontraindicirano, jer bi se njime virus unio u populaciju. Ovaj način cijepljenja izaziva dobar imunološki odgovor. Tako je utvrđeno kako skarifikacijom kože miševa i primjenom na opisani način virusa vakcinije dolazi do jačeg imunog odgovora pri manjim dozama cjepiva, proizvodi se veća količina protutijela te dolazi do stvaranja više specifičnih protutijela u usporedbi s primjenom cijepljenja istim virusom intramuskularno (PHELPS i sur., 2017.).

### **3.2 Modificirana živa cjepiva**

Modificirana živa cjepiva sastoje se od oslabljenog uzročnika koji zadržava svojstvo umnažanja u živom organizmu, čime se oponaša prirodna infekcija. Cjepiva koja kao antigen sadržavaju žive oslabljene mikroorganizme proizvode se uzastopnim infekcijama životinja koje nisu prirodni domaćini ili uzgojem na određenim hranjivim podlogama za bakterije, odnosno linijskim staničnim kulturama za viruse, gdje će nakon uzastopnih pasaža u mikroorganizmima u za njih nepovoljnim uvjetima nastati mutacije koje će rezultirati avirulentnim sojem sposobnim za replikaciju u prirodnom domaćinu. Uzročnik je živ i oslabljen, što znači da mu je smanjena patogenost, a imunogenost nepromijenjena. Organizam ne raspoznaje oslabljeni soj od divljeg soja virusa te izaziva infekciju sličnu prirodnoj, zbog čega dolazi do pokretanja istih staničnih mehanizama kao i kod prirodne infekcije te posljedično do stvaranja visoke razine imunosti u većine cijepljenih ponekad primjenom i samo jedne doze. Primjena takvih cjepiva vrlo je jednostavna, mogu se primjenjivati i u vodi za piće, intranazalno ili konjunktivalno, što može potaknuti i lokalni imunološki odgovor sluznica. U usporedbi s inaktiviranim cjepivima, živa oslabljena cjepiva lakše je proizvesti jer zahtijevaju minimalnu daljnju obradu te ne zahtijevaju primjenu adjuvansa (VAN GELDER i MAKOSCHEY, 2012.). Sojevi prisutni u većini postojećih živih oslabljenih cjepiva imaju i mnoge nedostatke: ponekad ipak ne pružaju visoku mogućnost zaštite, učestalije uzrokuju lokalnu upalu i druge neželjene reakcije, mogu ponovo postati virulentni, a dodatne probleme predstavlja i nemogućnost

uspješnog kultiviranja pojedinih bakterija ili virusa, mogućnost poticanja autoimunog odgovora te potrebu za skladištenjem u hladnjaku zbog njihove osjetljivosti na svjetlost i temperaturu (MEEUSEN i sur., 2007.). Uz nabrojane, najvažniji nedostatak predstavlja rizik od mutacija te vraćanja virulencije i posljedično mogućeg širenja patogenog soja. Oslabljena cjepiva se stoga u pravilu ne mogu primjenjivati u imunokompromitiranih životinja te gravidnih ženki jer bi nekontrolirano umnažanje mikroorganizama u organizmu imunokompromitiranih životinja moglo uzrokovati infekcije koje u nekim slučajevima mogu završiti i fatalno.

Jedan od primjera korištenja ovakvog cjepiva u veterinarskoj medicini je cijepljenje protiv štenećaka. Štenećak je globalno raširena vrlo zarazna multisistemska virusna bolest uzrokovana virusom štenećaka (CDV - engl. Canine Distemper Virus) iz roda *Morbillivirus*. Klinički znakovi bolesti uključuju vrućicu, neurološke simptome te znakove oboljenja dišnog i probavnog sustava. Štenad se može zaraziti dodiranjem sa zaraženom životinjom, fecesom i urinom. Vlasnici mogu mehaničkim putem prenijeti virusne čestice na štenad koja nije u interakciji s drugim životinjama, stoga se s obzirom na lako širenje i ozbiljnost kliničke slike preporučava zaštitno cijepljenje svih pasa bez obzira na način držanja. Uvođenjem preporuka profilaktičkih mjera te prije svega korištenjem modificiranog živog cjepiva smanjen je broj slučajeva oboljelih pasa (MARTELLA i sur., 2008.). Donedavno su protiv ove bolesti bila dostupna samo živa modificirana cjepiva uvedena još 1960-ih. U početku se koristio Onderstepoort soj virusa (CDVo) koji je oslabljen iz prirodnog izolata uzgojenog na kulturi stanica (HAIG, 1956.). Drugi korišteni soj je bio Rockborn soj (CDVr), koji je prilagođen na kulturu stanica bubrega pasa (HARTLEY, 1974.). Međutim, primjenom cjepiva koja sadrže CDVr moguć je povrat virulencije cjepnog soja virusa (DODDS, 2001.). Oba cjepiva pružala su zaštitu do godine dana, a primjenjivana su intramuskularno. Od drugih načina primjene potvrđena je mogućnost primjene peroralno te okulonazalno, dok se intravenozni put primjene ne preporuča osim u iznimnim slučajevima izlaganju virusu za vrijeme primovakcinacije. Nakon rođenja životinje su zaštićene od infekcija materalnim protutijelima, što predstavlja općenito problem u imunizaciji. Kod većine štenaca ovaj pasivni imunitet zadržati će se od 8 do 12 tjedana starosti. Ovisno o titru materalnih protutijela ovisi i određivanje početka cijepjenja tako da se jedinke s nižim titrom mogu uspješno cijepiti već s 8 tjedana, dok će one s višim titrom tek u 12. tjednu uspješno moći reagirati na cjepivo (FRIEDRICH i TRUYEN, 2000.).

Druga značajna bolest pasa za koju se koristi modificirano živo cjepivo je parvoviroza pasa. Pseći parvovirus 2 vrlo je važan uzročnik akutnog hemoragičnog enteritisa i miokarditisa

s gotovo 100 % morbiditetom i 10 % letalitetom u domaćih i divljih kanida. Oboliti mogu sve dobne kategorije, a najteža klinička slika bilježi se u štenadi u dobi do 4 mjeseca. Virus se vrlo lako prenosi izravnim kontaktom sa zaraženom životinjom te kontaminiranim predmetima (NANDI i KUMAR, 2010.). Dugo opstaje u okolini i čest je u skloništima za životinje, uzgajivačnicama ili bilo kojim drugim mjestima na kojima se zadržava više pasa. Životinje su osjetljive na infekciju u vrijeme kada materalna protutijela više nisu u dovoljnom titru da bi pružila zaštitu, ali su još uvijek prisutna u dovoljnoj količini da ometaju aktivnu imunizaciju (CARMICHAEL i sur., 1983.). Stoga je važno protokol imunizacije prilagoditi upravo ovom kritičnom razdoblju. Modificirana živa cjepiva pokazala su bolja svojstva u odnosu na inaktivirana u smislu postizanja bolje zaštite (LARSON i SCHULTZ, 2008.). Za sada ni jedno komercijalno dostupno cjepivo ne može zaobići materalna protutijela, što otežava određivanje programa imunoprofilakse, ali modificirana živa cjepiva lakše potiču aktivnu imunost u odnosu na inaktivirana u prisustvu jednake količine materalnih protutijela (GAMOH i sur., 2005.). To je jedan od razloga zbog kojih se smjericama vodiča Svjetske organizacije veterinarima male prakse (WSAVA) za cijepljenje ne preporučava cijepljenje inaktiviranim cjepivom ako se može koristiti modificirano živo cjepivo.

Zarazni hepatitis pasa treća je zarazna bolest koja pripada bolestima protiv kojih je obvezno cijepljenje sukladno smjericama WSAVA, a uzrokovana je psećim adenovirusom 1 (CAV-1). Manifestira se upalom jetre koja može završiti letalno. Drugi značajan adenovirus pasa je pseći adenovirus 2 (CAV-2) koji uzrokuje traheobronhitis, značajno manje opasnu bolest (EVERMANN i KENNEDY, 2011.). Za navedene pseće adenoviruse ustanovljena je međusobna imunološka križna reakcija. Stoga se kao učinkovito, a istovremeno uz umanjenu rizik, za cijepljenje pasa najčešće koristi modificirano živo cjepivo koje sadrži CAV-2 koje pruža križnu zaštitu protiv CAV-1 (LAPPIN i sur., 2017.). Ovo cjepivo primjenjuje se u pravilu zajedno s cjepivom protiv štenećaka i parvoviroze, a s obzirom na njegova svojstva predstavlja modificirano živo, ali i heterologno cjepivo. Smjernice za cijepljenje WSAVA ne preporučavaju cijepljenje modificiranim živom ili inaktiviranim vakcinom protiv CAV-1 ako je dostupno CAV-2 modificirano živo cjepivo. Navedeni primjer preporuka su veterinarskih stručnjaka kojima se može prevenirati uginuća, izraženost kliničkih znakova te rizik izlučivanja virusa u okoliš spoznajama o optimalnom cijepljenju životinja.

U veterinarskim praksama za liječenje malih životinja cijepljenje pasa protiv štenećaka, psećeg parvovirusa i zaraznog hepatitisa najčešće se provodi korištenjem viševaljanih cjepiva, različitih proizvođača. Neka od njih sadržavaju i druge antigene te se istovremeno koriste za

imunizaciju protiv primjerice leptospiroze, parainfluence i slično. Neovisno o proizvođaču opća preporuka je primjena obveznih cjepiva sa 6-8 tjedana starosti, nadocjepljivnje svaka 2-4 tjedna do navršenih 16 tjedana starosti. Važan dio uspješnog programa cijepljenja štenadi je i „booster doza“ koja se aplicira u dobi od 12 mjeseci ili 12 mjeseci nakon primitka zadnje doze u opisanoj primovakcinaciji. Na taj način osiguravamo visoku razinu zaštitnog imuniteta kod bilo koje jedinke koja eventualno nije dovoljno reagirala u primarnoj seriji cijepljenja.

Panleukopenija mačaka fatalna je i vrlo zarazna bolest mačaka, uzrokovana virusom protoparvovirus-1 mesojeda, najčešće sojem virusa mačje panleukopenije FPV (eng. Feline Panleucopenia Virus), iz porodice *Parvoviridae* (BARRS, 2019.). Zaražene mačke kontaminiraju okoliš tjelesnim izlučevinama. Izrazito je otporan na fizikalne i kemijske uvijete te u okolišu mjesecima ostaje sposoban za infekciju, a prenosi se izravnim dodirima s jedne jedinke na drugu ili posredno prijenosom iz kontaminiranog okoliša (GREENE, 2012.a). Imunokompetentne jedinke mogu biti asimptomatski prenositelji virusa i kao takve predstavljaju rizik za necijepljene mačke (BERGMANN i sur., 2019.). Iz navedenog vrlo je važno cjepivom zaštititi mačke, ne samo one koje borave u dvorištima, uzgajivačnicama i skloništima, već i one koje nemaju mogućnost izlaženja. Preporuča se cijepiti novonabavljene mačice prije dolaska u kućanstvo gdje su boravile ili još uvijek borave druge mačke, posebice ako su preboljele infekciju. Cjepivo protiv ove zarazne bolesti obično se primjenjuje kao viševaljano cjepivo zajedno sa cjepivom protiv mačjeg kalicivirusa, te mačjeg herpesvirusa, uzročnika rinotraheitisa mačaka. Najviše se koristi modificirano živo cjepivo koje kao antigen sadrži oslabljeni parvovirus bez adjuvansa, a primjenjuje se u obliku parenteralnog ili intranazalnog pripravka. Koristi se kao monovalentno ili češće viševaljano cjepivo koje pruža brz nastup učinkovite imunosti (DIGANGI i sur., 2011.; LAPPIN 2012.).

Mačji zarazni rinotraheitis uzrokovan mačjim herpesvirusom tip 1 (FHV-1) bolest je gornjih dišnih puteva u mačaka. Lezije uzrokovane virusom predisponirajuće su mjesto za prodor sekundanih uzročnika bakterijske upale pluća. Nakon preboljenja infekcije FHV-1 mačke postaju latentni nositelji virusa. Izlaganje stresu kao što je ulazak u novi dom, putovanje ili terapija glukokortikoidima dovode do reaktivacije infekcije kada mačke izlučuju virus sekretom iz nosa, usne šupljine i sluznice spojnice. Latentno inficirane mačke su u pravilu asimptomatske. Porođaj i laktacija su stresori koji mogu rezultirati reaktivacijom latentne infekcije i izlučivanjem virusa. Iako su mačiči latentno inficiranih mačaka zaštićeni materalnima protutijelima, u slučaju niskog titra protutijela dolazi do subkliničke infekcije i nove generacije latentno inficiranih životinja (GREENE, 2012. b).

Mačiji kaliciivirus (FCV) čest je i važan uzročnik respiratornih infekcija različitog raspona težine kliničkih znakova koji variraju od blažih infekcija, ulceracija usne šupljine, sve do pneumonije te sistemskih oboljenja koja mogu završiti fatalno (COYNE i sur., 2006.). Virus se vrlo dobro prilagođava uvjetima okoline u kojoj se nalazi. Nakon infekcije virus se zadržava u tonzilama preboljelih mačaka, no za razliku od herpesvirusne infekcije manji broj životinja prolazi cikluse reinfekcije. S obzirom na trajno zadržavanje uzročnika u populacijama mačaka, zaštitno cijepljenje preporuča se naročito na mjestima gdje se nalazi veći broj jedinki različite dobi, kao što su to skloništa i uzgajivačnice. Cijepljenje će ublažiti kliničke znakove bolesti, ali neće spriječiti mogućnost infekcije (RADFORD i sur., 2007.). Nekoliko je vrsta komercijalno dostupnih cjepiva i dolaze najčešće u kombinaciji FHV-1 i FCV kao bivalentna cjepiva ili kao viševaljana cjepiva s drugim antigenima. Modificirana živa cjepiva primjenjuju se parenteralno. dostupne su i intranazalne modificirane žive vakcine (GASKELL i sur., 2007.). One pružaju bolju zaštitu, te im je prednost i brži nastanak zaštite (COCKER i sur., 1984.; COCKER i sur., 1986.; LAPPIN i sur., 2006.), ali često izazivaju blage nuspojave (ORR i sur., 1980.; LAPPIN i sur., 2006.). Na tržištu EU dostupno je modificirano živo cjepivo protiv mačjeg kaliciirusa koje sadrži F9 soj bez adjuvansa u obliku pripravaka za intranazalnu ili parenteralnu primjenu, kao monovalentno cjepivo ili kao kombinirano cjepivo sa mačjim herpesvirusom. Osim navedenoga dostupna su i inaktivirana cjepiva bez adjuvansa koja sadrže dva soja virusa, FCV 431 i FCV G1 (POULET i sur., 2005.). Rezultati nekih istraživanja pokazuju razlike u imunološkom odgovoru potaknutim intranazalnom aplikacijom FVRCP (FHV-1, FVC i panleukopenija mačaka) gdje se u odnosu na parenteralnu primjenu modificiranog živog cjepiva brže potiče imunološki odgovor (LAPPIN i sur., 2009.). Nakon jedne primjene intranazalnog cjepiva već četvrtog dana moguće je postići zaštitni titar protutijela za zaštitu od herpesvirusa (LAPPIN i sur., 2006.). WSAVA preporuča primovakcinaciju mačića sa navršenih 6-8 tjedana, te revakcinacijom svaka 2-4 tjedna do navršenog 16. tjedna starosti. Odrasle mačke primovakciniraju se sa dvije doze u razmaku od 2-4 tjedna. S navršenih 6 mjeseci ili godinom dana aplicira se booster doza, te je preporuka za revakcinaciju svake 3 godine ili svake godine kod mačaka za koje postoji veći rizik od zaraze.

Goveđi respiratorni sincicijski virus vrlo se lako prenosi, čest je uzročnik upale pluća goveda svih dobnih kategorija kao i izravnih te neizravnih gubitaka u stočarstvu (VALARCHER i TAYLOR, 2007.). Zaštitno cijepljenje može biti najbolja metoda sprječavanja širenja ove bolesti, čija uspješnost ovisi o prisutnosti materalnih protutijela koja onemogućavaju ili umanjuju humoralni odgovor imunskog sustava na primjenu cjepiva.

Intranazalno cjepivo koje sadržava živog atenuiranog uzročnika potiče dobar humoralni odgovor. Rezultati nekih istraživanja (KIMMAN i sur., 1989.) pokazuju kako je primjenom cjepiva izravno na sluznicu moguće zaobići inaktivaciju cjepnog soja materalnim protutijelima koja se ne nalaze u dovoljnom titru za zaštitu teladi, ali u dovoljnom da ometaju nastanak aktivne imunosti teladi. Intranazalno cjepivo primjenjeno seropozitivnoj teladi potiče imuni odgovor dostatan za zaštitu od bolesti 9 tjedana nakon jednokratne primjene. S obzirom da je zaštita slabija do navršenih 3,5 mjeseca starosti (ELLIS i sur., 2013.), kako bismo osigurali kontinuiranu zaštitu životinja potrebno ih je nadocijepiti, što se može učiniti intramuskularnom primjenom s obzirom na činjenicu da se koncentracija materalnih protutijela u serumu teladi nakon 100 dana smanjuje na 1-3% početne vrijednosti (CHAPPIUS, 1998.). Goveđi parainfluenca-3 virus ima mnogo sličnosti s respiratornim sincicijskim virusom, od same morfologije i replikacije do onih u fiziologiji i patofiziologiji. Ubrzo nakon njegova otkrića razvijeno je inaktivirano cjepivo te modificirano živo cjepivo (KING i GALE, 1963.). Komercijalno dostupna živa cjepiva atenuirana su pasažama kroz kulture stanica ili biranjem mutanata osjetljivih na temperaturu (VANGEEL i sur., 2009.).

Virusni proljev goveda klinički se manifestira inaparentnom infekcijom, znakovima u respiratornom, spolnom i probavnom sustavu te perzistentnom infekcijom teladi oboljeloj u fetalnom razvoju (FULTON, 2013.). Takva telad vrlo su značajna u održavanju infekcije unutar populacije tako što iscjetkom iz nosnih prohoda izlučuju velike količine virusa u okoliš što infekcijom gravidnih krava u konačnici dovodi do nastanka novih perzistentno inficiranih goveda (FULTON i sur., 2006.). Strategija suzbijanja ove bolesti u stadu svodi se na pronalaženje trajno zaraženih životinja i njihovo izlučivanje iz uzgoja, kao i provođenje zaštitnog cijepjenja modificiranim živim cjepivom ili inaktiviranim cjepivom. Modificirano živo cjepivo potaknut će stanični i humoralni imuni odgovor, dok inaktivirano cjepivo pokazuje ograničenja u stimulaciji staničnog imunog odgovora te zahtijeva češću primjenu, ali je cjepivo izbora u gravidnih krava. Cilj primjene modificiranog živog cjepiva je stvaranje imuniteta stada kako bi se spriječilo širenje virusa na prijemljive životinje (NEWCOMER i sur., 2017.).

Rinopneumonitis konja virusna je bolest konja uzrokovana konjskim alfaherpesvirusom tip-1 (EHV-1) koja se primarno očituje kao respiratorna infekcija, a može se očitovati neurološkim simptomima i/ili pobačajem kobila. Virusne čestice šire se izravnim kontaktom, aerosolom te predmetima kontaminiranim iscjetkom iz nosa oboljelih životinja ili plodnim vodama i pobačenim plodom (HARLESS i PUSTERLA, 2006.). Nakon prirodne infekcije EHV-1 ostaje latentan u trigeminalnom gangliju ili limfocitima te se nakon izlaganja stresu,

transportu ili liječenju kortikosteroidima reaktivira i aktivno širi u latentno inficiranih životinja (FOOTE i sur., 2003.). U Republici Hrvatskoj su se s obzirom na značaj ove bolesti godinama propisivala mjere obveznog pretraživanja u slučaju pobačaja kobila te neuroloških simptoma. Ove mjere s obzirom na promjene zakonskog okvira trenutno nisu na snazi, ali je za očekivati da će uskoro biti ponovo implementirane. S obzirom kako je u cijepljenih životinja tijekom bolesti znatno blaži, imunoprofilaksa rinopneumonitisa konja vrlo je važna metoda suzbijanja bolesti, bez obzira što ne rješava problem kliconoštva u latentno inficiranih konja. U imunoprofilaksi rinopneumonitisa konja cilj je potaknuti humoralni te stanični imuni odgovor (RUSLI i sur., 2014.). Atenuirana cjepiva potaknut će imuni odgovor najslabiji prirodnoj infekciji, a od njih najčešće se koriste EHV-1 mutanti osjetljivi na temperaturu (Ts) te timidin kinaza negativni mutanti (Tk) primjenjeni intranazalno ili intramuskularno (PAILLOT i sur., 2008.). Intramuskularna primjena modificiranog živog cjepiva značajno smanjuje izlučivanje virusa, što je s obzirom na činjenicu kako je izlučivanje virusa iscjetkom iz nosa glavni način širenja unutar populacije vrlo dobar pokazatelj uspješnosti cijepljenja (GOODMAN i sur., 2006.). Istraživanja humoralnog imunog odgovora sluznica nakon eksperimentalne infekcije sa EHV-1 pokazuju kako se protutijela IgA razreda nalaze u najvišem titru kao odgovor na infekciju te njegovu ulogu u smanjenju izlučivanja virusa. Intranazalno primjenjeno modificirano živo cjepivo ne potiče proizvodnju IgA protutijela sluznice u odnosu na intramuskularnu primjenu, što se pripisuje atenuaciji cijepnog soja (BREATHNACH i sur., 2001.).

Influenca konja globalno je raširena virusna zarazna bolest kopitara uzrokovana virusom influence konja (EIV), podtipovima H3N8 i H7N7, za koje se vjeruje kako potječe od ptičjih influenza virusa (MADIĆ i sur., 1996.). Podtip EIV H3N8 evolucijski se podijelio u euroazijsku liniju i američku liniju iz koje su daljnjim razdvajanjem nastale podlinije Florida, Kentucky i Južnoamerička podlinija. Virusi euroazijske linije nisu izdvojeni od 2007. godine, a virusi podtipa H7N7 u posljednjih preko 40 godina (BRYANT i sur., 2009.). Mortalitet oboljelih kopitara nije visok, a klinički znakovi influence konja uključuju vrućicu, letargiju, anoreksiju, iscjedak iz nosa te suhi neproduktivan kašalj, ali mogu progredirati u sekundarnu bakterijsku bronhopneumoniju koja je često fatalna za mlade životinje (POWELL i sur., 1995., PERGLIONE i sur., 2016.). Zbog eksplozivnog širenja problematika ove bolesti značajna je u zemljama čije populacije ekonomski ovise o konjima kao i zemljama s razvijenim konjičkim sportom i čestim izložbama (SACK i sur., 2019.). Kako bi bilo učinkovito, zaštitno cijepljenje treba biti prilagođeno cirkulirajućem soju, a provedeno nad svim životinjama koje su u kontaktu s konjima iz različitih područja, a posebice je visok rizik od infekcija u međunarodnom prometu



životinja. Prirodna infekcija virusom influence konja potiče imuni odgovor proizvodnjom IgA razreda protutijela u najvišem titru na sluznici nosne šupljine te IgGa i IgGb podrazreda protutijela u serumu. Cijepljenje inaktiviranim cjepivom potiče proizvodnju podrazreda IgG(T) što ovakva cjepiva čini nedostatnim u dugoročnoj zaštiti (NELSON i sur., 1998.). Modificirano živo cjepivo pripravljeno od atenuiranog toplinski prilagođenog mutanta virusa influence potencira aktivaciju mehanizama potrebnih za adekvatan i dugoročan imuni odgovor. Istraživanje provedeno na ponijima cijepljenim intranazalno modificiranim živim cjepivom koji nisu do tada bili izloženi virusu influence konja pokazalo je kako modificirano živo cjepivo potiče proizvodnju serumskih protutijela IgGa i IgGb podrazreda čime pruža zaštitu od kliničkih znakova bolesti, ali nedostatna proizvodnja IgA podrazreda protutijela sluznica ne sprječava izlučivanje virusa u okoliš. Bez obzira na navedeno, kontinuiranom imunoprofilaksom moguće je zaštititi populaciju od širenja virusa (LUNN i sur., 2001.). Istraživanje učinkovitosti cjepiva i trajanje imuniteta u neimunih konja nakon jednokratne intranazalne primjene pruža značajniju bolju zaštitu u odnosu na inaktivirano cjepivo do 6 mjeseci (TOWNSEND i sur., 2001.). Cjepivo nije registrirano za korištenje u Europi.

Respiratorni i reproduktivni sindrom svinja (PRRS) globalno je prepoznat kao najznačajniji uzrok ekonomskih gubitaka u svinjogojstvu uzrokovan PRRS virusom (PRRSV). U respiratornom sustavu virusi uništavaju alveolarne makrofage što rezultira imunosupresijom. Uzrokuju sindrom karakteriziran poremećajima u reprodukciji, neplodnošću, pobačajima, anoreksijom te sekundarnom upalom pluća. Razlikuju se dva genotipa, Europski tip 1 (PRRSV-1) i Sjevernoamerički tip 2 (PRRSV-2) klasificirana kao dvije vrste virusa koje uzrokuju jednake kliničke manifestacije. Replikacija ovih RNK virusa stvara mutacije različitih varijanti unutar svakog genotipa što potiče široku antigensku i genetsku varijaciju te otežava razvoj učinkovitog cjepiva širokog spektra (TIZARD, 2021.b). Genetička istraživanja pokazuju kako PRRS virus ima jednu od najvećih stopa mutacije među RNK virusima (HANADA i sur., 2005.). U suzbijanju PRRS ključno je preventivno cijepljenje krmača kako bi se spriječilo horizontalno i vertikalno prenošenje virusa na prijemljive životinje (RENUKARADHYA i sur., 2015.). U odnosu na trenutno dostupna inaktivirana cjepiva, modificirana živa cjepiva jedina dokazano potiču razvoj stanično posredovane imunosti (ZUCKERMANN i sur., 2007.), dok većina inaktiviranih cjepiva potiču imuni odgovor nositelji kojeg su neutralizacijska protutijela (ZINKERNAGEL i sur., 2001.). Istraživanjem je dokazana uloga neutralizacijskih protutijela u potpunom odstranjivanju virusa iz pluća te u smanjivanju transplacentarnog prijenosa u pokusnim infekcijama PRRSV (OSORIO i sur., 2002.), što je vjerojatno i osnova učinkovitosti

inaktiviranih cjepiva. Cijepljenjem nazimica i krmača na farmi s visokom seroprevalencijom PRRSV značajno su se poboljšali reproduksijski parametri kao i broj odbijene prasadi (PAPATSIROS i sur., 2006.). Cijepljenje krmače manje su sklone pobačajima, brže se vraćaju u estrus, dok je prasad cijepljenih nazimica i krmača veće porođajne težine, te su gubitci pri odbiću u odnosu na prasad necijepljenih nazimica značajno manji. Nedostatak modificiranih živih cjepiva očituje se mogućnošću mutacija cijepnog soja ili njegovom rekombinacijom s terenskim sojem virusa što dovodi do povratka virulencije. Mutirani i rekombinantni sojevi uzrokuju reproduktivne i respiratorne poremećaje, a prasad ovih krmača postaju kliconoše. Nedostatak atenuiranih cjepiva je i što se korištenjem sjemena cijepljenih nerastova virus može unijeti u populaciju (TIZARD, 2021.b).

### ***Atenuirana bakterijska cjepiva***

Antigen koji se koristi u ovakvoj vrsti cjepiva je bakterija koja se podvrgava različitim modifikacijama kako bi se umanjila njena patogenost, a sačuvala imunogenost. Atenuirana bakterijska cjepiva proizvedena su genetičkom manipulacijom ili serijskim pasažama bakterija kroz određeni medij te odabiranjem njihovih mutanata sa poželjnim svojstvima. Unatoč ograničenoj upotrebi, ovakva cjepiva pokazuju dobre rezultate u nedostatku drugog načina kontrole i suzbijanja bolesti. Mala količina antigena primjenjena ovakvim cjepivom u organizmu domaćina sposobna je za umnažanje, ali ne može izazvati kliničke znakove bolesti zbog oslabljenih virulentnih determinanti. Važno je postići ovu "zlatnu sredinu" jer se na taj način organizmu domaćina prezentira svaki stadij umnažanja bakterija, što osigurava veći spektar i duljinu zaštite, a samo cjepivo čini sigurnim za upotrebu. Korištenjem konvencionalnih metoda serijske pasaže *in vitro* postoji mogućnost vraćanja virulencije *in vivo*, što je razlog zašto ovakvim metodama nije razvijen veći broj cjepiva. Genetičkim modifikacijama dobivaju se preciznije mutacije, posebice gena povezanih sa virulentnim determinantama. Ograničenja molekularnim metodama dobivanja cijepnog soja predstavlja činjenica da su u nekim slučajevima upravo virulentne determinante ključne za razvoj imuniteta. Atenuacija uzročnika uzgojem uz dodatak kemijskih agensa može rezultirati poželjnim mutacijama kao i selekcija temperaturno osjetljivih mutanata sposobnih za preživljavanje samo u nekim organskim sustavima životinje, primjerice nosnoj šupljini.

Bakterije iz roda *Brucella* uzročnici su bolesti različitih vrsta domaćih i divljih životinja. U veterinarskoj medicini *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* i *Brucella suis* značajni su uzročnici pobačaja i neplodnosti preživača i svinja, a u čovjeka uzrokuju bolest koja se naziva

malteška groznica. Pobačajem u zadnjoj trećini graviditeta uz gubitak teladi dolazi do produljenja međutelidbenog razdoblja, smanjene proizvodnje mlijeka, a mogu se razviti i infekcije maternice zbog zaostajanja posteljice. Bruceloza svinja smanjuje broj prasadi po leglu, a vrijedne rasplodne životinje nužno je uputiti na prisilno klanje. Osoblje koje radi sa životinjama ili sirovinama životinjskog podrijetla izloženo je opasnosti od zaraze što uz činjenicu kako uzrokuje velike gubitke u stočarstvu stavlja naglasak na važnost cijepljenja u epizootiološkim prilikama kada iskorijenjivanje bolesti nije moguće (HEIDARY i sur., 2022.). Stoga se u nekim državama primjenjuju živa atenuirana cjepiva za brucelozu koja su jeftinija za proizvodnju, a poticanjem staničnog i humoralnog imunog odgovora učinkovitija u odnosu na inaktivirana ili rekombinantna cjepiva (MANSOORI i POURMAND, 2016.). Nedostatak je što nije moguće razlikovati protutijela nastala korištenjem cijepnog soja od onih nastalih nakon prirodne infekcije. Iz ovog razloga ovakva cjepiva nisu pogodna u zemljama gdje se provode rutinska serološka pretraživanja u strategiji kontrole i suzbijanja bolesti kao što je to slučaj sa Republikom Hrvatskom u kojoj se izlučuju sve serološki pozitivne životinje.

### **3.3 Cjepiva koja sadržavaju mrtve/inaktivirane mikroorganizme**

Inaktivirana cjepiva sadrže mikroorganizme inaktivirane izlaganjem nepovoljnim temperaturama ili kemijskim agensima koji dovode do denaturacije proteina. Struktura mikroorganizma uglavnom ostaje sačuvana dok se gubi mogućost umnažanja i infekcije u makroorganizmu (JORGE i DELLAGOSTIN, 2017.). Najčešće korišteni agensi kojima se to postiže su formaldehid, beta-propiolakton, etilen imin te timerosal. Inaktivirana cjepiva su stabilnija, ne predstavljaju rizik od vraćanja virulencije, sigurna su za primjenu u imunokompromitiranih životinja, mogu biti korisna u cijepljenju gravidnih životinja, kao i onih inficiranih retrovirusima, kod kojih se upotreba živih cjepiva ne preporuča. Nisu sposobne invadirati stanice i aktivirati citotoksične T limfocite. S obzirom da primarno stimuliraju humoralnu imunost, ovakva cjepiva zahtijevaju dodatnu primjenu pomoćnih tvari, adjuvansa, radi poticanja imunološkog odgovora, kao i višekratnu primjenu kako bi se dosegla zadovoljavajuća razina imunosti. Trajanje imunosti je kraće te se mogu primjeniti isključivo parenteralno (MINKE i sur. 2004.). Najistaknutiji primjer ovakvog cjepiva dakako je cjepivo protiv bjesnoće. Bjesnoća je akutna neurološka kontagiozna virusna zarazna bolest toplokrvnih životinja i čovjeka. U većini zemalja u razvoju psi su glavni prijenosnici bjesnoće na ljude, dok

u razvijenim zemljama ključnu ulogu u održavanju infekcije imaju divlje životinje (HANLON i CHILDS, 2013.). Iako postoji nekoliko zabilježenih slučajeva preživljavanja ove bolesti, bjesnoća se smatra bolešću sa 100 % mortalitetom. S obzirom na navedeno Svjetska organizacija za zdravlje životinja (WOAH) preporuča cijepljenje inaktiviranim ili RABV glikoprotein vektorskim cjepivom pse i mačke starije od 3 mjeseca u područjima gdje je endemski prisutna bjesnoća (DAY i sur., 2016.). Živo atenuirano cjepivo proizvedeno pasazama na staničnoj kulturi nije sigurno za upotrebu zbog mogućeg vraćanja virulencije (CLIQUET i sur., 2015.), dok inaktivirana zbog slabije učinkovitosti zahtijeva primjenu ajduvansa (NOKIREKI i sur., 2017.) od kojih se najčešće koriste oni na bazi aluminijevog hiroksida (SÜLIOVÁ i sur., 1997., DI STEFANO i sur., 2013.). Revakcinacija se ponavlja svakih 12 mjeseci ili 3 godine ovisno o uputama proizvođača, što je u Republici Hrvatskoj i zakonski regulirano. U slučaju da je prošlo više od 12 mjeseci od primjene booster doze, revakcinacija se smatra primovakcinacijom. Također je propisano da se za cijepljenje pasa, mačaka i pitomih vretica može koristiti samo monovalentno cjepivo od umrtvljenih, visokoimunogenih sojeva virusa bjesnoće.

Infekcije mačaka retrovirusima vrlo su značajne kao najčešće bolesti domaćih mačaka, posebice mužjaka s učestalim kontaktom s drugim jedinkama (GLEICH i HARTMANN, 2009.). Virus mačke leukemije (FeLV) onkogeni je patogen te jedan od najvažijih uzročnika bolesti domaćih mačaka. Prenosi se izravnim dodiranjem pomoću slin tijekom uređivanja, igre, ugrizom te dijeljenjem posuda za vodu i hranu (FRANCIS i sur., 1977.). Ishod infekcije ovisi o imunosnom statusu jedinke, dobi kao i samom soju virusa i ulaznim vratima infekcije. U vrlo rijetkim slučajevima nakon oronazalne infekcije vrlo niskim dozama virusa imunosni sustav može suzbiti umnažanje virusa kada ne dolazi do viremije. Tada govorimo o abortivnoj infekciji, kod koje mačke posjeduju visok titar neutralizirajućih protutijela. Novija istraživanja provedena PCR metodama otkrivaju kako se ipak u većem broju ovakvih slučajeva virus može ipak dokazati, ali prisutnost neutralizirajućih protutijela čini rizik od ponovnog izlučivanja virusa ili razvoja bolesti niskim. U slučaju regresivne infekcije, imunološki odgovor zaustavlja viremiju prije ili ubrzo nakon što infekcija zahvati koštanu srž. U fazi viremije uz vrućicu može doći do povećanja limfnih čvorova. U fazi viremije mačke izlučuju virus što traje kod većine mačaka 3-6 tjedana. Nakon prestanka viremije iako je provirusna DNK prisutna u genomu stanice domaćina virus se ne izlučuje u okoliš, a infekcija se može reaktivirati u stanjima imunosupresije, stresa ili gravidnosti. Ako u ranom stadiju infekcije imuni odgovor nije bio zadovoljavajući, dolazi do progresivne infekcije. Virus se nekontrolirano umnaža u limfoidnom

tkivu i koštanoj srži, a viremija traje dulje od 16 tjedana. Mačke u progresivnoj infekciji razvijaju bolesti povezane s FeLV-om od kojih najčešće ugibaju (GREENE i sur., 2012.c) Cijepljenjem mačaka protiv virusa mačje leukemije želimo spriječiti trajnu viremiju tijekom koje je životinja izvor infekcije, kao i latentne infekcije te razvoj kliničkih oblika mačje leukemije (SPARKES, 2003.). Uputno je cijepiti samo zdrave životinje, dok prisutnost materlnih protutijela utječe na uspješnost imunizacije što veterinari moraju uzeti u obzir kod sastavljanja protokola cijepljenja.

Influenca svinja akutna je respiratorna bolest uzrokovana različitim sojevima virusa influence A. Najčešće izolirani su podtipovi H1N1, H1N2 te H3N2. Virusi podtipa H1N2 u svinja nastali su rekombinacijom virusa iz podtipova H1N1 i H3N2. U zaraženom uzgoju pobol je visok, klinički znakovi nastupaju naglo u obliku vrućice, opće slabosti i kašlja uz izražen abdominalni tip disanja. Ukoliko ne dođe do razvoja sekundarne bakterijske infekcije ili drugih komplikacija svinje ozdrave nakon kratkog vremena (CVETNIĆ, 2005.). Bez obzira na blagi tijek bolesti, profilaksa influence svinja ima važnu ulogu u epidemiologiji virusa influence. Svinje posjeduju receptore za humane i ptičje viruse influence, dakle virus sa čovjeka i ptica lako prelazi na svinje. Ukoliko se oba virusa nađu u organizmu, genetski segmenti oba virusa mogu rekombinacijom proizvesti novi virus (SAVIĆ, 2011.). Osnova cijepljenja protiv influence temeljena je na neutralizaciji površinskog proteina hemaglutinina (HA) specifičnim protutijelima koja nastaju u kontaktu organizma s virusom. Glava globularnog proteina HA varijacijama je najpodložniji dio virusa, što dosadašnja cjepiva ne čini dostatnima u svojoj svrsi. Virus influence sadrži dva evolucijska mehanizma kojima osigurava mogućnost opstanka u populaciji, antigensko skretanje i antigenska izmjena (KIM i sur., 2018.). Antigensko skretanje proces je u kojem dolazi do manjih promjena antigenskih determinanti točkastim mutacijama u genomu virusa (BOTH i sur., 1983.). Neke od njih pojavljuju se na antigenim područjima glikoproteina HA ili neuraminidaze (NA), što rezultira nastajanjem novih varijanti te posljedično infekcijom organizma unatoč postojećem imunitetu. Antigenska izmjena mehanizam je koji rezultira potpunom promjenom gena koji kodiraju proteine HA i/ili NA, kao i drugih protein virusa preslagivanjem gena dvaju virusa tijekom istovremene infekcije stanice (WEBSTER i sur., 1982.). Upravo radi ovih mogućnosti nastanka izmjenjenih ili potpuno novih sojeva virusa influence, za cijepljenje se primjenjuju inaktivirana cjepiva. S obzirom na vrijeme koje mora proteći u razvoju samog cjepiva, razumljivo je koliki je rizik od neusklađenosti komercijalno dostupnih cjepiva s mogućim izmjenjenim terenskim sojevima virusa influence.

Također, ako su u vrijeme cijepljenja prisutna materalna protutijela doći će do interferencije istih sa imunim odgovorom cijepljene jedinke, što predstavlja još jedan izazov u cijepljenju.

Virusni arteritis konja respiratorna je i reproduktivna zarazna bolest kopitara uzrokovana virusom virusnog arteritisa konja (EAV - eng. Equine arteritis virus) (BALASURIYA i sur., 2013.). U mnogim slučajevima bolest prolazi asimptomatski, dok određeni sojevi virusa u nekih životinja uzrokuju različite kliničke simptome koji su posljedica oštećenja krvnih žila, kao što su vrućica, anoreksija, leukopenija, edem kapaka i ventralnih dijelova tijela, urtikarije po koži te klinički znakovi oboljenja dišnog sustava (TIMONEY i MCCOLLUM, 1993.). Bolest uzrokuje gospodarske gubitke uslijed pobačaja kobila, teških kliničkih oboljenja i mogućih uginuća, najčešće ždrebadi, te kao perzistentna infekcija pastuha koji su vrlo značajni prenosnici bolesti. Kako bi se smanjilo širenje infekcije i spriječili ekonomski gubici, na razini država uvedeni su kontrolni programi otkrivanja i suzbijanja ove bolesti. FUKUNAGA i sur. (1990.) razvili su formalinom inaktivirano cjepivo koristeći Bucyrus soj, kojim se u konja može postići visoki titar neutralizirajućih protutijela koji ih štiti od klinički manifestne infekcije. Cjepivo je uspješno u prevenciji pobačaja kobila te štiti pastuhe od perzistentne infekcije reproduktivnog sustava ukoliko se cijepu neinficirane životinje (FUKUNAGA i sur., 1990.). Komercijalno dostupno cjepivo s inaktiviranim uzročnikom uz dodatak ajduvansa učinkovito štiti od nastanka perzistentne infekcije pastuha do 6 mjeseci nakon dvokratnog cijepljenja (WHALEN i sur., 1998.), međutim niti jedno cjepivo pouzdano ne zaustavlja kliconoštvo u pastuha inficiranih prije cijepljenja.

U profilaksi rinopneumonitisa konja također se koriste inaktivirana cjepiva, s onemogućenim umnažanjem cjepnog virusa u makroorganizmu, što ih čini sigurnijima za upotrebu u odnosu na ranije spomenuta živa atenuirana cjepiva. Ova cjepiva pokazala su se uspješnim u smanjenju kliničkih znakova bolesti te sprječavanju izlučivanje virusa u okoliš i infekciji ždrebadi cijepljenih kobila (KHUSRO i sur., 2020.). Međutim, rezultati nekih istraživanja (MINKE i sur., 1998., HELDENS i sur., 2001.) pokazali su kako inaktivirana cjepiva daju samo djelomičnu zaštitu te da nisu učinkovita u zaštiti od pobačaja.

Bolest plavog jezika globalno je proširena nekontagiozna zarazna bolest domaćih i divljih preživača uzrokovana virusom iz roda *Orbivirus*. Mogu obolijeti goveda, koze i ovce te divlji preživači. Uzročnika prenose komarčići iz roda *Culicoides* zbog čega bolest ima sezonsko pojavljivanje. Bolest uzrokuje izravne štete zbog kliničkih oblika oboljenja dišnog i probavnog sustava te pobačaja gravidnih životinja. U slučaju izbivanja bolesti zakonski se propisuje granice

zaraženog područja u krugu polumjera od najmanje 100 km od mjesta gdje je bolest utvrđena, a ugroženog najmanje 50 km od granice zaraženog područja. Mjere koje se provode unutar ovih područja uključuju zabranu kretanja životinja prijemljivih na bolest te neškodljivo uklanjanje uginulih životinja. Svaka pojava ove bolesti mora se prijaviti WOA-u. Prisutna je na svim kontinentima, a globalne štete uzrokovane ovom bolešću procjenjuju se na tri milijarde dolara godišnje (RUSHTON i LYONS, 2015.). S obzirom na navedeno jasno je kako je bolest od velike ekonomske važnosti. Zaštitno cijepljenje provodi se inaktiviranim cjepivom za koje je značajno da mora sadržavati kao antigen serotip uzročnika koji je prisutan na nekom području zbog izostanka križne imunološke zaštite između različitih serotipova. Tako se u Republici Hrvatskoj provodilo cijepljenje inaktiviranim cjepivom koje kao antigen sadrži serotip 4, a cjepivo bi se moralo prilagoditi epizootiološkoj situaciji u slučaju pojave infekcija drugim serotipom. Protutijela se u serumu mogu dokazati 7 dana nakon aplikacije cjepiva (TIZARD, 2021.a).

### **3.3.1 Inaktivirana bakterijska cjepiva**

Inaktivirana bakterijska cjepiva pripremaju se uzgojem bakterija te izlaganjem istih fizikalnim ili kemijskim metodama inaktivacije koje će osigurati nemogućnost umnažanja bakterija u organizmu domaćina, a njegovom imunološkom sustavu će uspješno prezentirati cijelu bakterijsku stanicu za poticanje nastanka protutijela. Nemogućnost umnažanja bakterija u organizmu čini ovakvu vrstu cjepiva sigurnim za upotrebu, ali trajanje imunosti kraće je u odnosu na atenuirana cjepiva. Kako bi osigurali dužu zaštitu inaktivirana cjepiva primjenjuju se višekratnim dozama i često se u njih dodaju adjuvansi.

U veterinarskoj medicini inaktivirana bakterijska cjepiva rutinski se koriste za sprječavanje leptospiroze. Leptospiroza je globalno raširena zoonoza uzrokovana bakterijom *Leptospira interrogans* klasificiranom u više od 230 serovarova koji mogu inficirati domaće životinje i kućne ljubimce. Bakterije u organizam dospijevaju preko neozlijeđene sluznice i ozlijeđene kože odakle se krvotokom nasele u parenhimske organe gdje se umnažaju, a oblik bolesti ovisi o vrsti domaćina i patogenosti serovara. U goveda i svinje uzrok su poremećaja u reprodukciji, pobačaja, rađanja avitalnog podmlatka te agalaksije, a u konja u kroničnim slučajevima periodičkog uveitisa. Psi oboljeli od leptospiroze mogu imati blagi tijek bolesti, a u teškim infekcijama razvijaju vrućicu, dehidraciju uslijed povraćanja i proljeva, zatajenje bubrega, te

uremiju. Zaražena životinja mjesecima mokraćom izlučuje leptospire u okoliš, a u stajaćim vodama leptospire mogu preživjeti tjednima (CVETNIĆ, 2008.). Čovjek se može zaraziti mokraćom zaražene životinje, ili kontaminiranom hranom, vodom ili tlom. Infekcija čovjeka može rezultirati zatajenjem bubrega i jetre, meningitisom i smrću. Isključivanje leptospiroze u slučaju pobačaja kobila propisano je zakonom, a cijepljenje pasa svakako se preporuča kao glavna strategija sprječavanja leptospira da mokraćom dospiju u okoliš i postanu izvor zaraze za čovjeka, ali i domaće životinje. Za cijepljenje pasa koristi se inaktivirano cjepivo koje sadržava inaktivirane bakterije serovara *Canicola* i *Icterohaemorrhagiae*. Idealno cjepivo treba zaštititi životinje od infekcije te spriječiti kliconoštvo, u čemu su trenutno dostupna cjepiva pokazala dobar uspjeh (BERGMANN ESTEVES i sur., 2022.). Inducirani imuni odgovor protiv leptospiralnog lipopolisaharida kao antigena primarno se očituje tvorbom IgM protutijela, što je razlog za kratko trajanje zaštitnog imuniteta inaktiviranim cjepivom (ADLER, 2015.). Još jedan veliki nedostatak ovakvih cjepiva uzak je spektar djelovanja koji zahtijeva poznavanje lokalno proširenih serovara jer među njima često izostaje križna zaštita. Iako cjepivo ne sprječava naseljavanje leptospira u zavijenim bubrežnim kanalicima, značajno smanjuje broj životinja koje urinom izlučuju leptospire u okoliš (SANT'ANNA DA COSTA i sur., 2022.) te se cijepljenje pasa protiv leptospiroze inaktiviranim cjepivima smatra preporučenim ovisno o epizootiološkoj situaciji.

*Erysipelothrix rhusiopathiae* gram pozitivna je štapićasta bakterija uzročnik vrbanca u svinja te erysipeloida u ljudi, prisutna u tonzilama zdravih svinja i u tlu, odakle se oralnim putem svinje najčešće inficiraju. Bolest se najblaže manifestira utikarijama okruglog do romboidnog oblika, tzv. vrbancevim ožaricama po vratu, prsima, leđima i butovima oboljelih životinja. Ovaj oblik može prijeći u septikemiju kada se oboljele svinje izdvajaju iz čopora, može se pojaviti proljev i povraćanje, a mogu i naglo uginuti. Utikarija može prijeći i u kronični oblik bolesti karakteriziran ukočenim i otečenim zglobovima uz znakove zatajenja srca uslijed verukoznog endokarditisa. Zbog visokog pobola i pomora, prisustva bakterije u okolišu kao i organizmu zdravih svinja, vrbanc je ekonomski značajna bolest u svinjogojstvu, a imunoprofilaksu čini jeftinom i pristupačnom metodom koja može dati pozitivne rezultate u borbi protiv ove bolesti. Svinje cijepljene inaktiviranim bakterijskim cjepivom općenito su relativno dobro zaštićene od bolesti, a dokazano je da će razviti u manjem broju i blaže znakove kroničnog artritisa u odnosu na necijepljene (OPRIESSNIG i sur., 2020.). Cijepljenjem rasplodnih ženki također je dokazano da se povećava broj živorođene prasadi i smanjuje se



razdoblje između prasenja (HOFFMANN i BILKEI, 2002.) što ima značajne pozitivne gospodarske učinke.

### **3.4 DIVA cjepiva**

U prometu životinja, proizvodima te nusproizvodima životinjskog podrijetla poštuju se stroge zakonske odredbe, ipak unatoč tome, postoji rizik od pojavnosti bolesti u novim područjima gdje ona do sada nije bila zabilježena. Zbog različitog vremena inkubacije zaraznih bolesti, kliconošta, latentnih infekcija, karantena novonabavljenih životinja, kao jedna od najboljih mjera opće profilakse, ipak ne jamči prevenciju pojavnosti bolesti (PASICK, 2004.). Cijepljenje je jedna od metoda kojom se pokušava spriječiti pojava bolesti, a svrha cijepljenja je stvaranje protutijela kako bi se organizam u slučaju izloženosti patogenu zaštitio od infekcije. U strategijama suzbijanja zaraznih bolesti vrlo je izazovno razlikovati protutijela stvorena nakon preboljenja prirodne infekcije od protutijela nastalih kao posljedica cijepljenja. Kako bi se olakšala ova diferencijacija, razvijena su markirana cjepiva koja omogućuju razlikovanje imunološkog odgovora u inficiranih u odnosu na cijepljene životinje. Takva cjepiva se nazivaju DIVA cjepiva (DIVA – engl. differentiating infected from vaccinated animals) (DAY i SCHULTZ, 2011.). Osnovni princip ovakvih cjepiva bazira se na činjenici da će tvorba protutijela potaknuta cjepnim antigenom biti različita u odnosu na onu uslijed prirodne infekcije (UTTENTHAL i sur., 2010.). DIVA cjepiva temeljena su na nedostatku barem jednog imunogenog proteina u cijepnom soju uzročnika. Nakon cijepljenja takvim cjepivom, koriste se dijagnostički testovi za određivanje antitijela protiv antigena koja nisu prisutni u cijepnom soju (LIU i sur. 2013.). Na ovaj način omogućeno je, uslijed različitog serološkog odgovora u cijepljenih i inficiranih životinja, istovremeno provoditi provođenje mjera nadzora proširenosti infekcija u populaciji u svrhu iskorjenjivanja zaraznih bolesti uz istovremeno zaštitno cijepljenje (PASICK, 2004.). Prednosti ovih cjepiva su različite: moguće je razlikovati cijepljene životinje od zaraženih, uzročnik se ne umnaža, ne širi u organizmu i ne izlučuje se iz organizma, ne sadrže potpun mikroorganizam niti njegov genetski materijal, samo mutirane sojeve, prevalencija i incidencija infekcije u cijepljenoj populaciji može se proučavati u terenskim uvjetima kao i njihova učinkovitost. Vrlo su obećavajuća u programima iskorjenjivanja zaraznih bolesti i stjecanjima statusa stada slobodnog od neke bolesti (VAN OIRSCHOT i sur., 1996.).

Zarazni rinotraheitis goveda uzrokovan je goveđim alfaherpesvirusom-1 (BoHV-1) koji uz respiratorne uzrokuje i bolesti spolnog sustava, ali i brojna klinička stanja kao što su konjunktivitis, encefalitis, enteritis te poremećaje u reprodukciji (NANDI i sur., 2009.). Nakon akutne faze virus ulazi u latentnu fazu lokalizirajući se u tonzile, trigeminus ili križne ganglije. S navedenih mjesta se virus može reaktivirati u slučaju parazitarnih invazija, liječenja kortikosteroidima ili na neki drugi način izazvanom imunodeficijencijom te prenositi na druge jedinke u populaciji bez kliničkih znakova bolesti (WINKLER i sur., 2000.). U suzbijanju ovog virusa u EU preporuča se upotreba DIVA cjepiva, označena na način da se dijagnostičkim testovima mogu razlikovati cijepljene životinje od inficiranih. Komercijalno je dostupno modificirano živo označeno cjepivo s uklonjenim genom koji kodira glikoprotein E i enzim timidin kinazu te inaktivirano označeno cjepivo uklonjenog gena koji kodira glikoprotein E. Ova cjepiva sigurna su za upotrebu, pružaju dobru zaštitu od infekcije i kliničkih znakova bolesti, ali ne onemogućuju ranije uspostavljenu latenciju (PETRINI i sur., 2022.). U zemljama s visokom prevalencijom bolesti DIVA cjepiva koja sadrže soj virusa BoHV-1 bez glikoproteina E (gE) sigurna su strategija u suzbijanju bolesti (MURATORE i sur., 2017.). Korištenjem ovakvih cjepiva omogućeno je da serološkim dokazom protutijela za glikoprotein E pouzdano potvrđujemo infekciju terenskim sojem (PETRINI i sur., 2020.).

Bolest Aujeszzkoga, poznata i pod nazivom lažna bjesnoća, zarazna je bolest uzrokovana virusom *Herpesvirus suis* 1 od koje mogu obolijeti mnoge vrste domaćih životinja, a najznačajnija je za svinjogojstvo. Divlje i domaće svinje prirodni su domaćini virusa, a klinički znakovi, ovisno o dobi svinje, variraju od smrti u 100% oboljelih u prvim danima života do blagih inaparentnih infekcija u odraslih svinja. Uzrok je poremećaja u reprodukciji svinja, a posljedično velikih ekonomskih gubitaka, zbog čega je i uvrštena u bolesti za koje se provode programi nadziranja i iskorjenjivanja na nacionalnoj razini. Kao i u ranije opisanom za uzročnika zaraznog rinotraheitisa goveda, i ovdje cijepljenjem glikoprotein E negativnim živim atenuiranim cjepivom moguće je razlikovati prirodno zaražene životinje od cijepljenih, što omogućuje provođenje programa nadzora uz istovremenu imunoprofilaksu. Glikoprotein E (gE) neesencijalni je protein virusne ovojnice čijim se uklanjanjem ne utječe na mogućnost umnažanja virusa u domaćinu. Imunogenost cjepiva je očuvana, a prisustvom ili izostankom protutijela za gE razlikujemo prirodno zaraženu od cijepljene životinje (FREULING i sur., 2017.).

### 3.5 Rekombinantna cjepiva

Idealno cjepivo mora biti učinkovito te biti sigurno za upotrebu, bez značajnijih nuzućinaka, a put aplikacije kao i pohrana samog cjepiva jednostavan za veterinaru. Prethodno nabrojeni tipovi cjepiva donekle udovoljavaju ovim kriterijima, ali s obzirom da ipak postoje određeni nedostaci u njihovoj upotrebi, nove tehnologije u razvoju cjepiva potpuno su drugačiji pristup od inaktiviranih te modificiranih živih cjepiva. Načinjena genetičkim inženjerstvom rekombinantna cjepiva potiču imuni odgovor makroorganizma na specifičan antigen uzročnika u odnosu na velik broj antigena kojima se izlaže provođenjem cijepjenja cjepivima načinjenim prethodno opisanim tehnologijama. Na ovaj način moguće je proizvesti cjepiva poboljšane učinkovitosti kao i predvidjeti odgovor organizma na primjenu ovakvih cjepiva. Velika prednost ovakvih cjepiva nalazi se u tome da ne postoji rizik od vraćanja virulencije (VAN KAMPEN, 2001.).

#### 3.5.1 Vektorska cjepiva

Ovakva cjepiva nastaju uklanjanjem gena iz virusa, bakterije ili protozoe i njihovom zamjenom genima koji kodiraju antigene patogene koje će prezentirati cijepljenoj životinji. Mikroorganizam korišten kao rekombinantni vektor genetski je modificiran na način da se uklanja dio genoma koji omogućuje replikaciju u stanicama cijepljene životinje, a sposobnost da prezentira antigen ostaje sačuvana. Vektor može biti oblikovan tako da zajedno s antigenom isporučuje imunomodulator kojim je moguće izazvati snažniji imuni odgovor. Cijepljena životinja ne izlaže se cijelom patogenu, stoga je mogućnost za razvijanje cijepne bolesti zanemariva, a živi vektor može inducirati adekvatan humoralni i stanično posredovani imunološki odgovor (SHEPPARD, 1999.).

Virusni vektori najčešće istraživani u ovakvom pristupu imunizaciji su relativno veliki DNK virusi iz porodica virusa boginja, adenovirusa te herpesvirusa, a eksperimentalno najčešće primjenjena je virus vakcinije (SÁNCHEZ-SAMPEDRO i sur., 2015.). Veličina njihove DNK olakšava umetanje novih dijelova genoma, ali pruža i mogućnost umetanja više gena u jedan vektor, što čini kombiniranu vakcinu. Velika prednost korištenja virusnih vektora mogućnost je specifične konstrukcije koja omogućuje usmjeravanje i dopiranje cijepnog antigena do specifičnih tkiva i stanica. Neka cjepiva ove vrste izazivaju dovoljno jak i dugotrajan imuni

odgovor već nakon jedne primjene i bez upotrebe adjuvansa. Kako bi se povećala sigurnost njihove upotrebe mnogi virusni vektori genetski se modificiraju na način koji sprječava replikaciju. Ovakvi vektori trebaju se primjeniti u većoj dozi kako bi potaknuli adekvatan imuni odgovor (TRAVIESO i sur., 2022.). Ipak, u proizvodnji rekombinantnog vektora može doći do promjene staničnog tropizma i patogenosti, a zbog širokog spektra domaćina nije isključena mogućnost rekombinacije s divljim sojevima u terenskim uvjetima.

Rekombinantno cjepivo koje eksprimira glikoprotein virusa bjesnoće RABV-G korišteno je u pokušaju kontrole širenja bjesnoće u divljih životinja u Europi i Sjevernoj Americi (WEYER i NEL, 2014.). Istraživanja novih rekombinantnih cjepiva protiv bjesnoće intenzivna su i danas (ZHAO i sur., 2022.).

Još 1997. godine odobreno je rekombinantno cjepivo protiv uzročnika štenećaka (rCDV) koje sadrži samo gene za hemaglutinin (HA) i fuzijski protein (F) uz korištenje kao vektora virusa boginja kanarinca. Virus boginja kanarinca u organizmu domaćina eksprimira navedene gene u proteine za koje organizam domaćina stvara protutijela. Za razliku od modificiranog živog cjepiva ne postoji rizik od vraćanja virulencije, što ova cjepiva čini sigurnijima za upotrebu. Rezultati istraživanja utvrđivanja titra protutijela u pasa cijepljenih modificiranim živim cjepivom, te onih kojima je aplicirana booster doza korištenjem rekombinantnog cjepiva, pokazuju značajno veću razinu protutijela u serumu onih koji su primili rekombinantno cjepivo. Atenuirani uzročnik umnaža se u organizmu nakon cijepljenja modificiranim živim cjepivom, a nakon primovakcinacije u trenutku primjene booster doze za njega već postoje protutijela. Za razliku od toga za antigene koje eksprimira vektorsko rekombinantno cjepivo ista protutijela nisu učinkovita što omogućava jači imunološki odgovor (LARSON i SCHULTZ, 2006.).

Najdrastičniji primjer širenja i gospodarskih gubitaka uslijed unosa uzročnika u necijepljenu populaciju bio je 2007. godine kada je uvoz subklinički inficiranih konja iz Japana izazvao epidemiju influence konja u Australiji u kojoj se cijepljenje nije provodilo (YAMANAKA i sur., 2008.). U pokušaju kontrole ove epizootije korišteno je prvo vektorsko cjepivo na temelju živog rekombinantnog virusa boginja kanarinca koji sadržava gene za HA sojeva EIV A/eq/Newmarket /2/93 (H3N8) i A/eq/Kentucky/94 (H3N8) koje je i komercijalno dostupno kao polivalentno u kombinaciji s toksoidom tetanusa. S obzirom da cjepivo sadrži samo HA gen virusa influence, imunoenzimnim testom (ELISA) bilo je moguće razlučiti imunost nastalu kao posljedica imunizacije cijepnim sojem od one nastale prirodnom

infekcijom. Šesnaest mjeseci nakon prvog potvrđenog slučaja influence konja i dvanaest mjeseci nakon posljednjeg prijavljenog slučaja, Australija ponovno postaje država slobodna od ove bolesti upravo zahvaljujućim korištenju vektorskog cjepiva (PAILLOT i EL-HAGE, 2016.). S obzirom na problematiku brze mutacije virusa influence, dovoljno brz razvoj cjepiva s antigenom prilagođenim cirkulirajućem soju, uz vremensku zahtjevnost postupka registracije i stavljanja na tržište, u praksi nije lako izvediv. Dodatni problem je nemogućnost razlikovanja protutijela nastalih primjenom cjepiva s cijelim uzročnikom i onih potaknutih prirodnom infekcijom. Međutim, kao što je vidljivo iz navedenog primjera u Australiji, cijepljenje virusnim vektorskim cjepivom zaobilazi dio navedenih prepreka i pruža potencijal u kontroli epizootija i epidemija, posebice emergentnih zaraznih bolesti u slučaju pojave kojih je iznimno važno moći zaštititi populaciju cijepljenjem uz istovremeno rano dokazivanje infekcija.

Kao vektori osim virusa mogu se koristiti i atenuirane bakterije, koje se najčešće pokusno koriste kao vektori antigena u oralnim cjepivima. U ovom području većina istraživanja usmjerena je na proizvodnju invazivnih sojeva salmonela koji su dovoljno oslabljeni da ne uzrokuju bolest kada ih se primjenjuje peroralno. Atenuacija ovih bakterija prvi je korak u korištenju patogenih sojeva kao vektora, a bazira se na uklanjanju gena koji kodiraju sintezu metaboličkih enzima uzrokujući auktrofiju, odnosno nesposobnost organizma da sintetizira određen organski spoj potreban za njegov rast. Potpunim uklanjanjem ili modificiranjem važnih gena uključenih u purinske ili aromatske puteve sinteze, stvaraju se auktrofni mutanti (FRANCIS, 2018.). Takve atenuirane bakterije salmonela se pokusno koriste kao vektori nekoliko antigena, uključujući nošenje antigena bakterija *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori* te virusa zaraznog gastroenteritisa (ROLAND i BRENNEMAN, 2013.). Ostale bakterije koje bi mogle poslužiti kao potencijalni vektori su *Vibrio cholera*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus casei*, te *Streptococcus gordonii* (DA SILVA i sur., 2014.). Bakterije mliječno kiselog vrenja također se razmatraju kao potencijalni vektori, koji zbog svoje apatogenosti ne zahtijevaju prolaženje kroz proces atenuacije što ih i čini privlačnim kandidatom za izbor bakterijskih vektora. S druge strane upravo njihova neinvazivnost predstavlja potencijalna ograničenja u upotrebi u odnosu na invazivne bakterije (DETMER i GLENTING, 2006.).

Protozoalni vektori relativno su nova tehnologija vektorskih cjepiva temeljena na korištenju protozoalnog parazita iz roda *Eimeria* genetski modificiranog da može biti vektor različitih antigena. Dosadašnja istraživanja kokcidija kao vektora potvrđuju izvedivost, no zbog

još uvijek nejasnog mehanizma imunosti domaćina protiv infekcije i reinfekcije kokcidijama do korištenja komercijalno dostupnih vektorskih cjepiva proći će neko vrijeme (TANG i sur., 2020.).

### 3.5.2 Subjedinična cjepiva

Posebna kategorija inaktiviranih cjepiva su subjedinična cjepiva. Osnovni i najjednostavniji oblik subjediničnog cjepiva je onaj u kojem je infektivni patogen rastavljen na sastavne dijelove, komponente, koje primjenjene u životinja potiču željeni imunološki odgovor bez mogućnosti umnažanja u domaćinu. Prezentacijom pojedinog dijela mikroorganizma kao antigena u organizmu domaćina potaknuti će se imuni odgovor samo na taj antigen, a naravno izostaje mogućnost umnažanja u domaćinu. Komponente mogu biti polisaharidi, pročišćeni proteini ili polisaharidi. Polisaharidna subjedinična cjepiva sastoje se primjerice od dugolančanih molekula ugljikohidrata koji čine bakterijsku kapsulu. Komponente najčešće ne sadrže signal ključan za stimulaciju imunološkog odgovora. U slučaju da je upravo izočna komponenta potrebna za stimulaciju T limfocita, proteinski nosač, kao što je primjerice toksoid, značajno poboljšava učinkovitost ovakve vrste cjepiva (DINTZIS, 1992.). U pokušaju da se proizvede podražaj jednak onom kod prirodne infekcije ova cjepiva sadrže različite adjuvanse koji djeluju kao imunostimulatori. Veličina čestica isto tako je prepoznata kao ključan čimbenik u učinkovitosti cjepiva što je razlog zašto noviji pristupi u razvoju cjepiva oponašaju veličinu prirodnog patogena (SKWARCZYNSKI i TOTH, 2017.).

Sindrom kržljanja prasadi po odbiću jedan je od sindroma povezanih s infekcijom cirkovirusom svinja 2 (eng. Porcine Circovirus 2 – PCV2) koji može uzrokovati subkliničke infekcije, reproduktivne poremećaje, nekrotizirajuće pneumonije, encefalopatije, a imunosupresivno djelovanje inficirane prasadi čini ih podložnima i drugim uzročnicima bolesti. Uz to što je uzrok velikih ekonomskih šteta u globalnom svinjogojstvu, PCV2 se sastoji od osam podtipova te ima najveću stopu nukleotidnih izmjena među jednolančanim DNK virusima (FIRTH i sur, 2009.; XIAO i sur., 2015.; FRANZO i sur, 2016.), što otežava primjenu uspješnog cjepiva protiv ovog virusa. U molekularnoj biologiji otvoreni okvir čitanja ORF (eng. Open Reading Frame) dio je sekvence DNK između startnog i stop kodona. Većina stuktturnog proteina PCV2 kodirana je pomoću ORF2 (NAWAGITGUL i sur., 2000.), a većina dostupnih cjepiva protiv cirkovirusne infekcije svinja temelje se upravo na imunološkom odgovoru na

strukturne proteine PCV2. Subjedinična cjepiva protiv PCV2 sadržavaju strukturne proteine virusa te se njihovom primjenom potiče nastanak PCV2 specifičnih neutralizirajućih protutijela koji sprječavaju viremiju i značajno smanjuju izlučivanje virusa u odnosu na inaktivirana cjepiva (FORT i sur., 2008.).

Adjuvansi (*lat. adjuvare, pomoći*) su molekule, spojevi ili makromolekularni kompleksi koji pojačavaju razinu i trajanje specifičnog imunološkog odgovora na antigen uzrokujući minimalnu toksičnost. Dodatak adjuvansa cjepivima pojačava, održava i usmjeruje imunogenost antigena, smanjuje količinu potrebnog antigena, broj potrebnih imunizacija, te čak i u imunokompromitiranih jedinki poboljšava učinkovitost cjepiva. Adjuvansi moraju biti prikladno formulirani kako bi cjepiva bila stabilna i postigla maksimalan učinak. Neki od kriterija uključeni u odabiru formulacija adjuvansa su vrsta željenog imunološkog odgovora, put aplikacije cjepiva te izbjegavanje znatnih štetnih učinaka. Optimalno formulirani adjuvans siguran je za upotrebu, stabilan prije primjene, biorazgradiv, lako se eliminira iz organizma, a dovoljno je sposoban za poticanje specifičnog imunog odgovora i jeftin je za proizvodnju (REED i sur. 2009.). Poseban tip adjuvansa su takozvani depo adjuvansi koji kontinuirano otpuštaju antigen čime produžuju imunološki podražaj te štite antigene od razgradnje. Primjer ovakvog pomoćnog sredstva emulzija je ulja u vodi. Drugi oblik adjuvansa sastoji se od pojačavanja prezentacije antigena pomoću čestica koje isporučuju antigen dendritičkim stanicama, a imunostimulirajuće reagira na čestice od topivih antigena. Primjeri takvih adjuvansa uključuju emulzije, mikročestice, imunostimulirajuće komplekse te liposome. Neki antigeni potiču imunološke reakcije tako da oštećuju tkiva i uzrokuju lokalnu upalu. Adjuvansi na bazi aluminijske soli uzrokuju oslobađanje citokina, emulzije vode u ulju također uzrokuju oštećenje tkiva, adjuvansi na bazi saponina mogu selektivno stimulirati aktivnost pomoćničkih stanica tip 1 (TH1). Adjuvansi mogu biti i produkti mikroorganizama koji stimuliraju izlučivanje interleukina 1 (IL-1) i interleukina 2 (IL-2) te, ovisno o korištenom produktu, stimuliraju stanični ili humoralni odgovor. Često korišteni imunostimulatori podrijetlom od mikroorganizama su njihovi lipopolisaharidi ili njihovi detoksicirani proizvodi, kao i inaktivirane bakterije iz rodova *Corynebacterium* ili *Mycobacterium*. Mnogi komercijalno dostupni i korišteni adjuvansi kombinacije su navedena četiri glavna tipa i mehanizma djelovanja (TIZARD, 2021.c).

### 3.5.3 Cjepiva od umjetno sintetiziranih peptida

Poznavajući antigenu strukturu patogena, moguće je umjetno sintetizirati peptide koji će poslužiti kao antigen za cijepljenje (FORNER i sur., 2021.). Ovakva cjepiva sigurna su za proizvodnju, njima se lako rukuje, te se jednostavno pohranjuju, jeftinija su za proizvodnju od subjediničnih cjepiva. Pomoću ovakvih cjepiva moguće je izazvati proizvodnju vrlo specifičnih protutijela, što može biti korisno u dijagnostici i istraživanjima (MELOEN i sur., 1995.). Umjetno sintetizirani peptidi omogućuju nastanak vrlo specifične imunosti upravo zbog načina imunizacije uz korištenje specifičnih i jasno određenih antigena (DAY i SCHULTZ, 2011.).

Primjer ovakvog cjepiva je eksperimentalno cjepivo za pseći parvovirus. Kako je glavna komponenta kapside psećeg parvovirusa, te značajan antigen, protein VP2, načinjeno je rekombinantno cjepivo tako da se ovaj protein eksprimira u bakulovirusu. Ekspimirani protein se svojom strukturom i imunološkim odgovorom kojeg potiče ne razlikuje od prirodnog VP2, a cijepljenje ovakvim cjepivom izaziva bolji imunološki odgovor od inaktiviranog cjepiva (LOPEZ i sur., 1992.). Temeljem ovakvih istraživanja zaključeno je i potvrđeno u istraživanjima da je N-terminalna domena proteina VP2 visoko imunogena te da njena sintetska proizvodnja može biti osnova razvoja sintetskog peptidnog cjepiva za ovu bolest (CASAL i sur., 1995.).

### 3.5.4 DNK cjepiva

DNK rekombinantna cjepiva koriste plazmid kao vektor određenog dijela DNK patogena koji će se ekspresijom u stanicama domaćina prezentirati domaćinu kao antigen. Princip ovog načina imunizacije temelji se na fagocitozi i proizvodnji te prezentaciji antigena. Dakle ovom vrstom cjepiva životinje se imuniziraju plazmidom koji nosi gen virusnog ili bakterijskog proteina. Gen se ubacuje u plazmid bakterijske stanice zajedno s odgovarajućim genetskim elementima, kao što su promotori kontrole transkripcije i poliadenilacijski signalni slijed za stabilnu i učinkovitu translaciju. Bakterijske stanice uzgojene u hranjivom mediju nakon izolacije mikrofiltracijom podvrgavaju se kemijskim ili fizikalnim metodama koje dovode do lize stanica. Nakon pročišćavanja lizata različitim postupcima preostaje DNK plazmid koji uz dodatak pomoćnih tvari može biti korišten kao vektor DNK antigena za imunizaciju (XENOPOULOS i PATTNAIK, 2014.). Plazmid se izravno aplicira životinji, a



gen u stanicama domaćina prolazi transkripciju i translaciju pomoću staničnih mehanizama domaćina, što rezultira produkcijom za domaćina stranog proteina. Ovakva cjepiva od posebnog su interesa za veterinarstvo, a jeftinija su za proizvodnju od drugih komercijalno dostupnih cjepiva. Temperaturno su stabilna i sigurna za transport, što je vrlo korisno u imunoprofilaksi divljih životinja kada će cjepivo duže vrijeme biti izloženo vanjskim uvjetima. Nadalje, ovakva cjepiva ne interferiraju s materalnim protutijelima što je posebno važno u imunoprofilaksi mladunčadi koja imaju veći rizik od oboljenja u odnosu na starije dobne skupine. Dodatna vrijednost i potencijal ovakvih cjepiva je što postoji mogućnost kombiniranja različitih gena, odnosno razvoja cjepiva za više sojeva patogena istovremeno (REDDING i WERNER, 2009.).

### 3.6 Toksoidna cjepiva

Neke patogene bakterije posjeduju mogućnost tvorbe toksina koji su uzrok mnogih simptoma bolesti nakon infekcije ili unošenja toksina u organizam, katkada i sa smrtnim ishodom. Toksoidna cjepiva proizvode se pročišćavanjem bakterijskog egzotoksina, čija toksičnost se neutralizira kemijskom ili fizikalnom obradom, uz zadržavanje njihove imunogenosti. Takav inaktivirani toksin zove se toksoid, a u cjepivima se uobičajeno adsorbira na aluminijev hidroksid ili fosfat što inducira pojačani imunološki odgovor. Cijepljenjem toksoidima potiče se proizvodnja antitoksoidnih protutijela koja se mogu vezati na toksin čime neutraliziraju njegove štetne učinke, a mehanizam djelovanja je opsonizacija bakterijskih toksina što ih čini dostupnim za fagocitozu (YADAV i sur., 2014.).

Najznačajnija bolest u veterinarskoj medicini za koju se koriste toksoidna cjepiva je tetanus. Tetanus je smrtonosna bakterijska bolest čiji klinički znakovi nastaju kao posljedica otpuštanja neurotoksina tetanusa (TeNT) koji je egzotoksin bakterije *Clostridium tetani*, sporulirajućeg ubikvitarnog anaeroba prisutanog u tlu, prašini i probavnom sustavu različitih životinja (BRUGGEMANN i sur., 2003.). Spore ostaju dugo prisutne u tlu i dospjevaju u organizam najčešće dubokim ozljedama kopita, slučajnim ozljedama kože uzrokovanim oštrim predmetima ili biljkama, nestručnim obavljanjem kirurških zahvata, infekcijama pupka mladunčadi ili nakon teških poroda kontaminacijom sluznice vagine i maternice. U anaerobnim uvjetima spore prelaze u germinativni stadij nakon čega započinje proizvodnja toksina, a smrt nastupa paralizom dišnih mišića i ošita. Osim ublažavanja simptoma ne postoji specifična

terapija, stoga se u slučaju sumnje na tetanus uz kiruršku obradu rane i primjenu antibiotika vrlo učinkovito koristi toksoidno cjepivo (POPOFF, 2020.).

**Tablica 1.** Pregled mehanizma djelovanja, ključnih prednosti i nedostataka konvencionalnih metoda cijepljenja s primjerima

<b>KONVENCIONALNA CJEPIVA</b>				
<b>TIP CJEPIVA</b>	<b>MEHANIZAM DJELOVANJA</b>	<b>PREDNOSTI</b>	<b>NEDOSTACI</b>	<b>PRIMJERI</b>
<b>Cjepiva sačinjena od živih punovirulentnih mikroorganizama</b>	Inokulacija živog virulentnog uzročnika.	Oponašaju se uvijeti kao kod prirodne infekcije.	Značajan rizik od cijepnih bolesti.	Zarazni ektim
<b>Modificirana živa cjepiva</b>	Živ uzročnik smanjene patogenosti i nepromijenjene imunogenosti.	Pokretanje istih staničnih mehanizama kao kod prirodne infekcije. Jednostavna za proizvodnju.	Rizik od vraćanja virulencije. Ne može se primijeniti kod imunosuprimiranih i gravidnih životinja.	<p><b>Virusne bolesti:</b>                      Parvoviroza pasa                      Zarazni hepatitis pasa                      Panleukopenija mačaka                      Mačji zarazni rinotraheitis                      Mačji kalicivirus                      Goveđi respiratorni sincicijski virus                      Rinopneumonitis konja                      Respiratorni i reproduktivni sindrom svinja</p> <p><b>Bakterijske bolesti:</b>                      Bruceloza</p>
<b>Inaktivirana cjepiva</b>	Uzročnik izložen za njega nepovoljnim uvjetima koji dovode do denaturacije proteina i onemogućavanja umnažanja.	Ne postoji rizik od vraćanja virulencije. Mogu se primjenjivati u gravidnih i imunosuprimiranih životinja.	Kratko trajanje imunosti. Mogu se primijeniti isključivo parenteralno.	<p><b>Virusne bolesti:</b>                      Bjesnoća                      Influenca svinja                      Virusni aretritis konja                      Rinopneumonitis konja                      Bolest plavog jezika</p> <p><b>Bakterijske bolesti:</b>                      Leptospiroza                      Vrbanac</p>

---

<b>Toksoidna cjepiva</b>	Pročišćeni i inaktivirani bakterijski egzotoksin.	Potiču organizam na proizvodnju protutijela koja će neutralizirati toksine.	Ne sprječavaju infekciju.	Tetanus Botulizam
------------------------------	--	--	------------------------------	----------------------

---

**Tablica 2.** Pregled mehanizma djelovanja, ključnih prednosti i nedostataka rekombinantnih metoda cijepljenja s primjerima

<b>REKOMBINANTNA CJEPIVA</b>				
<b>TIP CJEPIVA</b>	<b>MEHANIZAM DJELOVANJA</b>	<b>PREDNOSTI</b>	<b>NEDOSTACI</b>	<b>PRIMJERI</b>
<b>DIVA cjeviva</b>	Nedostatak barem jednog imunogenog proteina temeljem kojeg je moguće razlikovati cijepljenu od prirodno oboljele životinje.	Razlikovanjem cijepljene životinje od inficirane mogu biti korištena u programima iskorjenjivanja zaraznih bolesti	Potrebno je koristiti specijalizirane dijagnostičke testove	Zarazni rinotraheitis goveda Bolest Aujeszzkoga
<b>Vektorska cjeviva</b>	Uklanjanje gena iz nepatogenog mikroorganizma koji se koristi kao vektor i umetanje gena koji kodiraju antigene patogena.	Živi mikroorganizmi stimuliraju jači imuni odgovor. Moguće je konstruirati specifičan antigen.	Imuni odgovor na vektor koji se koristi može cijepljenje učiniti manje uspješnim.	Štenećak Influenca konja
<b>Subjedinična cjeviva</b>	Infektivni patogen fragmentiran je na komponente.	Ne postoji mogućnost umnažanja u domaćinu.	Komponente često ne stimuliraju adekvatan imuni odgovor. Potrebno je primijeniti adjuvanse.	Sindrom kržljanja prasadi po odbiću
<b>DNK cjeviva</b>	Imunizacija plazmidom koji kodira gen cijepnog patogena.	Ne interferiraju s materalnim protutijelima. Mogućnost razvoja cjeviva za više sojeva istovremeno.	Upotreba ograničena na proteinske antigene. Potrebno je aplicirati više doza.	Bolest Zapadnog Nila

#### 4. ZAKLJUČCI

Cjepivo je ljekoviti pripravak koji sadržava oslabljene ili mrtve uzročnike zarazne bolesti koji će unešeni u organizam potaknuti imunosti sustav na stvaranje protutijela. Ponovljena interakcija s istim uzročnikom, antigenom, potaknuti će imunološki odgovor i zaštititi organizam od bolesti.

Veterinarska cjepiva imaju ključnu ulogu u sprječavanju pojavnosti bolesti čime izravno poboljšavaju proizvodnost životinja, što osigurava potrebnu količinu namirnica životinjskog podrijetla. Prevencijom bolesti izbjegava se poskupljenje konačnog proizvoda zbog troškova liječenja. Isto tako sprječavaju kontaminaciju okoliša uzročnicima bolesti te neracionalnu upotrebu antibiotika koja dovodi do rezistencije. Cijepljenjem životinja protiv zoonoza štiti se zdravlje ljudi.

Povijesni razvoj cjepiva obuhvaća empirijsku fazu temeljenu na izolaciji, atenuaciji, inaktivaciji i frakcioniranju uzročnika bolesti, princip koji je zadržan do danas, a na koji se razvojem tehnologije i otkrivanjem novih znanstvenih spoznaja nastavlja racionalna era razvoja cjepiva biotehnološkim postupcima.

Regulatorni proces proizvodnje cjepiva slijedi principe dobre laboratorijske prakse, a prikupljeni podaci o sigurnosti proizvoda su standardizirani između Europske unije i trećih zemalja.

Prema vrsti uzročnika zarazne bolesti razlikujemo cjepiva protiv virusa, bakterija i parazita, a ovisno o stupnju oslabljenosti ona mogu biti atenuirana i inaktivirana. Monovalentna cjepiva sadrže antigene jednog uzročnika, polivalentna cjepiva sadrže više podtipova antigena istog uzročnika dok kombinirana cjepiva sadrže antigene dva ili više uzročnika. Idealno cjepivo trebalo bi biti visoko imunogeno, sigurno za upotrebu, pružati zaštitu od horizontalnog i vertikalnog prijenosa te osigurati cjeloživotni imunitet bez nuspojava.

Registrirana cjepiva koja su trenutno u upotrebi daleko su od idealnog modela, no sinergijom primjene novostečenih spoznaja u području biomedicine s modernim pristupom u tehnologiji proizvodnje moguće je nadići postojeće problematike, kao što je vidljivo kroz povijest. Pojedine bolesti koje su nekada izazivale velike ekonomske štete i ugrožavale živote čovjeka i životinja danas su uspješno kontrolirane imunoprofilaksom. Pojava novih zaraznih bolesti izazov je s kojim će se čovječanstvo svakako susretati u budućnosti, a nove tehnologije u razvoju cjepiva sigurno će biti nekoliko koraka bliže idealnom.

## 5. SAŽETAK

Vanja Lončarić

### CJEPIVA U VETERINARSKOJ MEDICINI – TIPOVI, RAZVOJ I PRIMJENA

U ovom radu prikazani su različiti tipovi i razvoj cjepiva u veterinarskoj medicini kao i primjeri njihove primjene s istaknutim prednostima i nedostacima. Uloga cijepljenja kao najvažnije profilaktičke mjere sprječavanja bolesti prepoznata je još kroz povijest. Sustavno provođenje imunoprofilakse dovelo je do iskorjenjivanja nekih zaraznih bolesti. Konvencionalne metode cijepljenja bazirane su na spoznaji kako će imunosni sustav domaćina nakon inicijalne prezentacije antigena cijepljenjem stvoriti protutijela za isti te će u ponovnoj interakciji sa istim antigenom zaštititi domaćina od bolesti. Uzročnik koji se koristi kao antigen može biti živ i oslabljen, kada se govori o atenuiranom cjepivu te mrtav kada je riječ o inaktiviranom cjepivu. Živ uzročnik potiče slične imunosne mehanizme kao i prirodna infekcija, stoga omogućuje stvaranje visoke razine imunosti. Najistaknutiji nedostatak nemogućnost je primjene u imunokompromitiranih životinja, za koje se preporuča upotreba sigurnijeg inaktiviranog cjepiva. Kako bi se dosegla zadovoljavajuća razina imunosti ovakva cjepiva zahtijevaju primjenu adjuvansa te više primjena. Nove znanstvene spoznaje dovode do razvitka rekombinantnih cjepiva koja sadrže genetički manipulirane dijelove antigena što onemogućava umnažanje u organizmu domaćina i povrat virulencije. Upravo u toj prednosti krije se nedostatak ovakvog pristupa te je kao i kod inaktiviranih cjepiva nužan dodatak adjuvansa. Toksoidna cjepiva dobivena pročišćavanjem bakterijskog toksina potaknuti će proizvodnju neutralizirajućih antitoksoidnih protutijela i omogućiti zaštitu od negativnih učinaka toksina za koji ne postoji specifična terapija.

Cjepiva mogu sadržavati i više podtipova istog uzročnika ili više različitih antigena, a mogu se primijeniti različitim putevima aplikacije koji isto tako imaju ulogu u poticanju staničnog i humoralnog imuniteta. U razvoju cjepiva nakon odabira antigena koji će potaknuti odgovarajući imuni odgovor isti se ispituje na ciljnom domaćinu. Regulatorni proces proizvodnje uključuje ispitivanje kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti u skladu s načelima dobre laboratorijske prakse, a dobiveni podaci koriste se u kasnoj fazi razvoja sukladno smjernicama međunarodnog programa usmjerenog na usklađivanje tehničkih zahtijeva za registraciju veterinarskih proizvoda što omogućuje jedinstveni standard između Europske unije i trećih zemalja.

**Ključne riječi:** imunoprofilaksa, cjepivo, imunitet, antigen, veterinarska medicina

## 6. SUMMARY

Vanja Lončarić

### VACCINES IN VETERINARY MEDICINE – TYPES, DEVELOPMENT AND APPLICATION

This paper presents different types and development of vaccines in veterinary medicine, as well as examples of their application with highlighted advantages and disadvantages. The role of vaccination as the most important prophylactic measure for disease prevention has been recognized throughout history. The systematic implementation of immunoprophylaxis led to the eradication of some infectious diseases.

Conventional vaccination methods are based on the knowledge that the host's immune system, after the initial antigen presentation via vaccination, will produce antibodies for it and protect the host from the disease in a repeated interaction with the same antigen. The causative agent used as antigen can be alive and weakened, in the case of an attenuated vaccine, and dead in the case of an inactivated vaccine. A live pathogen stimulates similar immune mechanisms as in the natural infection, thus creating a high level of immunity. The most prominent disadvantage is the inability of administration in immunocompromised animals, for which a safer inactivated vaccine is recommended. In order to achieve a satisfactory level of immunity, such vaccines require the use of adjuvants and multiple applications. New scientific discoveries lead to the development of recombinant vaccines that contain genetically manipulated parts of the antigen, which prevents multiplication in the host's organism and the return of virulence. It is precisely this advantage that the lack of this approach lies in, and as with inactivated vaccines, the addition of an adjuvant is necessary. Toxoid vaccines obtained by purifying a bacterial toxin will stimulate the production of neutralizing anti toxoid antibodies and provide protection against the negative effects of a toxin for which there is no specific therapy.

Vaccines can contain several subtypes of the same causative agent or several different antigens, and they can be applied through different routes of administration, which also play a role in stimulating cellular and humoral immunity. In the development of a vaccine, after selecting an antigen that will stimulate an appropriate immune response, it is tested on the target host. The regulatory process of production includes testing of quality, safety and efficiency in accordance with the principles of good laboratory practice, and the obtained data is used in the late stage of development in accordance with the guidelines for the registration of veterinary products, which enables a single standard between the European Union and third countries.



**Key words:** immunoprophylaxis, vaccine, immunity, antigen, veterinary medicine

## 7. LITERATURA

ADLER, B. (2015.): Vaccines against leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 387, 251-72. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8\_10.

BARRS, V.R. (2019.): Feline panleukopenia: A re-emergent disease. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 49, 651-670. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.02.006.

BALASURIYA, U.B.R., GO, Y.Y., MACLACHLAN, N.J. (2013.): Equine arteritis virus. *Vet. Microbiol.* 167, 93-122. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.015.

BERG, P., BALTIMORE, D., BOYER, H. W., COHEN, S.N., DAVIS, R. W., HOGNESS, D. S., NATHANS, D., ROBLIN, R., WATSON, J. D., WEISSMAN, S., ZINDER, N. D. (1974.): Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules. *Science* 185:303. PMID: 4600381.

BERGMANN, M., SCHWERTLER, S., SPECK, S., TRUYEN, U., REESE, S., HARTMANN, K. (2019.): Faecal shedding of parvovirus deoxyribonucleic acid following modified live feline panleucopenia virus vaccination in healthy cats. *Vet. Rec.* 185:83. doi: 10.1136/vr.104661.

BERGMANN ESTEVES, S., MOREIRA SANTOS, C., FERREIRA SALGADO, F., PaLDES GONçALES A., GIL ALVES GUILLOUX, A., MARINELLI MARTINS, C., KURIBAIASHI HAGIWARA, M., ALONSO MIOTTO, B. (2022.): Efficacy of commercially available vaccines against canine leptospirosis: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* 40, 1722-1740. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.02.021.

BLOME, S., MOß, C., REIMANN, I., KÖNIG, P., BEER, M. (2017.): Classical swine fever vaccines-State-of-the-art. *Vet. Microbiol.* 206, 10-20. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.01.001.

BOTH, G.W., SLEIGH, M.J., COX, N.J., KENDAL, A.P. (1983.): Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J. Virol.* 48, 52-60. doi: 10.1128/JVI.48.1.52-60.1983.

BREATHNACH, C.C., YEARGAN, M.R., SHEORAN, A.S., ALLEN, G.P. (2001.): The mucosal humoral immune response of the horse to ineffective challenge and vaccination with equine herpesvirus-1 antigens. *Equine Vet. J.* 33, 651-657. doi: 10.2746/042516401776249318.

BRUGGEMANN, H., BAUMER, S., FRICKE, W.F., WIEZER, A., LIESEGANG, H., DECKER, I., HERZBERG, C., MARTINEZ-ARIAS, R., MERKL, R., HENNE, A.,

GOTTSCHALK, G. (2003.): The genome sequence of *Clostridium tetani*, the causative agent of tetanus disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1316-21. doi: 10.1073/pnas.0335853100.

BRYANT, N.A., RASH, A.S., RUSSEL, C.A., ROSS, J., COOKE, A., BOWMAN, S., MACRAE, S., LEWIS, N.S., PAILLOT, R., ZANONI, R., MEIER, H., GRIFFITHS, L.A., DALY, J.M., TIWARI, A., CHAMBERS, T.M. NEWTON, J.R., ELTON, D.M. (2009.): Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006. to 2007. *Vet. Microbiol.* 138, 41-52. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.004.

CASAL, J., LANGEVELD, J.P., CORTES, E., SCHAAPER, W.W., VAN DIJK, E., VELA, C., KAMSTRUP, S., MELOEN, R.H. (1995.): Peptide vaccine against canine parvovirus: identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence. *J. Virol.* 69, 7274-7277. doi: 10.1128/jvi.69.11.7274-7277.1995.

CARMICHAEL, L.E., JOUBERT, J.C., POLLOCK, R.V. (1983.): A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response. *Cornell Vet.* 73, 13-29. PMID: 6337780.

CHAPPIUS, G. (1998.): Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine* 16, 1468-1472. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00110-8.

CLIQUET, F., PICARD-MEYER, E., MOJZIS, M., DIRBAKOVA, Z., MUIZNIECE, Z., JACEVICIENE, I., MUTINELLI, F., MATULOVA, M., FROLICHOVA, J., RYCHLIK, I., CELER, V. (2015.): In-Depth Characterization of Live Vaccines Used in Europe for Oral Rabies Vaccination of Wildlife. *PLoS One* 10: e0141537. doi: 10.1371/journal.pone.0141537.

COCKER, F. M., GASKELL, R. M., NEWBY, T. J., GASKELL, C. J., STOKES, C. R., BOURNE, F. J. (1984.): Efficacy of early (48 and 96 h) protection against feline viral rhinotracheitis following intranasal vaccination with a live temperature sensitive mutant, *Vet. Rec.* 114, 353-354. doi: 10.1136/vr.114.14.353.

COCKER, F. M., NEWBY, T. J., GASKELL, R. M, EVANS, P.A., GASKELL, C. J., STOKES, C. R., HARBOUR, D. A, BOURNE, J. F.(1986.): Responses of cats to nasal vaccination with a live, modified feline herpesvirus type 1. *Res. Vet. Sci.* 41, 323-330. PMID: 3027798.

COYNE, K. P., JONES, B.R., KIPAR, A., CHANTREY, J., PORTER, C.J., BARBER, P.J., DAWSON, S., GASKELL, R.M., RADFORD, A.D. (2006.): Lethal outbreak of disease

associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.* 158, 544-550. doi: 10.1136/vr.158.16.544.

CVETNIĆ, S. (2008.): Leptospiroza. U: Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Ur: Raič, A. Medicinska naklada, Zagreb. 336-346.

CVETNIĆ, S. (2005.): Influenca svinja. U: Virusne bolesti životinja. Ur: Matekalo Draganović, J. Školska knjiga, Zagreb, 99-104.

DA SILVA, A. J., ZANGIROLAMI, T.C., NOVO-MANSUR, M.T., GIORDANO, R.DeC., MARTINS, E.A.L. (2014.): Live bacterial vaccine vectors: An overview. *Braz. J. Microbiol.* 45, 1117-1129. doi: 10.1590/s1517-83822014000400001.

DAY, M. J., SCHULTZ, R. D. (2011.): Vakcinacija. U: Veterinarska imunologija, načela i primjena. Ur.: Šeol Martinec, B. Medicinska naklada, Zagreb, 192-202.

DAY, M.J., HORZINEK, M.C., SCHULTZ, R.D., SQUIRES, R.A. ; Vaccination Guidelines Group (VGG) of the World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) (2016.): WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 57:E1-E45. doi: 10.1111/jsap.2\_12431.

DE GREGORIO, E., RAPPUOLI, R. (2014.): From empiricism to rational design: a personal perspective of the evolution of vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 505-514. doi: 10.1038/nri3694.

DETMER, A., GLENTING, J. (2006.): Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microb. Cell Fact.* 5:23. doi: 10.1186/1475-2859-5-23.

DIGANGI, B.A., LEVY, J.K., GRIFFIN, B., MCGORRAY, S.P., DUBOVI, E.J., DINGMAN, P.A., TUCKER, S.J. (2012.): Prevalence of serum antibody titers against feline panleukopenia virus, feline herpesvirus 1, and feline calicivirus in cats entering a Florida animal shelter. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 241, 1320-1325. doi: 10.2460/javma.241.10.1320.

DINTZIS, R. Z. (1992.): Rational Design of Conjugate Vaccines. *Pediatr. Res.* 32, 376-385. doi: 10.1203/00006450-199210000-00002.

DI PASQUALE, A., PREISS, S., TAVARES DA SILVA, F., GARCON, N. (2015.): Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines* 3, 320 – 343. doi: 10.3390/vaccines3020320.

DI STEFANO, D., ANTONELLO, J.M., BETT, A.J, MEDI, M.B., CASIMIRO, D.R., TER MEULEN, J. (2013.): Immunogenicity of a reduced-dose whole killed rabies vaccine is significantly enhanced by ISCOMATRIX™ adjuvant, Merck amorphous aluminum hydroxyphosphate sulfate (MAA) or a synthetic TLR9 agonist in rhesus macaques. *Vaccine* 31, 4888-4893. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.034.

DODDS, W.J. (2001.): Vaccination protocol for dogs predisposed to vaccine reactions. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 37, 211-214. doi: 10.5326/15473317-37-3-211.

EAGLE, S. R., GAD S.C. (2014.): Vaccines. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* 899-902. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00973-8

ELLIS, J.A., GOW, S.P., MAHAN, S., LEYH, R. (2013.): Duration of immunity to experimental infection with bovine respiratory syncytial virus following intranasal vaccination of young passively immune calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 243, 1602-1608. doi: 10.2460/javma.243.11.1602.

ENTRICAN, G., FRANCIS, M.J. (2022.): Applications of platform technologies in veterinary vaccinology and the benefits for one health. *Vaccine* 40, 2833-2840. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.03.059.

EVERMANN, J.F., KENNEDY, M.A. (2011.): Viral infections. *J. Small Anim. Pract.* 119-129. doi: 10.1016/B978-1-4160-4889-3.00016-4.

FAO (2021.): *FAO Statistical Yearbook – World Food and Agriculture*. Chapter 2. doi:10.4060/cb4477en.

FIRTH, C., CHARLESTON, M. A., DUFFY, S., SHAPIRO, B., HOLMES, E.C. (2009.): Insights into the Evolutionary History of an Emerging Livestock Pathogen: Porcine Circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813-12821. doi: 10.1128/JVI.01719-09.

FOOTE, C.E., GILKERSON, J.R., WHALLEY, J.M., LOVE, D.N. (2003.): Seroprevalence of equine herpesvirus 1 in mares and foals on a large Hunter Valley stud farm in years pre-and post vaccination. *Aust. Vet. J.* 81, 283-288. doi: 10.1111/j.1751-08133.2003.tb12576.x.

FORNER, M., CANAS-ARRANZ, R., DEFAUS, S., DE LEON, P., RODRIGUEZ-PULIDO, M., GANGES, L., BLANCO, E.,SOBRINO, F., ANDREU, D. (2021.): Peptide-Based

Vaccines: Foot-and-Mouth Disease Virus, a Paradigm in Animal Health. *Vaccines* 9, 477. doi:10.3390/vaccines9050477.

FORT, M., SIBILA, M., ALLEPUZ, A., MATEU, E., ROERINK, F., SEGALÈS, J. (2008.): Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine* 26, 1063-1071. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.12.019.

FRANCIS, M.J. (2009.): Safety Assessment of Veterinary Vaccines. In: *Veterinary Pharmacovigilance – Adverse reactions to veterinary medicinal products 2009*. Ed by K.N. Woodward. Wiley-Blackwell Publishing Ltd, pp 347-54.

FRANCIS, M.J. (2018.): Recent Advances in Vaccine Technologies. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 48, 231–241. doi: 10.1016/j.cvsm.2017.10.002.

FRANCIS, M.J. (2020.): A Veterinary Vaccine Development Process Map to assist in the developments of new vaccines. *Vaccine* 38, 4512-4515. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.05.007.

FRANCIS, D.P., ESSEX, M., HARDY, W.D. Jr.(1977.): Excretion of feline leukaemia virus by naturally infected pet cats. *Nature* 269, 252-254. doi: 10.1038/269252a0.

FRANZO, G., TUCCIARONE, C.M., CECCHINATO, M., DRIGO, M. (2016.): Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci. Rep.* 6:39458. doi: 10.1038/srep39458.

FREULING, C.M., MÜLLER, T. F., METTENLEITER, T.C. (2017.): Vaccines against pseudorabies virus (PrV). *Vet. Microbiol.* 206, 3-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.11.019.

FRIEDRICH, K., TRUYEN, U. (2000.): Efficacy of parvovirus vaccines and effectiveness of two vaccination protocols. *Der Praktische Tierarzt.* 81, 988-994.

FUKUNAGA, Y., WADA, R., MATSUMURA, T., SUGIURA, T., IMAGAWA, H. (1990.): Induction of Immune Response and Protection from Equine Viral Arteritis (EVA) by Formalin Inactivated-virus Vaccine for EVA in Horses. *J. Vet. Med.* 37, 135-141. doi: 10.1111/j.1439-0450.1990.tb01036.x.

FULTON, R.W., HESSMAN, B., JOHNSON, B.J., RIDPATH, J., SALIKI, J.T., BURGE, L.J., SJEKLOCHA, D., CONFER, A.W., FUNK, R.A., PAYTON, M.E. (2006.): Evaluation of diagnostic tests used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a,

1b, and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 228, 578-584. doi: 10.2460/javma.228.4.578.

FULTON, R.W. (2013.): Host response to bovine viral diarrhoea virus and interactions with infectious agents in the feedlot and breeding herd. *Biologicals* 41, 31-38. doi: 10.1016/j.biologicals.2012.07.009.

GAMOH, K., SENDA, M., INOUE, Y., ITOH, O. (2005.): Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat. *Vet. Rec.* 157, 285-287. doi: 10.1136/vr.157.10.285.

GASKELL, R., DAWSON, S., RADFORD, A., THIRY, E. (2007.): Feline herpesvirus. *Vet. Res.* 38, 337-354. doi: 10.1051/vetres:2006063.

GLEICH, S, HARTMANN, K. (2009.): Hematology and serum biochemistry of feline immunodeficiency virus-infected and feline leukemia virus-infected cats. *J. Vet. Intern. Med.* 23, 552-528. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0303.x.

GOODMAN, L.B., WAGNER, B., FLAMINIO, M.J., SUSSMAN, K.H., METZGER, S.M., HOLLAND, R., OSTERRIEDER, N. (2006.): Comparison of the efficacy of inactivated combination and modified live virus vaccines against challenge infection with neuropathogenic equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Vaccine* 24, 3636 - 3645. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.01.062.

GREENE, C.E. (2012.a): Feline parvovirus infection. U: *Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth Edition*. Ur: Greene, C.E., Saunders Elsevier: St. Louis, MO, USA, 80–90.

GREENE, C.E. (2012.b): Feline Respiratory Disease. U: *Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth Edition*. Ur: Greene, C.E., Saunders Elsevier: St. Louis, MO, USA, 151-161.

GREENE, C.E. (2012.c): Feline Leukemia Virus Infection. U: *Infectious Diseases of the Dog and Cat, Fourth Edition*. Ur: Greene, C.E., Saunders Elsevier: St. Louis, MO, USA, 108-136.

HAIG, D.A. (1956.): Canine distemper-immunization with avianised virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 27:19–53.

- HANADA, K., SUZUKI, Y., NAKANE, T., HIROSE, O., GOJOBORI, T. (2005.): The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1024-1031. doi: 10.1093/molbev/msi089.
- HANLON, C.A., CHILDS, J.E. (2013.): Chapter 3 – Epidemiology. *Rabies (Third Edition) Scientific Basis of the Disease and Its Management*, 61-121. doi: 10.1016/B978-0-12-396547-9.00003-1.
- HARLESS, W., PUSTERLA, N.P. (2006.): Equine Herpesvirus 1 and 4 Respiratory Disease in the Horse. *Clinical Techniques in Equine practice* 5, 197-202. doi: 10.1053/j.ctep.2006.03.014.
- HARTLEY W. J. (1974.): A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Vet. Pathol.* 11, 301-312. doi: 10.1177/030098587401100403.
- HEIDARY, M., DASHTBIN, S., GHANAVATI, R., MAHDIZADE ARI, M., BOSTANGHADIRI, N., DARBANDI, A., NAVIDIFAR, T., TALEBI, M. (2022.): Evaluation of Brucellosis Vaccines: A Comprehensive Review. *Front. Vet. Sci.* 9:925773. doi: 10.3389/fvets.2022.925773.
- HELDENS, J.G., KERSTEN, A.J., WESTSTRATE, M.W., VAN DEN HOVEN, R. (2001.): Duration of immunity induced by an adjuvanted and inactivated equine influenza, tetanus and equine herpesvirus 1 and 4 combination vaccine. *Vet. Q.* 23, 210-217. doi: 10.1080/01652176.2001.9695116.
- HENDERSON, D.A. (2011.): The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. *Vaccine* 29, 7-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.06.080.
- HICKS, D.J., FOOKS, A.R., JOHNSON, N.(2012.): Development in rabies vaccines. *Clin. Exp. Immunol.* 169, 199–204. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.
- HOFFMANN, C.W., BILKEI, G. (2002.): Case study: chronic erysipelas of the sow – a subclinical manifestation of reproductive problems. *Reprod. Domest. Anim.* 37, 119-120. doi: 10.1046/j.1439-0531.2002.00339.x.
- JORGE, S., DELLAGOSTIN, O.A. (2017.): The development of veterinary vaccines: a review of traditional methods and modern biotechnology approaches. *Biotechnol. Res. Innov.* 1, 6-13. doi: 10.1016/j.biori.2017.10.001.



KHUSRO, A., AARTI, C., RIVAS-CACERES, R.R., BARBABOSA-PLIEGO, A. (2020.): Equine Herpesvirus-1 Infection in Horses: Recent Updates on its Pathogenicity, Vaccination and Preventive Management Strategies. *J. Equine Vet. Sci.* 87:102923. doi: 10.1016/j.jevs.2020.102923.

KIM, H., WEBSTER, R.G., WEBBY, R.J. (2018.): Influenza virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol.* 31, 174-183. doi: 10.1089/vim.2017.0141.

KIMMAN, T.G., WESTENBRINK, F., STRAVER, P.J. (1989.): Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22, 145-60. doi: 10.1016/0165-2427(89)90057-3.

KING, N.B., GALE, C. (1963.): Studies on myxovirus parainfluenza-3 vaccine for prevention of shipping fever in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 142, 881-883.

KNIGHT – JONES, T.J.D., EDMOND, K., GUBBINS, S., PATON, D.J. (2014.): Veterinary and human vaccine evaluation methods. *Proc. Biol. Sci.* 281: 20132839. doi: 10.1098/rspb.2013.2839.

LAPPIN, M.R., SEBRING, R.W., PORTER, M., RADECKI, S.J., VEIR, J. (2006.): Effects of a single dose of an intranasal feline herpesvirus 1, calicivirus, and panleukopenia vaccine on clinical signs and virus shedding after challenge with virulent feline herpesvirus 1. *J. Feline Med. Surg.* 8, 158-163. doi: 10.1016/j.jfms.2005.12.001.

LAPPIN, M.R., VEIR, J., HAWLEY, J. (2009.): Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1, and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free cats after a single administration of two different modified live FVRCP vaccines. *J. Feline Med. Surg.* 11, 159-162. doi: 10.1016/j.jfms.2008.05.004.

LAPPIN, M.R. (2012.): Feline panleukopenia virus, feline herpesvirus-1 and feline calicivirus antibody responses in seronegative specific pathogen-free kittens after parenteral administration of an inactivated FVRCP vaccine or a modified live FVRCP vaccine. *J. Feline Med. Surg.* 14, 161-164. doi: 10.1177/1098612X11432240.

LAPPIN, M. R., BLONDEAU, J., BOOTHE, D., GUARDABASSI, L., LLOYD, D.H., PAPICH, M.G., RANKIN, S. C., SYKES, J. E., TURNIDGE, J., WEESE, J.S. (2017.): Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats:

Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *J. Vet. Intern. Med.* 31, 279-294. doi: 10.1111/jvim.14627.

LARSON, L.J, SCHULTZ, R.D. (2006.): Effect of vaccination with recombinant canine distemper virus vaccine immediately before exposure under shelter-like conditions. *Vet. Ther.* 7, 113-118. PMID: 16871493.

LARSON, L.J, SCHULTZ, R.D. (2008.): Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant? *Vet. Ther.* 9, 94-101. PMID: 18597247.

LOPEZ DE TURISO, J.A., CORTES, E., MARTINEZ, C., RUIZ DE YBANEZ, R., SIMARRO, I., VELA, C., CASAL, I. (1992.): Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *Journal of virology* 66, 2748-2753. doi: 10.1128/jvi.66.5.2748-2753.1992.

LIU, F., WU, X., LI, L., GE, S., LIU, Z., WANG, Z., (2013.): Virus-like particles: promising platforms with characteristics of DIVA for veterinary vaccine design. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 343-352. doi: 10.1016/j.cimid.2013.02.002.

LUNN, D. P., HUSSEY, S., SEBING, R., RUSHLOW, K. E., RADECKI, S. V., WITHAKER-DOWLING, P., YOUNGNER, J. S., CHAMBERS, T. M., HOLLAND JR, R. E., HOROHOV, D. W. (2001.): Safety, efficacy, and immunogenicity of a modified-live equine influenza virus vaccine in ponies after induction of exercise-induced immunosuppression. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 900-906. doi: 10.2460/javma.2001.218.900.

MACKETT, M., SMITH, G.L., MOSS, B. (1982.): Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 7415-7419. doi: 10.1073/pnas.79.23.7415.

MADIĆ, J., MARTINOVIĆ, S., NAGLIĆ, T., HAJSIG, D., CVETNIĆ, S. (1996.): Serological evidence for the presence of A/equine-1 influenza virus in unvaccinated horses in Croatia. *Vet. Rec.* 138, 68. doi: 10.1136/vr.138.3.68.

MANOHAR, M.M., CAMPBELL, B.E., WALDUCK, A.K., MOORE, R.J. (2022.): Enhancement of live vaccines by co-delivery of immune modulating proteins. *Vaccine* 40, 5769-5780. doi:10.1016/j.vaccine.2022.08.059.

- MANSOORI, N., POURMAND, M.R. (2016.): Vaccines and vaccine candidates against brucellosis. *Infect. Epidemiol. Microbiol.* 2, 32-36. doi: 10.18869/modares.iem.2.4.32.
- MARCIANI, D.J., KENSIL, C.R., BELTZ, G.A., HUNG, C., CRONIER, J., AUBERT, A. (1991.): Genetically – engineered subunit vaccine against feline leukaemia virus: protective immune response in cats. *Vaccine* 9, 89-96. doi: 10.1016/0264-410X(91)90262-5.
- MARTELLA, V., ELIA, G. BUONAVOGLIA, C. (2008.): Canine distemper virus. *Vet. Clin. North Am. Small. Anim. Pract.* 38, 787-797. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.007.
- MC VEY, S., SHI, J. (2010.): Vaccines in veterinary medicine: A Brief Review of History and Technology. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40, 381-392. doi:10.1016/j.cvsm.2010.02.001.
- MEEUSEN, E.N.T., WALKER, J., PETERS, A., PASTORET, P.P., JUNGENSEN, G. (2007.): Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microbiol. Rev.* 20, 489-510. doi: 10.1128/CMR.00005-07.
- MELOEN, R. H., CASAL, J. I., DALSGAARD, K., LANGEVELD, J. P. M. (1995.): Synthetic Peptide Vaccines: Success at Last. *Vaccine* 13, 885-886. doi:10.1007/978-1-4613-0357-2\_13.
- MINKE, J.M., AUDONNET, J.C., FISCHER, L. (2004.): Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 35, 425-443. doi:10.1051/vetres:2004019.
- MINKE, J.M., FLORE, P.H., VAARTEN, J., VANDEHOEK, J., WESTSTRATE, M. (1998.): An inactivated EHV-1 and EHV-4 containing vaccine reduces clinical signs in horses infected experimentally with EHV-1 or EHV-4 six months after a single vaccination, in: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (Eds.), *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, UK, 564-565.
- MORGAN, A.J., POLAND, G.A. (2011.): The Jenner Society and the Edward Jenner Museum: Tributes to a physician-scientist. *Vaccine* 29, 152-154. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.08.128
- MURATORE, E., BERTOLOTTI, L., NOGAROL, C., CARUSO, C., LUCCHESI, L., IOTTI, B., ROSATI, S. (2017.): Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis in marker-vaccinated dairy herds: Application of a recombinant gE ELISA on bulk milk samples. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 185, 1-6. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.01.003.

NANDI, S., KUMAR, M., MANOHAR, M., CHAUHAN, R.S. (2009.): Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 10, 85-98. doi: 10.1017/S1466252309990028.

NANDI, S., KUMAR, M. (2010.): Canine parvovirus: current perspective. *Indian. J. Virol.* 21, 31-44. doi: 10.1007/s13337-010-0007-y.

NAWAGITGUL, P., MOZOROV, I., BOLIN, S.R., HARMS, P.A., SORDEN, S.D., PAUL, P.S. (2000.): Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81, 2281-2287. doi: 10.1099/0022-1317-81-9-2281.

NELSON, K. M., SCHRAM, B. R., MCGREGOR, M. W., SHEORAN, A. S., OLSEN, C. W., LUNN, D. P. (1998.): Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination. *Vaccine* 16, 1306-1313. doi: 10.1016/s0264-410x(98)00009-7.

NEWCOMER, B. W., CHAMORRO, M. F., WALZ, P.H. (2017.): Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus. *Vet. Microbiol.* 206, 78-83. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.04.003.

NOKIREKI, T., JAKAVA-VILJANEN, M., VIRTALA, A.M., SIHVONEN, L. (2017.): Efficacy of rabies vaccines in dogs and cats and protection in a mouse model against European bat lyssavirus type 2. *Acta Vet. Scand.* 59, 64. doi: 10.1186/s13028-017-0332-x.

OPRIESSNIG, T., FORDE, T., SHIMOJI, Y. (2020.): *Erysipelothrix* Spp.: Past, Present and Future Directions in Vaccine Research. *Front. Vet. Sci.* 7, 174. doi: 10.3389/fvets.2020.00174.

ORR, C.M., GASKELL, C. J., GASKELL, R. M. (1980.): Interaction of an intranasal combined feline viral rhinotracheitis, feline calicivirus vaccine and the FVR carrier state. *Vet. Rec.* 106, 164-166. doi: 10.1136/vr.106.8.164.

OSORIO, F. A., GALEOTA, J.A., NELSON, E., BRODERSEN, B., DOSTER, A., WILLS, R., ZUCKERMANN, F., LAEGREID, W. W. (2002.): Passive Transfer of Virus-Specific Antibodies Confers Protection against Reproductive Failure Induced by a Virulent Strain of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and Establishes Sterilizing Immunity. *Virology* 302, 9-20. doi:10.1006/viro.2002.1612.

PAILLOT, R., CASE, R., ROSS, J., NEWTON, R., NUGENT, J. (2008.): Equine Herpes Virus – 1: Virus, Immunity and Vaccines. *Open Vet. J.* 2, 68-91. doi: 10.2174/1874318808002010068.

PAILLOT, R., EL-HAGE, C. (2016.): The Use of a Recombinant Canarypox-Based Equine Influenza Vaccine during the 2007 Australian Outbreak: A Systematic Review and Summary. *Pathogens* 5, 42. doi: 10.3390/pathogens5020042.

PAPATSIROS, V.G., ALEXOPOULOS, C., KRITAS, S.K., KOPTOPOULOS, G., NAUWYNCK, H.J., PENSAERT, M.B., KYRIAKIS, S.C. (2006.): Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 53, 266-272. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00965.x.

PASICK, J. (2004.): Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication. *Anim. Health Res. Rev.* 5, 257-262. doi: 10.1079/ahr200479.

PEAD, P.J. (2003.): Benjamin Jesty: new light in the dawn of vaccination. *Lancet.* 362, 2104-2109. doi:10.1016/S0140-6736(03)15111-2.

PENG, Y.M., TAO, J.J., KUANG, S.F., JIANG, M., PENG, X.X., LI, H. (2021.): Identification of Polyvalent Vaccine Candidates From Extracellular Secretory Protein in *Vibrio alginolyticus*. *Front. Immunol.* 12:736360. doi: 10.3389/fimmu.2021.736360.

PERGLIONE, C.O., GILDEA, S., RIMONDI, A., MIÑO, S., VISSANI, A., CAROSSINO, M., CULLINANE, A., BARRANDEGUY, M. (2016.): Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 37-46. doi: 10.1111/irv.12349.

PETRINI, S., RIGHI, C., ISCARO, C., VIOLA, G., GOBBI, P., SCOCCIA, E., ROSSI, E., PELLEGRINI, C., DE MIA, G.M. (2020.): Evaluation of Passive Immunity Induced by Immunisation Using Two Inactivated gE-deleted Marker Vaccines against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) in Calves. *Vaccines* 8:14. doi: 10.3390/vaccines8010014.

PETRINI, S., MARTUCCIELLO, A., RIGHI, C., CAPPELLI, G., TORRESI, C., GRASSI, C., SCOCCIA, E., CONSTANTINO, G., CASICARI, C., SABATO, R., GIAMMARIOLI, M., DE CARLO, E., FELIZIANI, F. (2022.): Assessment of Different Infectious Bovine Rhinotracheitis Marker Vaccines in Calves. *Vaccines* 10:1204. doi: 10.3390/vaccines10081204.

- PHELPS, A., GATES, A.J., EASTAUGH, L., HILLIER, M., ULAETO, DO (2017.): Comparative Efficacy of Intramuscular and Scarification Routes of Administration of Live Smallpox Vaccine in a Murine Challenge Model. *Vaccine* 35, 3889-3896. doi:10.1016/j.vaccine.2017.05.058.
- POLLARD, A.J., BIJKER, E.M. (2020.): A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 83-100. doi: 10.1038/s41577-020-00479-7.
- POPOFF, M.R. (2020.): Tetanus in animals. *J. Vet. Diagn. Invest.* 32, 184-191. doi: 10.1177/1040638720906814.
- POULET, H., BRUNET, S., LEROY, V., CHAPPIUS, G. (2005.): Immunisation with a combination of two complementary feline calicivirus strains induces a broad cross-protection against heterologous challenges. *Vet. Microbiol.* 106, 17-31. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.12.010.
- POWELL, D.G., WATKINS, K.L., LI, P.H., SHORTRIDGE, K.F. (1995.): Outbreak of equine influenza among horses in Hong Kong during 1992. *Vet. Rec.* 136, 531-536. doi: 10.1136/vr.136.21.531.
- RADFORD, A.D., COYNE, K.P., DAWSON, S., PORTER, C.J., GASKELL, R.M. (2007.): Feline calicivirus. *Vet. Res.* 38, 319-35. doi: 10.1051/vetres:2006056.
- REED, S. G., BERTHOLET, S., COLER, R. N., FRIEDE, M. (2009.): New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 30, 23-32. doi:10.1016/j.it.2008.09.006.
- REDDING, L., WERNER, D.B. (2009.): DNA vaccines in veterinary use. *Expert. Rev. Vaccines* 8, 1251-1276. doi: 10.1586/erv.09.77.
- RENUKARADHYA, G. J., MENG, X., J., CALVERT, J. G., ROOF, M., LAGER, K.M. (2015.): Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. *Vaccine* 33, 3065-3072. doi:10.1016/j.vaccine.2015.04.102.
- ROEDER, P., MARINER, J., KOCK, R. (2013.): Rinderpest: the veterinary perspective on eradication. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368: 20120139. doi: 10.1098/rstb.2012.0139.

- ROLAND, K.L., BRENNEMAN, K. (2013.): Salmonella as a vaccine delivery vehicle. *Expert Rev. Vaccines*. 12, 1033-1045. doi: 10.1586/14760584.2013.825454.
- ROTH, J.A. (2011.): Veterinary Vaccines and Their Importance to Animal Health and Public Health. *Procedia. in Vaccinology* 5, 127-136. doi: 10.1016/j.provac.2011.10.009.
- RUSHTON, J., LYONS, N. (2015.): Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Vet. Ital.* 51, 401-406. doi: 10.12834/VetIt.646.3183.1.
- RUSLI, N.D., MAT, K.B., HARUN, H.C. (2014.): A Review: Interactions of Equine Herpesvirus-1 with Immune System and Equine Lymphocyte. *Open Journal of Veterinary Medicine* 4, 294-307. doi: 10.4236/ojvm.2014.412036.
- SACK, A., CULLINANE, A., DARAMRAGCHA, U., CHULUUNBAATAR, M., GONCHIGOO, B., GRAY, G.C. (2019.): Equine influenza virus-a neglected, reemerging disease threat. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1185-1191. doi: 10.3201/eid2506.161846.
- SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L., PERDIGUERO, B., MEJIAS-PEREZ, E., GARCIA-ARRIAZA, J., DI PILATO, M., ESTEBAN, M. (2015.): The Evolution of Poxvirus Vaccines. *Viruses*. 7, 1726-1803. doi: 10.3390/v7041726.
- SANT'ANNA DA COSTA, R., DI AZEVEDO, M.I.N., DOS SANTOS BAPTISTA BORGES, A. L., AYMEE, L., MARTINS, G., LILENBAUM, W. (2022.): Effect of Vaccination against *Leptospira* on Shelter Asymptomatic Dogs Following a Long-Term Study. *Animals* 12, 1788. doi: 10.3390/ani12141788.
- SAVIĆ, V. (2011.): Influenca ptica i drugih životinja. *Medicus* 20, 19-23.
- SHEPPARD, M. (1999.): Viral Vectors for Veterinary Vaccines. *Adv. Vet. Med.* 41, 145-161. doi: 10.1016/S0065-3519(99)80014-7.
- SINGER, R.S., FINCH, R., WEGENER, H.C., BYWATER, R., WALTERS, J., LIPSITCH, M. (2003.): Antibiotic resistance - the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infect. Dis.* 3, 47-51. doi: 10.1016/s1473-3099(03)00490-0.
- SKWARCZYNSKI, M., TOTH, I. (2017.): Introduction. U: *Micro and Nanotechnology in Vaccine Development*. Ur: Skwarczynski, M., Toth, I. XVII-XVIII.

SPARKES, A.H. (2003.): Feline leukaemia virus and vaccination. *J. Feline Med. Surg.* 5, 97-100. doi: 10.1016/S1098-612X(02)00132-8.

STERNBACH, G. (2003.): The history of anthrax. *J. Emerg. Med.* 24, 463-467. doi: 10.1016/S0736-4679(03)00079-9.

SŮLIOVÁ, J., BENÍSEK, Z., SVRCEK, S., DUROVE, A., ONDREJKA, R. (1997.): The effectiveness of inactivated, purified and concentrated experimental rabies vaccine for veterinary use: immunogenic activity. *Vet. Med. (Praha)* 42, 51-56. PMID: 9127580.

TANG, X., LIU, X., SUO, X. (2020.): Towards Innovative Design and Application of Recombinant *Eimeria* as a Vaccine Vector. *Infect. Immun.* 88: e00861-19. doi: 10.1128/IAI.00861-19.

TIMONEY, P.J., MCCOLLUM, W.H. (1993.): Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 9, 295-309. doi: 10.1016/s0749-0739(17)30397-8.

TIZARD, I.R. (2021.a): Sheep and Goat Vaccines. In: *Vaccines for Veterinarians*. Elsevier, pp 215-224. doi: 10.1016/B978-0-323-68299-2.00026-5.

TIZARD, I.R. (2021.b): Porcine vaccines. In: *Vaccines for Veterinarians*. Elsevier, pp 225-242. doi: 10.1016/b978-0-323-68299-2.00027-7.

TIZARD, I.R. (2021.c): Adjuvants and adjuvanticity. In: *Vaccines for Veterinarians*. Elsevier, pp 75-86.e1. doi: 10.1016/B978-0-323-68299-2.00016-2.

TOWNSEND, H. G., PENNER, S. J., WATTS, T. C., COOK, A., BOGDAN, J., HAINES, D., GRIFFIN, S., CHAMBERS, T., HOLLAND, R. E., WHITAKER-DOWLING, P., YOUNGNER, J. S., SEBRING, R. W. (2001.): Efficacy of a cold-adapted, intranasal, equine influenza vaccine: challenge trials. *Equine Vet. J.* 33, 637-643. doi: 10.2746/042516401776249354.

TRAVIESO, T., LI, J., MAHESH, S., MELLO, J. D. F. R. E., BLASI, M. (2022.): The use of viral vectors in vaccine development. *NPJ Vaccines* 7: 75. doi: 10.1038/s41541-022-00503-y.

UTTENTHAL, A., PARIDA, S., RASMUSSEN, T.B., PATON, D.J., HAAS, B., DUNDON, W.G. (2010.): Strategies for differentiating infection in vaccinated animals (DIVA) for foot-and-mouth disease, classical swine fever and avian influenza. *Expert Rev. Vaccines* 9, 73-87. doi:10.1586/erv.09.130.



- VALARCHER, J.F., TAYLOR, G. (2007.): Bovine respiratory syncytial virus infection. *Vet. Res.* 38, 153-180. doi: 10.1051/vetres:2006053.
- VANGEEL, I., IOANNOU, F., RIEGLER, L., SALT, J.S., HARMEYER, S.S. (2009.): Efficacy of an intranasal modified live bovine respiratory syncytial virus and temperature - sensitive parainfluenza type 3 virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with PI3V. *Vet. J.* 179, 101-108. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.08.008.
- VAN GELDER, P., MAKOSCHEY, B. (2012.): Production of viral vaccines for veterinary use. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 125, 103-109. doi: 10.2376/0005-9366-125-103.
- VAN KAMPEN, K. R. (2001.): Recombinant vaccine technology in veterinary medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* 31, 353-358. doi: 10.1016/s0195-5616(01)50607-5.
- VAN OIRSCHOT, J.T., KAASHOEK, M.J., RIJSEWIJK, F.A., STEGEMAN, J.A. (1996.): The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses. *J. Biotechnol.* 44, 75-81. doi: 10.1016/0168-1656(95)00129-8.
- WHALEN, J.W., HALL, V.L., SRINIVASAPPA, J., ROSS, C., EICHMEYER, M., CHU, S.(1998.): An inactivated vaccine prevents persistent equine arteritis virus infection in stallions, in: Wernery U., Wade J.F., Mumford J.A., Kaaden O.R. (Eds.), *Equine Infectious diseases VIII*, R&W Publications Ltd, Newmarket, 1998, p. 595.
- WARIMWE, G. M., FRANCIS, M.J., BOWDEN, T.A., THUMBI, S.M., CHARLESTON, B. (2021.): Using cross-species vaccination approaches to counter emerging infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 21, 815–822. doi: 10.1038/s41577-021-00567-2.
- WEBSTER, R.G., LAVER, W.G., AIR, G.M., SCHILD, G.C. (1982.): Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature.* 296, 115-121. doi: 10.1038/296115a0.
- WEYER, J., NEL, L. H. (2014.): *Pox Viral Vectored Vaccines for Rabies. U: Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention*, Ur: Rupprecht, C., Nagarajan, T. Academic Press, 245-254.
- WINKLER, M.T., DOSTER, A., JONES, C. (2000.): Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in tonsils of latently infected calves. *J. Virol.* 74, 5337-5346. doi: 10.1128/jvi.74.11.5337-5346.2000.

WOODLAND, R. (2011.): European regulatory requirements for veterinary vaccine safety and potency testing and recent progress towards reducing animal use. *Proc. Vaccinol.* 5, 151–155. doi: 10.1016/j.provac.2011.10.013.

XENOPOULOS, A., PATTNAIK, P. (2014.): Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? *Expert. Rev. Vaccines* 13, 1537-1551. doi: 10.1586/14760584.2014.968556.

XIAO, C.T., HALBUR, P.G., OPRIESSNIG, T. (2015.): Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J. Gen. Virol.* 96, 1830-1841. doi: 10.1099/vir.0.000100.

YADAV, D.K., YADAV, N., KHURANA, S.M.P. (2014.): *Vaccines: Present Status and Applications*. U: *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. Ur: Verma, A.S., Singh, A. Academic Press, 491-508.

YAMANAKA, T., NIWA, H., TSUJIMURA, K., KONDO, T., MATSUMURA, T. (2008.): Epidemic of equine influenza among vaccinated racehorses in Japan in 2007. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 623-625. doi: 10.1292/jvms.70.623.

ZHAO, C., GAO, J., WANG, Y., JI, L., QIN, H., HU, W., YANG, Y. (2022.): A Novel Rabies Vaccine Based on a Recombinant Bovine Herpes Virus Type 1 Expressing Rabies Virus Glycoprotein. *Front. Microbiol.* 13:931043. doi: 10.3389/fmicb.2022.931043.

ZINKERNAGEL, R. M., LA MARRE, A., CIUREA, A., HUNZIKER, L., OCHSENBEIN, A. F., MCCOY, K.D., FEHR, T., BACHMANN, M. F., KALINKE, U., HENGARTNER, H. (2001.): Neutralizing antiviral antibody responses. *Adv. Immunol.* 79, 1-53. doi: 10.1016/s0065-2776(01)79001-3.

ZUCKERMANN, F.A., GARCIA, E.A., LUQUE, I.D., CRISTOPHER-HENNINGS, J., DOSTER, A., BRITO, M., OSORIO, F. (2007.): Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN- producing cells and viological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123, 69-85. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.009.

## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Zagrebu 27. listopada 1992. godine. Osnovnu i srednju školu sam završila u Ivanić-Gradu. Maturirala sam 2011. godine u općoj gimnaziji u Srednjoj školi Ivan Švear. Iste godine upisala sam integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.