

УДК 615.373:578.262.7:578.864.1

<https://doi.org/10.47612/0134-9740-2020-28-97-106>

**Н. С. Сердюкова, Е. В. Радкович, И. А. Родькина,
Г. Н. Гуша, Ю. А. Халимоненко**

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»,
аг. Самохваловичи, Минский район
E-mail: natallikoners@tut.by; l-radkovich@tut

ПРИМЕНЕНИЕ АДЬЮВАНТОВ ФРЕЙНДА И ISA-70 В СХЕМЕ ИММУНИЗАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНОЙ АНТИСЫВОРОТКИ К ХВК

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты исследований по выявлению эффективной схемы иммунизации лабораторных животных для получения высокоактивной антисыворотки к ХВК.

Ключевые слова: картофель, вирус, антиген, схема, иммунизация, кролики, адъювант, доза, антисыворотка, иммуноферментный анализ, титр, PVX.

ВВЕДЕНИЕ

В странах Европейского союза создана и функционирует единая система оценки качества семенного картофеля, включающая в себя диагностику различных болезней, в том числе скрытой вирусной и бактериальной инфекции. Соответствующими национальными карантинными службами отслеживаются все перемещения семенного материала, поступающего извне.

Отсутствие систематической диагностики семенного картофеля приводит к высокому уровню зараженности фитопатогенами. Совершенствование средств обнаружения и идентификации возбудителей болезней картофеля является ключевым звеном в комплексе мероприятий, направленных на получение здорового семенного материала [1]. В связи с этим первостепенное значение приобретают вопросы качества производимого материала и строгое соответствие реализуемых семенных партий требованиям Государственного стандарта Республики Беларусь [2].

Как известно, вирусные болезни передаются вместе с насекомыми, в первую очередь тлями, и при механическом контакте с инфицированными растениями. Однако самым главным источником вирусов был и остается зараженный семенной материал [3]. Производство и сертификация семенного картофеля требуют полного отсутствия вирусов в исходном материале и, по возможности, поддержания безвирусного статуса растений при их размножении. Соблюдение этих правил и их эффективность во многом зависят от ранней диагностики вирусных болезней картофеля, позволяющей своевременно провести мероприятия по отбору здорового материала.

Проявление симптомов вироза картофеля может быть изменчивым в зависимости от штаммового состава вируса, влияния генотипа растения-хозяина (сорта) и условий возделывания [5]. Х-вирус картофеля, относящийся к мозаичным вирусам, может наносить различный вред растениям картофеля, который проявляется, например, очень мягким хлорозом и деформацией листьев на одном сорте или сильной крапчатостью

листьев, складчатостью, закручиванием и угнетением роста на другом сорте. Также развитие вирусной инфекции может протекать бессимптомно. В этом случае идентифицировать вирус можно только лабораторными методами [6].

В связи с этим имеется объективная необходимость введения лабораторных методов, позволяющих выявлять вирусные патогены в семенном материале, особенно в скрытой форме [7]. Одним из основных и массовых методов диагностики вирусных заболеваний картофеля, в том числе и X-вируса, является метод иммуноферментного анализа (ИФА). Метод ИФА получил широкое распространение в диагностической практике благодаря редкому сочетанию простоты и удобства, высокой чувствительности и специфичности, которая в настоящее время составляет более 90 % [8].

Применение диагностики методом ИФА с использованием реагентов собственного производства предусматривает использование изолятов, циркулирующих в определенной местности, что позволяет значительно повысить качество и чувствительность производимых реагентов для достоверного выявления наличия вирусной инфекции [9]. Однако, кроме штаммового состава при создании тест-систем, необходимо учитывать и условия получения высокоактивной антисыворотки, а именно схему иммунизации лабораторных животных [10].

Главное требование для получения антисывороток с достаточно высоким титром специфических антител за короткий промежуток времени при минимальном расходе необходимых материалов – это подбор эффективной схемы иммунизации. Схема иммунизации, предлагаемая для производства высокоактивной антисыворотки, должна соответствовать определенным требованиям. При ее разработке необходимо учитывать дозу антигена, количество инъекций и адъювант.

В настоящий момент имеется большой выбор коммерческих готовых адъювантных продуктов, предназначенных для разных видов животных, направленных на инициацию различных типов иммунного ответа, сочетающих в себе различные уровни показателей эффективности и безопасности [11]. Одним из наиболее распространенных является адъювант Фрейнда. Однако при длительном и детальном изучении применения данного комплекса выяснилось, что он небезопасен, то есть может вызывать побочные эффекты, которые приводят к появлению местных воспалительных реакций, что ведет к снижению выработки антител в крови лабораторных животных [12].

Широкое распространение приобрели масляные адъюванты, состоящие непосредственно из масла (минеральное, неминеральное либо их сочетание) и эмульгатора. Одним из таких адъювантов является монтанид ISA-70. Он подходит для применения в иммунных препаратах для различных видов животных, адаптирован к различным типам антигенов и типам иммунного ответа. Этот адъювант способствует выработке длительного иммунитета, образует стабильную эмульсию, имеющую низкую вязкость. Он хорошо переносится животными и благодаря своей структуре может вызывать как кратковременный, так и длительный иммунитет одновременно. К тому же адъювант монтанид ISA-70 примерно в 20 раз дешевле адъюванта Фрейнда [13]. Кроме того, при использовании монтанида ISA-70 требуется намного меньше антигена и самого адъюванта для индукции адекватного иммунного ответа в организме хозяина. Повышение эффективности иммунизации при снижении количества используемого антигена делает иммунную технологию высокоперспективной.

На сегодняшний день не существует универсального единого способа иммунизации животных, который бы гарантировал получение продукта, идеально удовлетворяющего всем требованиям, но существуют определенные принципы, которые могут быть приняты за «основные правила». Высококачественные антисыворотки получают

в определенной степени методом проб и ошибок, поскольку каждый иммуноген обладает разной антигенной активностью и процесс образования антител у каждого животного имеет свои особенности. Необходимое свойство антисыворотки – это высокий титр. На высокий титр влияют адъюванты, которые оказывают стимулирующее действие на организм животного для активной выработки антител [12, 13].

Наши исследования были направлены на выявление эффективной схемы иммунизации лабораторных животных для получения высокоактивной антисыворотки к ХВК. Данный опыт позволит применять разработанные технологические приемы с целью получения реагентов собственного производства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследования по выявлению эффективной схемы иммунизации лабораторных животных для получения высокоактивной антисыворотки к ХВК проводили в лаборатории иммунодиагностики картофеля РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» в 2019–2020 гг.

В качестве опытного материала использовали антисыворотку, полученную по 8 схемам с применением двух изучаемых адъювантов: Фрейнда (полный, неполный) и монтанид ISA-70 в сочетании с разными дозами антигена – 50 и 100 мкг.

В процессе выполнения исследований нами были разработаны 8 схем иммунизации лабораторных животных. Данные схемы различались применяемыми адъювантами и дозами вводимого антигена (табл. 1). В первых 4-х схемах проводили по 3 инъекции антигена, смешанного с адъювантом, с интервалом в 7 суток. В схемах № 5, № 6, № 7 и № 8 проводили по четыре инъекции антигена, смешанного с адъювантом: вторая инъекция проводилась через 7 дней после первой, третья инъекция – на 21-е сутки после первой и четвертая инъекция – на 42-е сутки от начала иммунизации.

В качестве лабораторных животных использовали кроликов весом 2,5–3,5 кг в возрасте 6–7 месяцев калифорнийской породы (самцы). Иммунизировали животных путем подкожных инъекций вдоль позвоночного столба, приблизительно в 5–6 точек. Для выполнения иммунизации готовили эмульсию антигена, для чего в 1 мл изотонического раствора NaCl (0,9 %) суспендировали антиген в количестве 50 или 100 мкг с необходимым

Таблица 1 – Схемы иммунизации лабораторных животных антигеном ХВК

№ схемы	Количество инъекций	Применяемый адъювант	Доза антигена на 1 инъекцию, мкг	Количество заборов крови	Забор крови, сутки
1	3	ПАФ* НАФ**	100	4	На 21, 28, 35 и 42-е сутки от начала иммунизации
2	3	Монтанид ISA-70	100	4	
3	3	ПАФ НАФ	50	4	
4	3	Монтанид ISA-70	50	4	
5	4	ПАФ НАФ	100	3	На 49, 56 и 63-е сутки от начала иммунизации
6	4	Монтанид ISA-70	100	3	
7	4	ПАФ НАФ	50	3	
8	4	Монтанид ISA-70	50	3	

* ПАФ – полный адъювант Фрейнда.

** НАФ – неполный адъювант Фрейнда.

РАЗДЕЛ 3. ИММУНИТЕТ И ЗАЩИТА КАРТОФЕЛЯ

адьювантом согласно разработанным схемам. Для получения стабильной эмульсии смесь многократно набирали в шприц и с силой выпускали через тонкую иглу. Если капли эмульсии при попадании в воду не распадались в течение получаса и более, это свидетельствовало о высоком качестве приготовленной эмульсии антигена [14].

Следующим этапом наших исследований являлся забор крови у лабораторных животных и получение антисыворотки к ХВК. Забор крови производили в разных объемах в зависимости от физического состояния животного путем надреза краевой ушной вены. Кровь собирали в специальные стеклянные конусообразные пробирки объемом 10 мл, предварительно смоченные теплым физиологическим раствором, для лучшего отделения кровяного сгустка. Собранную кровь помещали в термостат при 37 °С на 2–4 часа для формирования фибринового сгустка, затем проводили центрифугирование при 1 500 об/мин в течение 15–20 минут для отделения сыворотки крови от кровяного сгустка, содержащей иммуноглобулиновую фракцию [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При выполнении исследований произведен забор крови по схемам № 1 и № 3, в результате было получено 200,0 и 117,0 мл цельной крови, из которой выделено 102,03 и 42,26 мл антисыворотки к ХВК соответственно (табл. 2). Общий объем полученной цельной крови по схемам № 5 и № 7 составил 452,0 мл (182,0 и 270,0 мл соответственно), из которой была получена антисыворотка в следующих объемах: 69,11 и 113,01 мл.

При заборе крови у животных, проиммунизированных по схемам № 2 и № 4, было получено 200,0 и 112,0 мл цельной крови, после отделения фибринового сгустка количество антисыворотки к ХВК составило 89,86 и 32,10 мл соответственно (табл. 3). Объем полученной цельной крови по схемам № 6 и № 8 составил 159,0 и 270,0 мл, из которой было получено 59,01 мл антисыворотки по схеме № 6 и 111,59 мл по схеме № 8.

Показателем качества получаемой антисыворотки является ее высокая активность. Для проверки активности полученной антисыворотки необходимо определить ее титр,

Таблица 2 – Объем цельной крови и выделенной антисыворотки к ХВК, полученных в результате применения схем иммунизации № 1, № 3, № 5, № 7

№ схемы	Забор крови, сутки	Цельная кровь, мл	Антисыворотка, мл
1	21-е	50,00	23,00
	28-е	50,00	25,25
	35-е	50,00	26,20
	42-е	50,00	27,58
Всего		200,00	102,03
3	21-е	40,00	12,57
	28-е	40,00	16,70
	35-е	18,00	4,72
	42-е	19,00	8,27
Всего		117,00	42,26
5	49-е	67,00	24,46
	56-е	59,00	22,30
	63-е	56,00	22,35
Всего		182,00	69,11
7	49-е	90,00	35,20
	56-е	90,00	39,88
	63-е	90,00	37,93
Всего		270,00	113,01
Общий объем, мл		769,00	326,41

РАЗДЕЛ 3. ИММУНИТЕТ И ЗАЩИТА КАРТОФЕЛЯ

Таблица 3 – Объем цельной крови и выделенной антисыворотки к ХВК, полученных в результате применения схем иммунизации № 2, № 4, № 6, № 8

№ схемы	Забор крови, сутки	Цельная кровь, мл	Антисыворотка, мл
2	21-е	50,00	14,83
	28-е	50,00	24,69
	35-е	50,00	24,47
	42-е	50,00	25,87
Всего		200,00	89,86
4	21-е	40,00	7,79
	28-е	40,00	12,90
	35-е	15,00	5,15
	42-е	17,00	6,26
Всего		112,00	32,10
6	49-е	60,00	22,05
	56-е	50,00	18,20
	63-е	49,00	18,76
Всего		159,00	59,01
8	49-е	90,00	33,80
	56-е	90,00	35,85
	63-е	90,00	41,94
Всего		270,00	111,59
Общий объем, мл		741,00	292,56

следовательно, чем выше титр антисыворотки, тем выше ее активность. Титр полученной антисыворотки определяли по стандартной методике непрямого варианта ИФА, используя козий антикроличий конъюгат. Антисыворотку разводили в иммунологических планшетах пробно-конъюгатным буфером в геометрической прогрессии: 2, 4, 8, 16 тыс. раз и т. д. В качестве контроля использовали сыворотку, полученную из крови неиммунизированного животного.

Применение схемы № 1, в которой в качестве адъюванта использовали адъювант Фрейнда (полный и неполный) с дозой иммуногена 100 мкг, позволило получить антисыворотку с титром на 21-е сутки от начала иммунизации – 64 000, на 28-е сутки титр увеличился в два раза и составил 128 000 (рис. 1).

Схема № 3 отличалась от схемы № 1 дозой вводимого иммуногена, которая была меньше в два раза и составила 50 мкг на одну инъекцию. Результаты титрования антисыворотки были следующими: на 21-е сутки от начала иммунизации титр был такой же, как и при применении схемы № 1 – 64 000, однако начиная с 28-х суток титр резко увеличился и составил 512 000, что в 8 раз выше, чем при титровании антисыворотки, полученной по схеме № 1. На 35-е сутки титр не изменился, а на 42-е сутки отмечено увеличение титра в два раза – до 1 024 000.

Сравнение титра полученных антисывороток по схемам № 5 и № 7 с применением адъюванта Фрейнда показало, что при дозе вводимого антигена 100 мкг на инъекцию титр составлял 1 024 000 уже на 49-е сутки, при этом титр не снижался даже на 63-е сутки от начала иммунизации. Снижение дозы антигена в два раза до 50 мкг согласно схеме № 7 позволило получить антисыворотку с титром 2 048 000 на 49, 56 и 63-е сутки.

Схемы № 5 и № 7 отличались от схем № 1 и № 3 количеством инъекций, которые увеличились с 3-х до 4-х за цикл иммунизации. Следующим отличием схем № 5 и № 7 являлось уменьшение заборов крови с четырех до трех раз, которые проводились на 49, 56 и 63-е сутки от начала иммунизации.

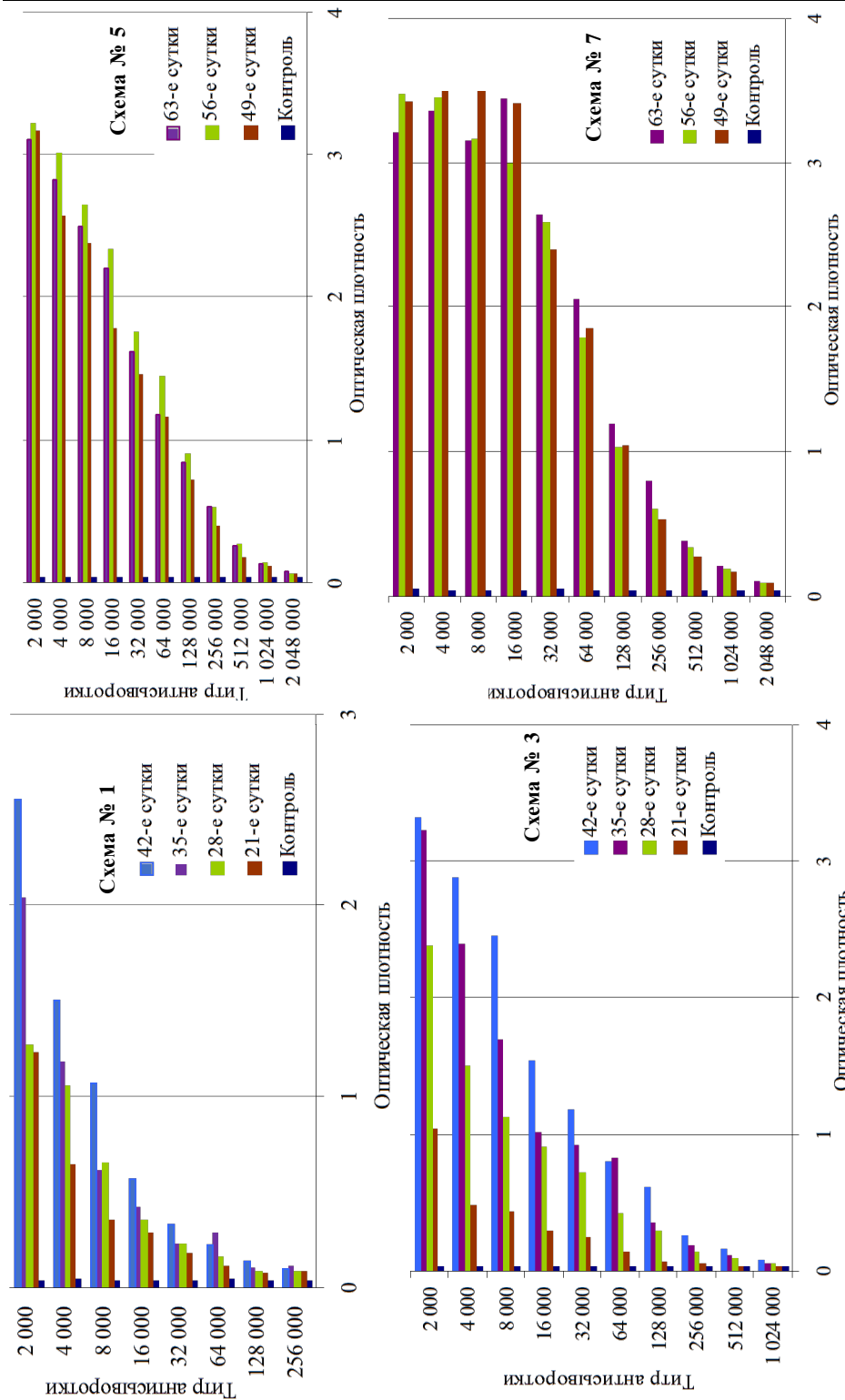


Рисунок 1 – Результаты определения титра антисывороток, полученных по схемам № 1, № 3, № 5 и № 7

Сравнительный анализ 4-х разных схем иммунизации показал, что при применении схемы № 7, в которой использовался адъювант Фрейнда (полный и неполный), доза иммуногена составляла 50 мкг, что позволяет получить высокоактивную антисыворотку к ХБК на 49-е сутки, на что указывает титр полученной антисыворотки – 2 048 000. Такой же высокий титр отмечен для антисыворотки, полученной при заборе крови лабораторных животных на 56-е и 63-е сутки, при этом значения оптической плотности были следующими: 0,098, 0,100 и 0,105 оптических единиц, значение отрицательного контроля составило 0,040 оптических единиц.

В схемах № 2, № 4, № 6 и № 8, где в качестве адъюванта использовали монтанид ISA-70, количество антигена было таким же, как и в первых четырех схемах. Титр антисыворотки, полученной по схеме № 2 (доза иммуногена – 100 мкг), на 21-е и 28-е сутки составил 1 024 000, однако было отмечено резкое снижение активности антисыворотки до 256 000 на 35-е и 42-е сутки (рис. 2).

В отличие от схемы № 2, количество вводимого антигена согласно схеме № 4 было уменьшено до 50 мкг на одну инъекцию. Титр антисыворотки при заборе крови на 21-е и 28-е сутки составлял 256 000, что в четыре раза ниже, чем титр антисыворотки, полученной по схеме № 2. Следующий забор крови проводили на 35-е сутки, и титр полученной антисыворотки увеличился до 1 024 000. Отмечено резкое снижение титра до 256 000 при заборе крови на 42-е сутки.

Схемы № 6 и № 8 отличались от схем № 2 и № 4 количеством инъекций, которые увеличились с 3-х до 4-х за цикл иммунизации. Следующим отличием схем № 6 и № 8 являлось уменьшение заборов крови с четырех до трех раз, который проводился на 49, 56 и 63-е сутки от начала иммунизации.

Титр антисыворотки, полученной с использованием схемы № 6 (доза иммуногена 100 мкг), на 49-е сутки от начала иммунизации составил 1 024 000. Увеличение титра до 2 048 000 было отмечено на 56-е и 63-е сутки забора крови от начала иммунизации.

При снижении дозы иммуногена до 50 мкг на одну инъекцию (схема № 8) титр антисыворотки при заборе крови уже на 49-е сутки составлял 2 048 000, что в два раза выше, чем в схеме № 6. Следует отметить, что в данной схеме на 56-е и 63-е сутки титр антисыворотки к ХБК составляет 4 096 000.

При сравнении результатов титрования полученной антисыворотки с применением схем, в которых в качестве адъюванта был использован монтанид ISA-70, следует отметить, что для получения высокоактивной антисыворотки к ХБК можно использовать все четыре схемы. Но с учетом расхода антигена в сторону его уменьшения предпочтение следует отдавать схемам, где количество иммуногена составляет 50 мкг на одну инъекцию, то есть схемам № 6 и № 8. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что самой эффективной схемой иммунизации лабораторных животных для получения высокоактивной антисыворотки является схема № 8.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что использование в качестве адъюванта монтанида ISA-70 способствует выработке антител в высокой концентрации в крови лабораторного животного. Однако при разработке схемы иммунизации необходимо учитывать и дозу вводимого иммуногена. Иммунизация должна сводиться к использованию минимального количества дорогостоящего антигена с наиболее иммуностимулирующим адъювантом как по экономическим, так и по практическим причинам. Возможность ускоренного процесса получения высокоактивных антисывороток способствует уменьшению затрат времени и средств и тем самым делает

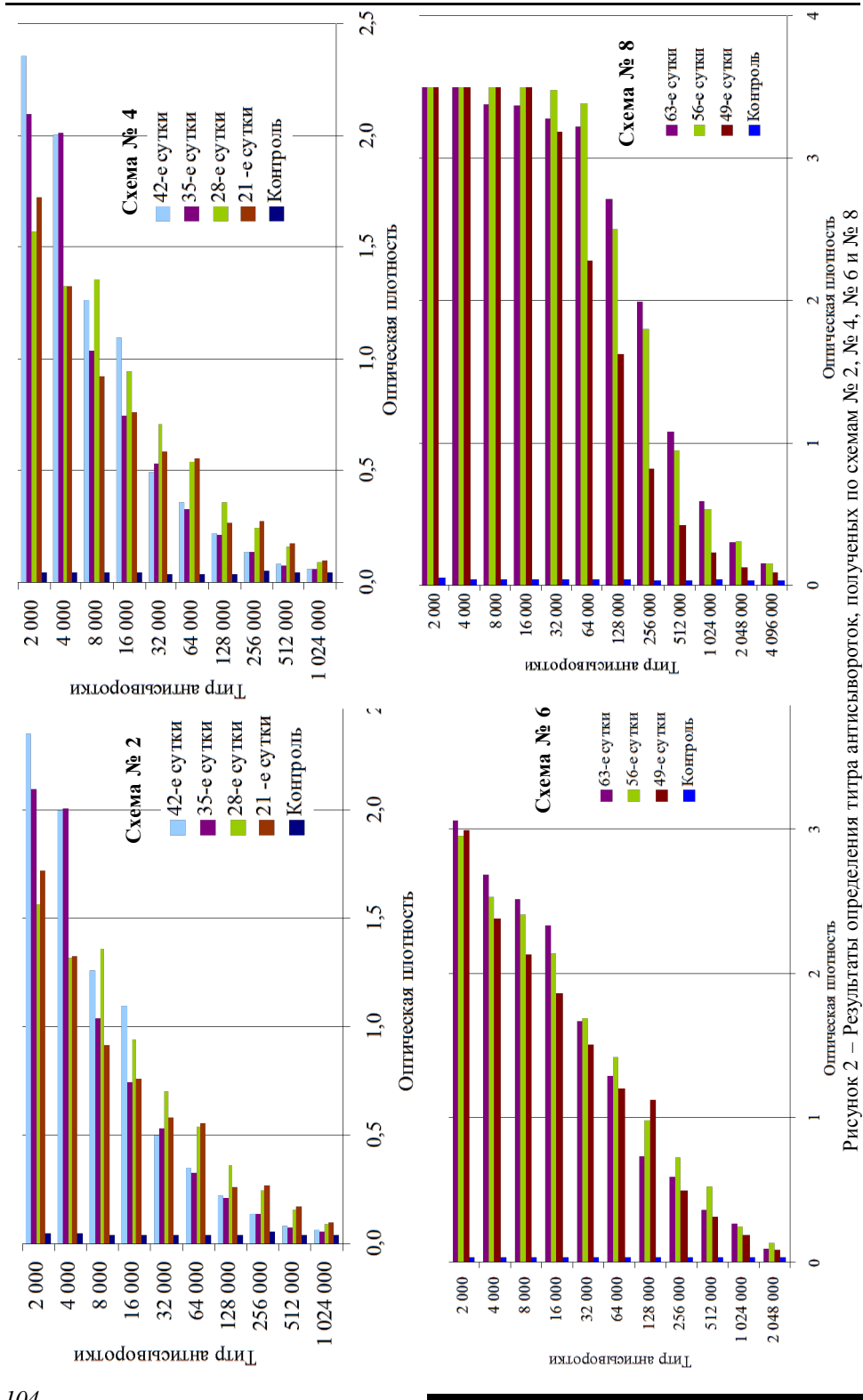


Рисунок 2 – Результаты определения титра антител по схемам № 2, № 4, № 6 и № 8

иммунную технологию высокоперспективной. Следует отдавать предпочтение тем схемам, в которых при минимальном количестве используемого антигена можно получить высокоактивную антисыворотку к ХВК. В наших исследованиях этим требованиям отвечают схемы № 6 и № 8. Титр антисывороток, полученных по этим схемам, составлял 2 048 000 и 4 096 000 соответственно.

Сравнительный анализ схем иммунизации, в которых в качестве адъюванта применялся адъювант Фрейнда (полный, неполный), показал, что использование схемы № 7, в которой доза иммуногена составляла 50 мкг, позволяет получить высокоактивную антисыворотку к ХВК с титром 2 048 000.

Учитывая вышеизложенное, из всех разработанных нами схем целесообразно использовать для иммунизации лабораторных животных схему № 8 с применением в качестве адъюванта монтанид ISA-70 с дозой иммуногена 50 мкг.

Список литературы

1. Гнутова, Р. В. Вирусные и виroidные болезни картофеля на Дальнем Востоке и методы их диагностики в семеноводстве / Р. В. Гнутова, К. А. Можаяева // Защита растений: Изв. ТСХА. – 2010. – Вып. 2. – С. 35–43.
2. Картофель семенной. Технические условия: СТБ 1224-2000. – Введ. 01.09.2000 – Минск: Беларус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2014. – 20 с.
3. Сорока, С. В. Вирусы и вирусные болезни сельскохозяйственных культур / С. В. Сорока, Ж. В. Блоцкая, В. В. Вабищевич; науч. ред. Р. В. Гнутова. – Несвиж: Несвиж. укруп. тип., 2009. – 28 с.
4. Положение о семеноводстве картофеля в Республике Беларусь / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; сост.: С. А. Турко, И. И. Колядко, В. И. Дударевич. – Самохваловичи, 2012. – 22 с.
5. Иванюк, В. Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В. Г. Иванюк, С. А. Банадысев, Г. К. Журомский. – Минск: Бел. НИИ картофелеводства, 2003. – 550 с.
6. Гнутова, Р. В. Таксономия вирусов растений Дальнего Востока России / Р. В. Гнутова. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – 467 с.
7. Радкович, Е. В. Анализ структуры вирусной инфекции при комплексном тестировании полевых сортообразцов картофеля методом ИФА в послепоборочный период / Е. В. Радкович, Г. Н. Гуца, Ю. В. Глушакова // Картофелеводство: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 25. – С. 224–233.
8. Теория и практика иммуноферментного анализа / А. М. Егоров [и др.]. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.
9. Радкович, Е. В. Отбор белорусских изолятов Х- и Y-вируса картофеля / Е. В. Радкович, Г. Н. Гуца // Картофелеводство: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2015. – Т. 23. – С. 101–108.
10. Халимоненко, Ю. А. Подбор оптимальной схемы иммунизации лабораторных животных вирусными антигенами для получения высокоактивных специфических антисывороток к PVX и PVY / Ю. А. Халимоненко, Ю. В. Глушакова, Е. В. Радкович // Картофелеводство: сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству; редкол.: С. А. Турко (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2018. – Т. 26. – С. 183–189.
11. Радкович, Е. В. Изучение различных схем иммунизации лабораторных животных для получения специфических антисывороток к вирусам картофеля / Е. В. Радкович,

Г. Н. Гуца, И. В. Филонова // Картофелеводство : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству ; редкол.: В. Г. Иванюк (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2008. – Т. 14. – С. 409–416.

12. Георгиу, Х. Динамика накопления антител у кроликов, иммунизированных антигеном В. EQUI / Х. Георгиу // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных : материалы Междунар. науч.-практ. конф., Москва, 16–17 мая 2006 г. / Всерос. науч.-исслед. ин-т РАСХН ; Х. Георгиу, Е. Г. Гуляева. – М., 2006. – С. 457–459.

13. Получение гипериммунной специфической антисыворотки к вирусу гриппа птиц H7N1 / А. А. Гуляко [и др.] // Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария : междунар. науч.-практ. журн. – 2011. – № 1. – С. 9–12.

14. Получение и свойства реагентов для иммуноферментного анализа хлорамфеникола в сырье и продукции животного происхождения / И. И. Вашкевич [и др.] // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – № 4. – С. 57–65.

15. Методические указания по отбору биологического материала для лабораторных исследований / С. В. Петровский [и др.]. – Витебск : УО ВГАБМ, 2017. – 48 с.

Поступила в редакцию 21.12.2020 г.

N. S. SERDYUKOVA, E. V. RADKOVICH, I. A. RODKINA,
G. N. GUSCHA, YU. A. HALIMONENKO

USE OF FREUND ADJUVANT AND ISA-70 IN IMMUNIZATION SCHEDULE TO GET HIGHLY ACTIVE ANTISERUM TO PVX

SUMMARY

The research results of effective immunization schedule identification for laboratory animals to obtain a highly active antiserum to PVX are presented in the article.

Key words: potatoes, virus, antigen, schedule, immunization, rabbits, adjuvant, dose, antiserum, enzyme immunoassay, titer, PVX.