

## **Az állatorvosi vakcinák adjuvánsainak hatásmechanizmusai**

### **Mechanisms of action of veterinary vaccines' adjuvants**

*Tóth Renáta<sup>1\*</sup>, Mészáros István<sup>1</sup>, Farsang Attila<sup>2</sup>, Zádori Zoltán<sup>1</sup>*

\*toth.renata@agrar.mta.hu

1: MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet. 1143 Budapest, Hungária krt. 21.

2: NÉBIH Állatgyógyászati Termékek Igazgatósága. 1107 Budapest, Szállás u. 8.

### **Összefoglalás**

**Az inaktivált és az alegység vakcinákban a hatékonyabb immunválasz kiváltását mind az állatorvosi, mind pedig a humán gyógyászatban különféle adjuvánsok hozzáadásával erősítik. A vakcina gyártók számára komoly kihívást jelent a hatékony, de mellékhatás nélküli adjuvánsok fejlesztése. A közelmúltban a kezdeti, próbálgatáson alapuló megközelítéseket felváltották a célzott fejlesztések, amelyek nem jöhettek volna létre az adjuvánsok hatásmechanizmusának mind részletesebb megismerése nélkül. Az alábbi irodalmi összefoglalóban a szerzők ismertetik az állatorvosi gyakorlatban leggyakrabban használt és a jelenleg legígéretesebbnek tűnő, fejlesztés alatt álló adjuvánsok általános és specifikus hatásmechanizmusait.**

### **Summary**

**Adjuvants are used to trigger more effective immune responses in veterinary as well as in human inactivated and subunit vaccines. Vaccine producers face serious challenges to develop safer and more efficacious vaccine adjuvants without side effects. In the past decades the initial trial and error based approaches were gradually substituted with targeted developments. Most of these advances were due to the accumulation of detailed knowledge about the mechanisms of action of the adjuvants. In**

**this review the authors describe the mechanisms of action of the most utilized adjuvants in the veterinary practice and the most promising ones under development.**

## **Bevezetés**

A vírusok, a baktériumok és a paraziták elleni vakcinázás fő célja az immunológiai memória kialakítása, amely még a betegség kialakulása előtt lehetővé teszi a kórokozók gyors elpusztítását. Állatállományokban gazdasági szempontból is nagy jelentősége van, mert segítségével megelőzhetőek, illetve jelentősen csökkenthetőek a fertőző betegségek terjedéséből származó gazdasági károk (116).

Bár az oltóanyagok az állategészségügyi termékek alig valamivel több, mint 20%-át teszik ki a globális piacon (104), a technológiai fejlődés, az új betegségek megjelenése és a különböző antibiotikumokkal szemben rezisztenssé váló kórokozók miatt az ágazat egyre gyorsuló fejlődést mutat. Mivel az antibiotikumok használatát az állattenyésztésben egyébként is szigorú szabályok korlátozzák, az oltóanyag fejlesztések fontosságát ezen előírások is növelik. A vakcinák használatával ugyanis elkerülhetővé válhat, hogy egyes, állatorvoslásban használt gyógyszerek maradványai bejussanak az emberi táplálkozási láncba (70, 104).

Az élő, attenuált vakcinák a leghatékonyabb védőoltások közé tartoznak. Ezek oltás után enyhe, általában tünetmentes fertőzést okoznak és élethosszig tartó immunitást eredményezhetnek. Előnyük még, hogy nemcsak humorális, hanem celluláris és lokális immunválaszt is indukálnak, így intracelluláris kórokozók ellen is rendkívül hatékonyak. Hátrányuk viszont, hogy használatuk során fennáll a más kórokozókkal való kontaminálódás, a perzisztálás, a rekombinálódás, valamint a revertálódás veszélye (14, 107). Ez történt például az 1990-es években is, amikor Dániában légzőszervi és reprodukciós szindróma vírus (PRRSV) I-es (európai) típusa elleni védekezésként egy II-es típusú (észak-amerikai) vírustól

származó élő vakcinával oltottak sertéseket. Mivel a két genotípus között a genetikai távolság meglehetősen nagy (mindössze 55-70% nukleotid azonosság), ezért a II-es típusú vakcina eleve nem adott teljes védelmet az I-es típusú vírus ellen. A helyzetet tovább rontotta, hogy a vakcina vírus revertálódott, majd végigsöpörve mind a vakcinázott, mind pedig a vakcinázatlan állatállományon, rendkívül komoly gazdasági károkat okozott (75, 79).

Az előlt, szaporodásra képtelen kórokozót tartalmazó inaktivált vakcinák általában sokkal biztonságosabbak, ám kevésbé hatékonyak, mint az előbb említett védőoltások. Az inaktiválás következtében azonban nem revertálódhatnak vagy rekombinálódhatnak és az idegen fertőzőképes kórokozókval való szennyezettség esélye is kisebb. Ezen biztonsági tényezők miatt az inaktivált vakcinák használatát preferálják az élő vakcinákkal szemben mind a humán, mind az állatorvosi gyakorlatban. Az élő, attenuált vakcinákhoz képest alacsonyabb hatékonyságuk annak köszönhető, hogy az inaktivált vakcinák többsége nem képes a citotoxikus T-sejtes celluláris immunválasz kiváltására. További hátrányuk, hogy elősegíthetik allergiás reakciók, illetve autoimmun folyamatok kialakulását (20, 71).

Az inaktivált és az aleggység vakcinák esetében is a hatékonyabb immunválasz kiváltását mind az állatorvosi, mind pedig a humán gyógyászatban különféle adjuvánsok hozzáadásával erősítik.

### **Adjuvánsok általános jellemzői**

Az adjuválás általános defíciója: „bármely anyag vagy eljárás, amely a vakcina komponenseinek immunogenitását specifikusan növeli” (16). Maga a szó a latin *adjuvare* szóból származik, amelynek jelentése: *segíteni*. Az adjuvánsok használatának több praktikus előnye is van. Mivel növelik az antigének immunogenitását, ezért a néha csak igen drágán előállítható specifikus antigének mennyisége, valamint az oltások száma is csökkenthető. Idős vagy legyengült immunrendszerű állatokban/emberekben és újszülöttekben nagyban

hozzájárulnak az immunválasz kialakításához, amely alkalmazásuk nélkül el is maradhat. Egyes adjuvánsok alkalmazása a vakcinázási módszerek egyszerűsítéséhez vezethet: pl. liposzómákat hordozóként használva, ezek stimulálhatják az antigén nyálkahártyán történő felvételét, ezáltal szükségtelenné téve az injekciót (22, 67, 68).

Hátrányuk viszont, hogy használatuk során számos szisztémás, illetve lokális mellékhatás léphet fel. A főbb lehetséges szisztémás mellékhatások: láz, ízületi gyulladás, allergia, hányinger, anafilaxia, eozinofília, szervspecifikus toxicitás, immunotoxicitás. Lokálisan fájdalom, gyulladás, hólyagképződés lehetséges, illetve a bejuttatás helyén nekrozis, steril tályogok megjelenése, fekély, limfadenopátia fordulhat elő (1).

A vakcina-fejlesztők számára a fő kihívást tehát a hatását hosszan kifejtő, lebomló, megfelelő immunválaszt kiváltó, olcsón előállítható, de mindenekelőtt minimális toxicitást vagy mellékhatást kiváltó adjuváns előállítását jelenti (27).

Az elmúlt évtizedekben a gyógyszeripar számos eltérő hatású adjuvánsot fejlesztett ki, amelyek nagyjából az alábbi nyolc csoportba sorolhatóak:

- 1, Szervetlen sók: pl. alumínium sók ( $AlK(SO_4)_2$ ,  $Al(OH)_3$ ,  $AlPO_4$ ); hidroxipatit
- 2, Olaj-víz emulziók: pl. paraffinolaj emulziók; szkvalén-alapú emulziók (MF59, AS03, AF03, Montanide)
- 3, Bakteriális eredetű szerves molekulák: pl. lipopoliszacharid, monofoszforsav lipíd A, peptidoglikán, trehalóz-dimikolát, trehalóz-6,6-dibehenát
- 4, Szaponinok: pl. Quil A, QS-21
- 5, Citokinek: pl. IL-2, IL-4, IL-12, IL-18
- 6, Liposzómák: CAF01 (kationos liposzóma (dimetildioktadecil-ammónium) immunmodulátor glikolipiddel (trehalóz-6,6-dibehenát) stabilizálva)
- 7, Más szerves molekulák: pl. kolera toxin, inulin származékok

8, Kombinált adjuvánsok: pl. AS04 (kombinálva lipopoliszacharid, monofoszfóril lipid A, alumínium só); ISCOMATRIX (koleszterol, foszfolipid, szaponin)

### **Korai fejlesztések**

A védőoltások hatékonyabbá tételére történő első próbálkozások egészen a XX. század elejére nyúlnak vissza. Le Mognac és Pinay 1916-ban figyelt fel arra, hogy az ásványi olajban szuszpendált *Salmonella typhimurium* tenyészet kiváló ellenanyagválaszt indukál (28). Az 1920-as években Ramon és munkatársai megfigyelték, hogy lovakban a diftéria toxoidok inokulációjakor az oltás helyén tályogok keletkeztek, amelyeket, mint kiderült, a fiolában található szennyező anyagok okoztak. A szennyezés ugyanakkor jelentősen növelte az ellenanyag-szintet a toxoiddal szemben is. Mindez a gyártók figyelmét a csomagolás technikai higiénéjére irányította és magyarázatul is szolgált arra a megoldatlan problémára, hogy a változatlan technológiával készülő vakcinák különböző sarzsai miatt mutatnak jelentős hatékonyságbeli eltéréseket (114). A szennyezések szerepének tisztázása az immunológiai válasz erősítésében (adjuválásban) olyan steril vagy sterilizálható anyagok keresésére sarkallta a kutatókat és gyártókat, amelyeknek mellékhatások nélküli pozitív hatása van a vakcinák immunválaszt kiváltó tulajdonságaira. 1926-ban Glenny és munkatársai alumíniummal adszorbeált diftéria toxoidot használtak: ez már nem okozott tályogot, de szignifikánsan emelte az ellenanyag-szintet a toxoid ellen (33, 90, 91, 119).

Az adjuvánsok fejlesztésének kezdeti időszakában csak sötétben tapogatóztak a kutatók és olyan anyagokat próbálgattak, amelyeket egyébként is használtak már a gyógyászatban más célra, mivel ezekről feltételezték, hogy nincsenek káros mellékhatásaik. Így fedezték fel a talán leggyakrabban használt adjuvánsokat, az alumínium sókat is, amelyeket a humán gyógyászatban savlekötőként alkalmaztak a XX. század elején. Víz-olaj emulziót is először intralipid infúzióként alkalmaztak zsírsavak és más nutriensek pótlására az 1960-as évek

elején (82). Azonban az elmúlt 15-20 évben a próbálgatáson alapuló megközelítést felváltották a célzott fejlesztések, amelyek nem jöhettek volna létre az adjuvánsok hatásmechanizmusának az elmúlt évtizedek kutatásain alapuló mind jobb és részletesebb megértése nélkül (2).

### **Adjuvánsok általános hatásmechanizmusa**

Sokáig azt gondolták, hogy adjuvánsok használatának előnye kimerül abban, hogy hatásukra az inokuláció helyén antigén depó jön létre, így az antigén felszívódása lassabban megy végbe, ez pedig növeli az antigénprezentáló sejtek antigén felvételét, valamint aktiválja a makrofágokat, az eozinofil granulocitákat és a komplementrendszer (120).

Az újabb kutatások eredményeként tudjuk, hogy ez az adjuvánsok hatásmechanizmusai közül csak az egyik, és valószínűleg nem is a legfontosabb. Morein (1996) szerint az adjuvánsok három területen fejtik ki hatásukat:

- az antigén fizikai megjelenítése;
- az antigén eljuttatása a limfoid szervekhez;
- az antigén immunogenitásának növelése elsősorban az antigén intracelluláris forgalmában, proteolitikus feldolgozásában, MHCI és II molekulákkal való kapcsolatában történő változások révén, illetve a citokin termelés és citokin mintázat megváltoztatása útján (74).

Mai tudásunk alapján úgy tűnik, az adjuvánsok úgy erősítik fel a specifikus immunválaszt, hogy aktiválják a veleszületett immunrendszer azon jelátvivő útvonalaikat, amelyek hozzájárulnak a hatékonyabb adaptív immunválaszhoz. A hatékony adjuvánsok az

aktivált útvonaltól függően képesek megváltoztatni a specifikus immunválasz mértékét és minőségét is.

Nagyon sok adjuváns a jellegzetes mikrobiális struktúrákat felismerő, ún. mintázatfelismerő, receptorokon (PRR: pattern recognition receptor) keresztül fejti ki immunstimuláló hatását. A TLR, NLR, RLR, CLR családokba tartozó receptorok mind – közvetlenül vagy közvetve – különféle adjuvánsok specifikus célpontjai lehetnek.

A Toll-like receptorok (TLRs) a fehérjéket, a lipoproteineket, a nukleinsavakat, a lipideket (**1. ábra**), a NOD-like receptorok (NLRs: nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing receptor) peptidoglikánokat, toxinokat, flagellineket, a RIG-I-like receptorok (RLRs) citoplazmatikus RNS-t, a C-típusú lektin receptorok (CLRs) pedig lipideket és szénhidrátokat ismernek fel (7, 43, 48, 113). A receptorokon keresztül különböző jelátviteli útvonalak, például az MyD88, a TRIF, a RIP2, CARD9 és IPS-1 aktiválódnak, amelyek hatására NF- $\kappa$ B, IRF-3 és IRF-7 (interferon regulatory factor) faktorok termelése indukálódik, ezek pedig számos citokin, és kemokin gén expresszióját serkentik (83).

A hagyományos adjuvánsok esetében (pl. alumínium sók (alum) és emulziók) a PRR-ek indukciója nem az adjuváns közvetlen kötődésén keresztül valósul meg, hanem az injektálás és az adjuvánsok sejtkárosító hatása következtében a károsodott sejtekből felszabaduló anyagok (damage-associated molecular patterns (DAMPs)) segítik az adjuváló hatások kiváltását. Jól ismert tény, hogy víz-olaj emulziók az injektálás helyén lokálisan károsítják a környező szöveteket. Az viszont kevésbé köztudott, hogy kristályos szerkezetű részecskék felvétele (pl. alum kalcium sók, kristályos húgysav) ugyancsak a sejtek sérülésével járhat. Az internalizált kristályok ugyanis károsíthatják az endoszómák és lizoszómák membránjait, amely aztán a sejtek nekrozisához vagy apoptózisához vezethet (**2. ábra**). A nekrotikus sejtekből többek között húgysav, illetve ATP szabadul fel, amelyek a NOD-like receptorokon (NLRP3 és NLRC4) keresztül beindítják a környező sejtekben az inflammaszómák

képződését. Az inflammaszómák aktiválják a kaszpáz-1 fehérjét, amely viszont a pro-IL-1 $\beta$ , illetve pro-IL-18 hasítására képes, amelyek így aktív interleukinokká alakulnak (41, 45, 66). Az IL-1 citokin a szervezetet ért káros tényezők (égés, trauma, fertőzések) hatására gyorsan kialakuló akut fázis reakció egyik fő komponense (21). Az IL-18, habár homológ szerkezetű az IL-1-gyel, funkciója eltérő: az IL-12 jelenlétében az intracelluláris kórokozók elleni védekezésben szerepet játszó Th1-közvetített immunválaszt, míg IL-12 hiányában a Th2-es immunreakciót stimulálja (81).

Újabb vizsgálatok szerint a sejt sérüléseknél extracellulárisan megjelenő intracelluláris DNS is DAMP-ként funkcionál és rendkívül fontos szerepet játszik a hagyományos adjuvánsok immunválaszt fokozó hatásában. A hatásmechanizmus egyelőre nem ismert, de az biztosnak látszik, hogy független az ez idáig azonosított immunstimuláns tulajdonságokkal rendelkező DNS szenzorok (TLR9, STING) indukciójától (12, 87).

## **Leggyakoribb adjuvánsok és tulajdonságaik**

### *Alumínium sók*

A legszélesebb körben használt hatásfokozó szerek az alumínium sókat tartalmazó adjuvánsok, amelyek több mint 80 éve használatosak. Még napjainkban is a forgalomban lévő adjuvánst tartalmazó állatorvosi vakcinák nagy többségében különböző alumínium sókat alkalmaznak (1. táblázat) az oltás által kiváltott immunreakció elősegítésére. Alumínium adjuvánst alkalmaznak például a madarak fertőző bronchitise, a kutya hepatitisz, a Newcastle betegség, a száj- és körömfájás vírusa, valamint sok *Clostridium*, *Leptospira* és *Pasteurella* faj elleni vakcinák esetében. A humán gyógyászatban is számos oltóanyag fontos komponense (pl. a tetanusz, a diftéria, a szamárköhögés és a poliomyelitis elleni vakcinák), de alumíniumot tartalmaz a hepatitisz A, illetve hepatitisz B elleni védőoltás is (62, 65).



Az oldhatatlan alumínium só precipitátumok erős elektrosztatikus kölcsönhatások által felületükön adszorbeálják az antigéneket. Azonban újabb kísérletek kimutatták, hogy ennél komplexebb folyamatok is szerepet játszanak az adjuválo hatásban. Egerekben alum oltását követően néhány órán belül gyulladási mediátorok, például IL-1 $\beta$ , CC-kemokin ligandumok, CCL11, hisztamin és IL-5 detektálhatók (57, 100). Utóbbiak az eozinofil granulociták osztódását és differenciálódását váltják ki (110). Egy napon belül az injektálás helyén az említett sejtek mellett neutrofil granulociták és professzionális antigénprezentáló sejtek – mieloid dendritikus sejtek (DC), plazmacitoid DC-k és monociták – halmozódnak fel. Utóbbiak az antigén felvételét követően a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol CD11c<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> dendritikus sejtekké differenciálódnak. Ezen kívül azt találták, hogy a peritoneális DC és B sejtek könnyebben felveszik az alumínium sókhoz adszorbeált antigént, mint az adjuváns nélküli szolubilist, valamint megnő a DC-k T sejt aktiválást kiváltó CD86 fehérje expressziója is (57, 100). Az alumínium adjuvánsok elsősorban Th2 típusú, IgE, illetve egerekben IgG immunválaszt indukálnak. A Th2 útvonal aktiválása sok esetben nem kívánatos, mivel az IgE indukció komoly szerepet játszik a különféle allergiás megbetegedések létrejöttében (10).

Normális körülmények között, ha az alumínium alacsony dózisban van jelen, kiválasztódik a vesében, viszont a veseműködés zavara esetén lerakódik a testben, ami toxikus is lehet (35). Ritka esetekben használatuk során hiperszenzitivitási és lokális reakciók (duzzanatok, bőrpír) is előfordulhatnak. További hátrányuk, hogy mivel az Al(OH)<sub>3</sub> nagy affinitással köti az endotoxinokat, csökkenthetik más, adszorbeált vakcinák reaktogenitását (9, 27, 36). Emellett, bár rákkeltő és magzatkárosító hatásuk egyelőre nem bizonyított, néhányan idegrendszeri károsodások kialakulásának elősegítéséért teszik őket felelőssé (amiotrófiás laterálszklerózis (ALS), Guillain-Barre betegség, szklerózis multiplex, öböl-háború szindróma). Shaw és munkatársai állatkísérleteket végeztek annak érdekében, hogy

felderítsék, az alumínium adjuvánsok valóban okozhatnak-e idegrendszeri problémákat.

Fiatal, hím egerekbe alumínium-hidroxidot, illetve egy olajszerű anyagot, szkvalént injektáltak adjuvánsként, majd hat hónapon keresztül követték a motoros működésekben, illetve a kognitív viselkedésben létrejövő változásokat. Azokban az egerekben, amelyek  $\text{Al(OH)}_3$ -ot kaptak, 50%-os izomerő és állóképesség-csökkenést tapasztaltak a sóoldatot kapott kontroll egerekhez képest, az  $\text{Al(OH)}_3$ -ot és szkvalént együttesen kapott egerek pedig szignifikáns hosszú távú memóriacsökkenést mutattak (86, 101).

Az alumínium sók mellett újabban kalcium sókat is használnak adjuvánsként. Mivel ezek az anyagok nagy mennyiségben fordulnak elő, elsősorban az élőlények vázrendszerében, ezért az emlősök szervezete általában jól tolerálja őket és könnyen fel is szívódnak (95). Az általánosan kalcium-foszfátnak nevezett adjuváns neve félrevezető, ugyanis fizikokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy nem  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  alkotja, hanem hidroxipatit ( $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ , ahol  $x=0-2$ ) gél. A  $10 \times 150$  nm-es tű alakú kristályok elektrosztatikus úton kötik az antigének pozitívan töltött funkciós csoportjait és felületükön juttatják be a sejtekbe (46).

Habár jelenleg nincs forgalomban kalcium sókat tartalmazó állatorvosi vakcina, humán oltóanyagokban jól vizsgáztak. Az alumínium sókkal szemben előnyük, hogy nem toxikusak és allergizáló hatásuk is kisebb, mivel sem állatokban sem emberben nem indukálnak IgE ellenanyag választ. Ezért alkalmasnak látszanak arra, hogy hosszú távon kiváltsák a több mellékhatással bíró alumínium sókat (37, 117).

### *Freund adjuváns*

Az egyik legismertebb adjuvánst, amelyet ma Freund komplett adjuváns (FCA) néven ismerünk, Freund állította elő 1936-ban, amikor víz, paraffinolaj és hővel előlt mycobaktérium szuszpenzió keverékét alkalmazta hatásfokozóként nyulakban és

tengerimalacban tuberkulózis ellen (29). Bár potenciális TLR2 és TLR4 (glikoproteinek, di- és triacilált lipoproteinek, lipoarabinomannán és más glikolipidek) és TLR9 (metilátlan CpG) ligandumokat tartalmaz, elsősorban mégsem a Toll-like receptorokon, hanem az IL-1 receptoron (IL-1R) keresztül aktiválja a MyD88 jelátviteli útvonalat, amely erős Th1 és Th17 válaszhoz vezet. Az interleukin 1B (IL-1 $\beta$ ) termelését az FCA komponensei közül legerősebben a mycobaktériumból származó peptidoglikán és glikolipid (trehalóz-dimikolát vagy más néven cord faktor) stimulálja. Utóbbi a mincle/CARD9 receptorhoz kötődve indukálja a citoplazmatikus pro-IL-1 $\beta$  szintézisét, míg a bakteriális peptidoglikán egy eddig nem azonosított, NOD-receptoroktól független útvonalon aktiválja az inaktív pro-IL-1 $\beta$  hasítását a szekretálódó aktív immunstimuláns IL-1 $\beta$  formává. Nagy valószínűséggel az injekciózás következtében létrejövő sejtkárosodás hatására a nekrotikus sejtekből meginduló szignalizációs útvonalak is segítik adjuválo hatását (102, 103, 112). Hátránya, hogy számos helyi káros reakciót vált ki és túl toxikus a mindennapi humán vagy állatgyógyászatban való használathoz. A bakteriális komponensek hatására indukálódott Th17 sejtek túlzott aktivitása magyarázhatja az FCA használatakor tapasztalt káros gyulladási reakciókat.

Kevésbé toxikus és kevésbé hatékony baktérium nélküli változata, a Freund inkomplett adjuváns (FIA) (111), amely a ma használatban lévő emulziós adjuvánsok prototípusának tekinthető.

### *Emulziós adjuvánsok*

Az emulziós adjuvánsokat két egymással nem keveredő anyag (általában víz és olaj) kombinálásával hozzák létre úgy, hogy a kisebbik alkotórészt diszpergálják a nagyobbik komponensben. A két anyag szétválását valamilyen felületaktív anyag (szörfaktáns) hozzáadásával gátolják meg.

A jelenleg forgalomban lévő emulziós adjuvánst tartalmazó vakcinák nagyobb részében ásványi olajból finomított, nagy tisztaságú könnyű olajból (paraffinolaj) készítik az olajos fázist (**1. táblázat**). A fázisok elkülönülését legtöbbször nem ionos detergenssek (pl. Oktilfenol-etoxilát (Triton X-100), nonilfenol-etoxilát) hozzáadásával gátolják meg.

Mivel az emulziós adjuvánssok mellékhatásai – például a gyulladásoos reakciók, a fekélyek és a granulómák – igen gyakoriak, ezért a fejlesztők természetes olajok használatával kevésbé káros emulziótípusokat próbáltak előállítani: így kevésbé viszkózus, könnyebben bejuttatható és stabilabb keverékeket sikerült készíteniük. Napjainkban az egyik leggyakrabban használt emulziós adjuváns az MF59 (**3/A. ábra**).

A szkvalén egy 30 szénatomos triterpén, amely a szteroidok prekursoraként minden élőlényben megtalálható (**3/B. ábra**) és sokkal könnyebben metabolizálható, mint a Freund adjuvánssokban alkalmazott paraffinolaj (30, 85).

Hatásmechanizmusának vizsgálata alapján nem valószínű, hogy antigén depóként működne. Hat óra elteltével az adjuváns 90%-a és az antigén 75%-a már nem található meg az injektálás helyén, de jelölt szkvalén akár 15 nap múlva is kimutatható kísérleti egerek oltásközeli nyirokmirigyjeiben (25). Más kísérleti adatok is arra utalnak, hogy az MF59 serkenti a granulociták, monociták és makrofágok antigén felvevő képességét és az oltás helyére történő migrációját, valamint elősegíti a monociták differenciálódását antigénprezentáló dendritikus sejtekké (26, 99). Az aktiválódott immunsejtek MCP-1 (CCL-2), IL-8 (CXCL-8), CCL3 és CCL4 kemokineket bocsátanak ki, amelyek pozitív visszacsatolási folyamat révén elősegítik további granulociták, monociták és makrofágok megjelenését az oltási helyen (24). Izomsejtek is közrejátszhatnak az MF59 aktiváló hatásában, mivel ezekben megugrik az immunaktivátor JunB and pentraxin3 fehérjék szintézise (76).

Az aktivált immunsejtek intracelluláris módon transzportálják az oltási helyről az antigént a helyi nyirokcsomókba. Az antigénprezentáló sejtek mennyisége a nyirokcsomókban az immunválasz szempontjából rendkívül kritikus. Jelenlegi tudásunk szerint az MF59 hatásának alapja, hogy az oltási helyen nagyobb számban megjelenő immunsejtek növelik a nyirokcsomókban prezentált antigének mennyiségét, amely nemcsak az immunválasz erősségére, de minőségére is jelentős befolyással bír, és ez megmutatkozik az ellenanyagok affinitásának, illetve a felismert epitópok mennyiségének növekedésében is. Egy klinikai kísérletben alum adjuvált, elölt H5N1 influenza vakcina főleg a hemagglutinin HA2 doménje ellen indukált ellenanyagokat, míg az MF59 a HA1 domén és a neuraminidáz ellen is, ráadásul csak az MF59-cel generált szérum volt képes neutralizáló konformációs epitópokat is felismerni a hemagglutininen (50).

A hazai forgalomban lévő állatgyógyászati oltóanyagok közül egyedül egy sertés cirkovírus elleni vakcina tartalmazza adjuvánsként a szkvalén hidrogénezett változatát, a szkvalánt.

### *Szaponinok*

A szaponinok növényekben, mélytengeri állatokban, illetve néhány baktériumban található felületaktív szteroidok vagy triterpén glikozidok, amelyekben a hidrofób maghoz szénhidrogén-láncok kapcsolódnak (96, 122).

A Quil A és a QS-21 a szappankéregfa kérgéből kivont szaponin-származékok amelyek számos állatorvosi vakcinában megtalálhatóak (**3/C. ábra**). Adjuváló hatásuk különösen az emlősállatokban érvényesül és sokkal kevésbé hatékonyak az állatok más csoportjaiban, pl. madarakban. Legnagyobb előnyük, hogy a humorális immunválasz stimulációja mellett a citotoxikus CD8+ limfocitákat aktiválják, így sokkal intenzívebb T sejt függő választ képesek kiváltani, mint az adjuvánsok nagy többsége (49). Ezt a hatást nagy valószínűséggel úgy érik

el, hogy felületaktív anyagként a koleszterollal kölcsönhatásba lépve beékelődnek a sejtek felszíni és endoszomális membránjaiba, ahol lyukakat képezhetnek, vagy megváltoztatják a membránok permeabilitását és ezzel segítik elő az antigének bejutását a citoszolba (5). A citoszolba jutott fehérje-antigént a citoplazmatikus proteázok megemésztik, így azok az MHCI molekulákhoz kötődve bemutatásra kerülhetnek a sejtfelszínen annak ellenére, hogy *de novo* fehérjeszintézis nem történt a sejtben (kereszt- vagy indirekt prezentáció). Az MHCI-hez kötött antigének ezután beindítják a celluláris immunválaszt (23). Hátrányos mellékhatásaik, hogy elősegíthetik granulómák képződését, aspecifikus monocita proliferációhoz vezethetnek, erős helyi gyulladásokat okozhatnak és hemolízist is előidézhettek (18). A hazai gyakorlatban jelenleg két szarvasmarha, egy IBR és egy *E.coli*/rotavírus/koronavírus elleni kombinált oltóanyag van forgalomban, amelyekben szaponin az adjuváns.

A Quil A fontos alkotója az immunstimuláló komplexeknek (ISCOM), amelyeket Morein és kollégái írtak le először 1984-ben (73). Az ISCOM vakcinák koleszterolt, foszfolipidet, szaponint és antigént tartalmaznak, amelyek körülbelül 40 nm átmérőjű partikulákká állnak össze. Az antigén nélküli változata az ISCOMATRIX. Az ISCOM és az ISCOMATRIX vakcinák erősen immunogének, a veleszületett és az adaptív immunrendszert is képesek aktiválni (106). Az ISCOM intraperitoneális injektálása intenzív helyi gyulladás létrejöttét, neutrofil granulociták és hízósejtek, majd később makrofágok, dendritikus sejtek és limfociták termelődését, valamint reaktív oxigén intermedierek és gyulladásos citokinek (IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ ) szekrécióját serkenti (121). A citokinek közül az IL-12 a legfontosabb mediátor, amely hozzájárul az ISCOM immunstimuláló hatásához (42). Az IL-12, vagy más néven természetes ölösejt stimuláló faktor (NKSF) serkenti a citokinek transzkripcióját és szekrécióját, indukálja a T és NK sejtek proliferációját, valamint a celluláris irányba tolja el az immunválaszt (17, 31). Mindezek mellett az ISCOM serkenti az MHC I és MHC II fehérjék expresszióját is, és részecsketermészete miatt elősegíti az antigén felvételét DC-kben,

illetve makrofágokban endocitózis által (94, 118). Jelenleg egy, a lovak nyugat-nílusi láz elleni oltóanyagában alkalmaznak ISCOMATRIX-ot.

## **Fejlesztés alatt álló adjuvánsok**

### *CpG-t tartalmazó oligodezoxinukleotidok*

Az új generációs adjuvánsok közül a legintenzívebben tanulmányozottak a **metilálatlan CpG-t tartalmazó oligodezoxinukleotidok (CpG ODN)**. Mint ismert a metilálatlan CpG dinukleotidok gyakorisága és mintázata eltér a prokarióták és eukarióták között (13, 93). A bakteriális genomban ugyanis a CpG dinukleotidok metilálatlanok maradnak, számuk pedig a várt gyakoriságnak megfelelő, míg a gerincesek genomjában a CpG-k 70-90% metilált és a CpG-k alulreprzentáltsága jellemző. Ennek eredményeként a gerincesekben olyan saját/nem-saját mintázatfelismerő mechanizmusok alakultak ki, amelyek lehetővé teszik a patogének genomjából származó nem metilált CpG-t hordozó DNS darabok detektálását (58).

Emlősökben a Toll-like receptor 9 (TLR 9) míg madarakban Toll-like receptor 21 (TLR 21) köti a metilálatlan CpG-t tartalmazó egyszálú DNS-t és szolgál specifikus detektorként (11). TLR 9 és TLR 21 az endoszómák membránjában található. Ez a lokalizáció elősegítheti, hogy a receptorok főleg a patogénekből (vírusok, baktériumok) az endoszomális emésztés során kiszabaduló nukleinsavakat érzékeljék, és ne találkozzanak sérülések során a sejtekből kiszabaduló saját DNS-sel, amelyet az extracelluláris DNázok viszonylag gyorsan lebontanak. Erre a logikusnak tűnő állításra további bizonyítékot szolgáltat az a tény, hogy mutáns egerekben, amelyekben a TLR 9 a sejtfelszíni membránon lokalizálódik, a receptor extracelluláris saját DNS jelenlétére is aktiválódik és az állatok a kiváltott szisztémás gyulladás következtében elpusztulnak (6, 77).

A metilálatlan CpG-eket tartalmazó szekvenciák a TLR9 receptorokkal kölcsönhatásba lépve a MyD88 adaptor fehérjén keresztül mitogén-aktivált protein kinázok és transzkripció

faktorok (NF- $\kappa$ B, AP1, IRF-7) aktiválásával stimulálják a veleszületett és adaptív immunrendszer elemeit (**4. ábra**) (60, 61). Hatásukra fokozódik több kostimulátor fehérje (pl. MHCII, B7, CD40), illetve Fc receptor expressziója, az antigénprezentáló sejtek pedig ellenanyagok, illetve citokinek (pl. IL-1, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha/\beta$ ) termelésébe kezdenek (19, 55, 108, 109). A termelt molekulák mieloid DC-ket, T sejteket, monocitákat, valamint 1-es típusú NK sejteket (natural killer: természetes ölősejt) aktiválnak. Utóbbiak nagy mennyiségben kezdenek IFN- $\gamma$ -t szekretálni, valamint fokozódik lítikus aktivitásuk is (3, 15, 56, 59, 97). A közvetlenül aktivált B sejtek nemcsak citokineket, illetve ellenanyagot termelnek, hanem memóriasejteké is differenciálódhatnak (47).

Akár már hat nukleotid hosszúságú CpG ODN is aktiválhatja a gerincesek immunrendszerét, az viszont, hogy milyen CpG szekvencia stimulál immunválaszt, a szegélyező nukleotidoktól, illetve az adott gazdafajtól is függhet (60). A lehetséges stimulátor szekvenciákat vizsgálva kimutatták, hogy például a GACGTT szekvencia hatékonyan aktiválja a B sejteket egerekben és nyulakban, emberekben viszont erre nem képes. A GTCGTT motívum viszont az összes vizsgált állatban – a madarakat is beleértve – immunstimulánsként működik, ami arra utal, hogy ennek a CpG-t tartalmazó szekvenciának a felismerése valamilyen evolúciós adaptáció eredménye lehet (92). Azok a CpG ODN-ek, amelyek 3' végükön timinben gazdagok, 5' végükön pedig TpC dinukleotidot tartalmaznak általában erősebb immunstimulánsok, mint azok, amelyekben a CpG-k a 3' vég közelében találhatóak (39, 60).

A fentebb említetteken kívül a stimuláló hatást befolyásolhatja a CpG ODN kémiai és másodlagos (palindrom szekvenciák) szerkezete is. Kísérletek folynak olyan CpG ODN-ekkel (ún. K-típusú CpG ODN) amelyekben a nukleotidok nem foszfodiészter, hanem foszforotioát kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ezek ellenállóbbá teszik a molekulát a nukleázokkal szemben, így annak megnő a féléletideje (80). Az ún. P-típusú CpG ODN-ek a foszforotioát



gerincen számos CpG motívumot és mindkét végen palindrom szekvenciát hordoznak. Az ismétlődő szekvenciák miatt konkatamerizációra hajlamosak, aminek következményeként nagyobb mennyiségű IFN- $\alpha$  indukciójára képesek, mint bármely eddig vizsgált ODN (98).

Napjainkra száznál több olyan preklinikai vizsgálatot végeztek, amelyben sikerült kimutatni a metilálatlan CpG-ket tartalmazó ODN-ek immunstimuláló hatását (8). Azt tapasztalták, hogy a CpG ODN-ek adjuváló hatása jobban érvényesült akkor, ha az antigénnel egy időben, illetve szoros közelségben, például alummal konjugálva, vagy közös liposzómában juttatták be őket a sejtekbe. Ilyen esetekben az IgG-nek 10, de akár 1000-szer nagyobb mennyiségét mérték, mint azokban a kísérletekben, amelyekben az antigént egyedül, vagy csak alumínium jelenlétében adták be (19, 38, 53).

A CpG ODN-ekben rejlő potenciált jól érzékelteti egy egereken végzett kísérlet. Ennek során CpG ODN-nel kombináltak emberi célra már regisztrált, alum adszorbeált elölt anthraxot tartalmazó vakcinát (AVA: Anthrax Vaccine Adsorbed). Az egerekben a lépfene elleni oltás során a CpG-adjuvált vakcina nemcsak az immunválaszt erősítette, hanem annak időtartamát is növelte. A kísérlet során ugyanis nemcsak tízszer magasabb antigén elleni IgG szintet mértek, hanem azt is tapasztalták, hogy az ellenanyag titer szignifikánsan hosszabb ideig megmaradt, mint a CpG ODN nélkül oltott állatokban. Mi több, az egerek többsége 1 év múltán is ellenállt a kísérleti anthrax fertőzésnek, amikor az ellenanyag szint már a protektív érték alá esett. Ezt a vizsgálatok szerint a korábban képződött anti-anthrax memória B sejtek aktiválódása és nagy affinitású ellenanyaguk gyors szekréciója tette lehetővé (115). A gyors immunválasz annak köszönhető, hogy a mérések szerint a nagy affinitású memória sejtek száma háromszorosa volt a CpG-vel adjuvált állatokban, mint a csak AVA-val vakcinázottakban. A CpG-vel kapott kiváló eredmények ugyanakkor jelenleg még nem jelentek meg a mindennapok állatgyógyászatában. Egyelőre nincsen CpG ODN adjuvánst tartalmazó állatgyógyászati oltóanyag sem hazai, sem európai forgalomban.

### *Mukozális adjuvánsok*

Az állatorvosi gyakorlatban komoly kereslet lenne haszonállatok mukozális úton történő vakcinázásra, mivel ez csökkentené az injektálással kapcsolatos költségeket (képzett személyzet, steril eszközök) és az állatokat érő stresszt. A legtöbb kórokozó bejutási helye amúgy is a légző-, az urogenitális-, illetve az emésztőrendszert borító nyálkahártya. Ennek immunológiai védelmére alakult ki gerincesekben a nyálkahártya alatt lévő nyirokszövet rendszer, amelyet az angol elnevezés rövidítése alapján MALT-nak (Mucosal Associated Lymphoid Tissue) nevezünk: ez tekinthető a legnagyobb emlős nyirokszervnek.

A MALT erősen kompartmentalizált: Peyer-plakkok, mezenterális nyirokcsomók, a vakbél, a bélben lévő mirigyek, a mandulák, a garat tájékán lévő adenoidok alkotják, működése lényegében független a szisztémás immunrendszertől (78, 52). A T- és B-limfociták, valamint a defenzinek mellett nagyszámban tartalmazza a veleszületett immunrendszer sejtjeit is, például makrofágokat, dendritikus sejteket, NK sejteket, neutrofil granulocitákat és hízósejteket (123). Az ellenanyagok közül elsősorban az IgA termelődik nagy mennyiségben (63). A B sejtek IgA termelését a TGF- $\beta$ , az IL-4 és az IL-10 indukálja, amelyeket viszont a nyálkahártya epiteliális és T sejtjei termelnek (34).

Protektív IgA válasz kiváltásához az orális immunizáció tűnhetne legkézenfekvőbbnek, viszont a gyomorsavon és a gyomor emésztőenzimjein keresztül rendkívül nehéz az antigéneket úgy eljuttatni a vékonybélbe, hogy azok a Peyer-plakkok stimulációjával olyan immunválaszt váltsanak ki a nyálkahártyák felületén, amely ténylegesen megakadályozza a kórokozók bejutását a szervezetbe. Ugyanakkor nem ritka jelenség, hogy az orálisan bejuttatott antigén ellenanyag válasz helyett toleranciát vált ki. Ezért a fejlesztők alternatív utakat (nazális és rektális immunstimuláció) is intenzíven tanulmányoznak a hatékonyabb mukozális immunválasz kiváltására (32, 69, 105).

A hozzáférhető adatokból az derül ki, hogy az adjuvánsok megfelelő kiválasztásának és alkalmazásuk módjának kulcsszerepe lehet a sikeres mukozális vakcinák fejlesztésében.

Biztató kísérletek folynak retinsavval és enterotoxinokkal (**kolera toxin** és az *E. coli* **hőlabilis enterotoxin**) mint mukozális adjuvánsokkal. A retinsav az A-vitamin egyik geometriai izomer származéka, fontos immunstimuláns, amely egyrészt aktiválja a T-sejtek mukozális lokalizációját (homing) meghatározó  $\alpha 4\beta 7$  integrin és CCR9 kemokin receptor expresszióját, ugyanakkor stimulálja a mukozális B sejtek IgA szekrécióját (4, 44, 72).

A kísérleti rendszerekben leginkább tanulmányozott mukozális adjuváns a kolera toxin (CT). A proteáz rezisztens toxin egy homopentamert képező  $\beta$  (CTB) és az ehhez kötődő monomer  $\alpha$  (CTA) alegységekből épül fel. A CTB képes kötődni a sejt felszínén lévő GM1 gangliozidhoz, feladata pedig a sejt adenilát-ciklázához kötődő ADP-ribosiláz enzim aktivitással rendelkező CTA célba juttatása.

A CT elsősorban annak köszönhetően rendkívül jó mukozális adjuváns, hogy a GM1 gangliozid viszonylag nagy mennyiségben előfordul az emésztőrendszer Peyer-plakkokat fedő epiteliális M sejtjeiben és a MALT egyes antigénprezentáló sejt típusaiban (makrofágok, DC, és B sejtek). A toxin kötődésének hatására megváltozik az epiteliális sejtek permeabilitása, a MALT-ban pedig megnő a professzionális antigénprezentáló immunsejtek antigén felvevő és antigénprezentáló képessége. B sejteknél a kötődés együtt jár az MHC II fehérjék termelődésének növekedésével, valamint az izotípus differenciáció serkentésével. Emellett a toxin komplex változásokat okoz az immunsejtek citokin szintézisében is. Például IL-4 expressziót indukál Th2 sejtekben és IL-1 szekréciót makrofágokban és DC-kben.

Habár a CTB sem emberben, sem állatban nem toxikus, közel sem olyan hatékony orális mukozális adjuváns, mint a teljes CT, ami határozottan arra utal, hogy a CTA-nak is komoly szerepe van az adjuváns hatás kialakításában. Ezt támasztja alá az a kísérlet is, ahol az enzimatikusan aktív CTA1-t egy *Staphylococcus aureus*-ból származó protein-A

származékhoz (DD) kapcsolják, amely specifikusan képes volt antigénprezentáló B sejtek sejt felszíni immunglobulinjaihoz kötődni. Amikor CTA1-DD-t különféle antigénekkal alkalmaztak intranazálisan, a kiméra fehérje mind a szisztémás, mind a mukozális immunválaszt jelentősen növelte (64, 88).

A komplett CT jobb adjuválo hatásának kiaknázására jelenleg is folynak kísérletek, amelyekben a CTA toxicitását oly módon próbálják mutációkkal vagy inszerciókkal csökkenteni, hogy az adjuválo hatás megmaradjon (40, 89).

### Irodalomjegyzék

1. ALLISON, A. C. – BYARS, N. E.: Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Mol. Immunol.*, 1991. 28. 279–284.
2. AWATE, S. – BABIUK, L. A. – MUTWIRI, G.: Mechanisms of action of adjuvants. *Front. Immunol.*, 2013. 4. 114.
3. BALLAS, Z. K. – RASMUSSEN, W. L. – KRIEG, A. M.: Induction of natural killer activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J. Immunol.*, 1996. 157. 1840–1845.
4. BALLOU, M. – WANG, X. et al.: Expression and regulation of nuclear retionic acid receptor sin human lymphoid cells. *J. Clin. Immunol.*, 2003. 23. 46–54.
5. BANGHAM, A. D. – HORNE, R. W. et al.: Action of saponins on biological membranes. *Nature*, 1962. 196. 952–955.
6. BARTON, G. M. – KAGAN, J. C. – MEDZHITOV, R.: Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.*, 2006. 7. 49–56.
7. BEUTLER, B. A.: TLRs and innate immunity. *Blood*, 2009. 113. 1399–1407.

8. BODE, C. – ZHAO, G. et al.: CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines.*, 2011. 10. 499–511.
9. BÖHLER-SOMMEREGGER, K. – LINDEMAYR, H.: Contact sensitivity to aluminium. *Contact Dermatitis*, 1986. 15. 278–281.
10. BREWER, J. M. – CONACHER, M. et al.: In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.*, 1996. 26. 2062–2066.
11. BROWNLIE, R. – ZHU, J. et al.: Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.*, 2009. 46. 3163–3170.
12. BURDETTE, D. L. – VANCE, R. E.: STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat. Immunol.*, 2013. 14. 19–26.
13. CARDON, L. R. – BURGE, C. et al.: Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994. 91. 3799–3803.
14. COFFMAN, R. L. – SHER, A. – SEDER, R. A.: Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.*, 2010. 33. 492–503.
15. COWDERY, J. S. – CHACE, J. H. et al.: Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- $\gamma$  *in vivo* and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J. Immunol.*, 1996. 156. 4570–4575.
16. COX, J. C. – COULTER, A. R.: Advances in adjuvant technology and application. In: Yong, W. K. (editor): *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology*. CRC Press Inc. Boca Raton, Palm Beach, Florida, USA, 1992. 51–54.

17. D'ANDREA, A. – RENGARAJU, M. et al.: Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, 1992. 176. 1387–1398.
18. DALSGAARD, K.: Adjuvants. *Vet Immunol. Immunopathol.*, 1987. 17. 145–53.
19. DAVIS, H. L. – WEERANTA, R. et al.: CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.*, 1998. 160. 870–876.
20. DAY, M. J.: Vaccine side effects: fact and fiction. *Vet. Microbiol.*, 2006. 117. 51–58.
21. DINARELLO, C. A.: Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *N. Engl. J. Med.*, 1984. 311. 1413–1418.
22. DOUCE, G. – TURCOTTE, C. et al.: Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin lacking ADP ribosyl-transferase activity act as non-toxic mucosal adjuvants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1995. 92. 1644–1648.
23. DUEWELL, P. – KISSER, U. et al.: ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.*, 2011. 187. 55–63.
24. DUPUIS, M. – DENIS-MIZE, K. et al.: Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, 2001. 31. 2910–2918.
25. DUPUIS, M. – McDONALD, D. M. – OTT, G.: Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine*, 1999. 18. 434–439.
26. DUPUIS, M. – MURPHY, T. J. et al.: Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell. Immunol.*, 1998. 186. 18–27.
27. EDELMAN, R.: Vaccine Adjuvants. *Rev. Infect. Dis.*, 1980. 2. 370–383.

28. EPPSTEIN, D. A., BYARS, N. E. – ALLISON, A. C.: New adjuvants for vaccines containing purified protein antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1990. 4. 233.
29. FREUND, J. – CASALS, J. – HOSMER, E. P.: Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Medical*, 1937. 37. 509–513.
30. GARCON, N. – LEROUX-ROELS, G. – CHENG, W-F.: Vaccine adjuvants. In: Garcon, N. – Stern, P. L. – Cunningham, A. L. (editors): *Understanding Modern Vaccines: Perspectives in Vaccinology*. Elsevier, 2011. 1. 99–102.
31. GAZZINELLI, R. T. – HIENY, S. et al.: Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993. 90. 6115–6119.
32. GILLIGAN, C. A. – LI WAN PO, A.: Oral vaccines: design and delivery. *Int. J. Pharm.*, 1991. 75. 1–24.
33. GLENNY, A. T. – POPE, C. G. et al.: The antigenic value of toxoid precipitated by potassium-alum. *J. Path. Bacteriol.*, 1926. 29. 38–45.
34. GOODRICH, M. E. – MCGEE, D. W.: Regulation of mucosal B cell immunoglobulin secretion by intestinal epithelial cell-derived cytokines. *Cytokine*, 1998. 10. 948–955.
35. GOTO, N. – KATO, H.: Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*, 1993. 11. 914–918.
36. GUPTA, R. K. – RELYVELD, E. H. et al.: Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, 1993. 11. 293–306.

37. GUPTA, R. K. – SIBER, G. R.: Comparison of adjuvant activities of aluminium phosphate, calcium phosphate and stearyl tyrosine for tetanus toxoid. *Biologicals*, 1994. 22. 53–63.
38. GURSEL, I. – GURSEL, M. et al.: Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. *J. Immunol.*, 2001. 167. 3324–3328.
39. HARTMANN, G. – KRIEG, A. M.: Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.*, 2000. 164. 944–953.
40. HOLMGREN, J. – HARANDI, A. M. – CZERKINSKY, C.: Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Expert Rev. Vaccines*, 2003. 2. 205–217.
41. HORNING, V. – BAUERNFEIND, F. et al.: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.*, 2008. 9. 847–856.
42. HU, K. F. – LOVGREN-BENGTSSON, K. – MOREIN, B.: Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001. 51. 149–159.
43. IWASAKI, A. – MEDZHITOV, R.: Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 2010. 327. 291–295.
44. IWATA, M. – HIRAKIYAMA, A. et al.: Retionic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 2004. 21. 527–538.
45. IYER, S. S. – PULSKENS, W. P. et al.: Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009. 106. 20388–20393.
46. JIANG, D. – PREMACHANDRA, G. S. et al.: Structure and adsorption properties of commercial calcium phosphate adjuvant. *Vaccine*, 2004. 23. 693–698.



47. JUNG, J. – YI, A. K. et al.: Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J. Immunol.*, 2002. 169. 2368–2373.
48. KAWAI, T. – AKIRA, S.: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 2010. 11. 373–384.
49. KENSIL, C. R.: Saponins as vaccine adjuvants. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1996. 13. 1–55.
50. KHURANA, S. – CHEARWAE, W. et al.: Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci. Transl. Med.*, 2010. 2. 15ra5.
51. KIM, J. J. – JO, E. K.: NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. *J. Korean Med. Sci.*, 2013. 28. 1415–1423.
52. KIYONO, H. – FUKUYAMA, S.: NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004. 4. 699–710.
53. KLINMAN, D. M. – BARNHART, K. M. – CONOVER J.: CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine*, 1999. 17. 19–25.
54. KLINMAN, D. M.: Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004. 4. 249–258.
55. KOBAYASHI, H. – HORNER, A. A. et al.: Immunostimulatory DNA pre-priming: a novel approach for prolonged Th1-biased immunity. *Cell. Immunol.*, 1999. 198. 69–75.
56. KOJIMA, Y. – XIN, K. Q. et al.: Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*, 2002. 20. 2857–2865.

57. KOOL, M. – SOULLIÉ, T. et al.: Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2008. 205. 869–882.
58. KRIEG, A. M. – YI, A. K. – HARTMANN, G.: Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA. *Pharmacol. Ther.*, 1999. 84. 113–120.
59. KRIEG, A. M. – YI, A. K. et al.: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 1995. 374. 546–549.
60. KRIEG, A. M.: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Ann. Rev. Immunol.*, 2002. 20. 709–760.
61. KUMAGAI, Y. – TAKEUCHI, O. – AKIRA, S.: TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008. 60. 795–804.
62. LINDBLAD, E. B.: Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol. Cell. Biol.*, 2004. 82. 497–505.
63. LYCKE, N. – ERIKSEN, L. – HOLMGREN, J.: Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.*, 1987. 25. 413–419.
64. LYCKE, N.: From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cell. Microbiol.*, 2004. 6. 23–32.
65. MARRACK, P. – MCKEE, A. S. – MUNKS, M. W.: Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009. 9. 287–293.
66. MARTINON, F. – MAYOR, A. – TSCHOPP, J.: The inflammasomes: Guardians of the body. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009. 27. 229–265.
67. MARX, P. A. – COMPANS, R. W. – GETTIE, A.: Protection against vaginal SIV transmission with microencapsulated vaccine. *Science*, 1993. 28. 1323–1327.

68. MCEL RATH, M. J.: Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Semin. Cancer Biol.*, 1995. 6. 375–385.
69. MEDINA, E. – GUZMAN, C. A.: Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2000. 27. 305–311.
70. MEEUSEN, E. N. – WALKER, J. et al.: Current status of veterinary vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007. 20. 489–510.
71. MINKE, J. M. – AUDONNET, J. C. – FISCHER, L.: Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.*, 2004. 35. 425 – 443.
72. MORA, J. R. – IWATA, M. et al.: Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*, 2006. 17. 1157–1160.
73. MOREIN, B. – SUNDQUIST, B. et al.: Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, 1984. 308. 457–460.
74. MOREIN, B. – VILLACRÉS-ERIKSSON, M. et al.: Novel adjuvants and vaccine delivery systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1996. 54. 373–384.
75. MORTENSEN, S. R. – STRYHN, A. et al.: Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Prev. Vet. Med.*, 2002. 53. 83–101.
76. MOSCA, F. – TRITTO, E. et al.: Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008. 105. 10501–10506.
77. MOUCHESS, M. L. – ARPAIA, N. et al.: Transmembrane mutations in Toll-like receptor 9 bypass the requirement for ectodomain proteolysis and induce fatal inflammation. *Immunity*, 2011. 35. 721–732.
78. MOWAT, A. M.: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003. 3. 331–341.

79. MURTAUGH, M. P. – ELAM, M. R. – KAKACH, L. T.: Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.*, 1995. 140. 1451–1460.
80. MUTWIRI, G. K. – NICHANI A. K. et al.: Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J. Control. Release*, 2004. 97. 1–17.
81. NAKANISHI, K. – YOSHIMOTO, T. – TSUTSUI, H. et al.: Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001. 12. 53–72.
82. O’HAGAN, D. T. – FOX, C. B.: New generation adjuvants – from empiricism to rational design. *Vaccine*, 2015. 33. B14–20.
83. O’NEILL, L. A. – BOWIE, A. G.: Sensing and signaling in antiviral innate immunity. *Curr. Biol.*, 2010. 20. R328–R333.
84. O’NEILL, L. A. – GOLENBOCK, D. – BOWIE, A. G.: The history of Toll-like receptors – redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013. 13. 453–460.
85. OTT, G. – BARCHFELD, G. L. et al.: MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm. Biotechnol.*, 1995. 6. 277–296.
86. PETRIK, M. S. – WONG, M. C. et al.: Aluminum adjuvant linked to Gulf War illness induces motor neuron death in mice. *J. Neuromolec. Med.*, 2007. 9. 83–100.
87. PISETSKY, D. S.: The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin. Immunol.*, 2012. 144. 32–40.
88. PIZZA, M. – GIULIANI, M. M. et al.: Mucosal vaccines: non-toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 2001. 19. 2534–2541.
89. PLANT, A. – WILLIAMS, N. A.: Modulation of the immune response by the cholera-like enterotoxins. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2004. 4. 509–519.

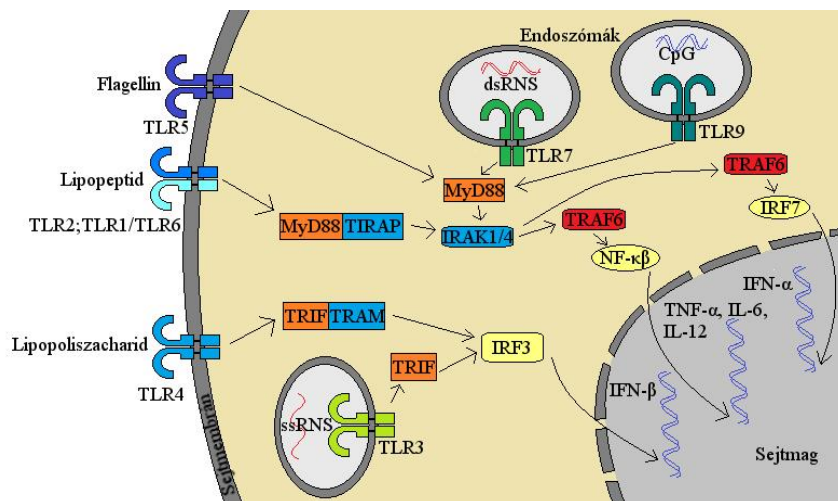
90. RAMON, G.: Procédes pour accroître la production des antitoxins. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926. 40. 1–10.
91. RAMON, G.: Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique. *Bull. Soc. Centr. Med. Vet.*, 1925. 101. 227–234.
92. RANKIN, R. – PONTAROLLO, R. et al.: CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2001. 11. 333–340.
93. RAZIN, A. – FRIEDMAN, J.: DNA methylation and its possible biological roles. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 1981. 25. 33–52.
94. REED, S. G. – BERTHOLET, S. et al.: New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.*, 2009. 30. 23–32.
95. RELYVELD, E. H.: A history of toxoids. In: Plotkin, S. A. (editor): *History of Vaccine Development*. Springer, New York, 2011. 57–64.
96. RIGUERA, R.: Isolating bioactive compounds from marine organisms. *J. Marine Biotechnol.*, 1997. 5. 187–193.
97. ROTHENFUSSER, S. – HORNING, V. et al.: Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur. J. Immunol.*, 2001. 31. 3525–3534.
98. SAMULOWITZ, U. – WEBER, M. et al.: A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides*, 2010. 20. 93–101.
99. SEUBERT, A. – MONACI, E. et al.: The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol.*, 2008. 180. 5402–5412.

100. SHARP, F. A. – RUANE, D. et al.: Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009. 106. 870–875.
101. SHAW, C. A. – PETRIK, M. S.: Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. *J. Inorg. Biochem.*, 2009. 103. 1555–1562.
102. SHENDEROV, K. – BARBER, D. et al.: Inflammasome-dependent IL-1{beta} production is critical for complete Freund's adjuvant-induced helper T cell polarization. *J. Immunol.*, 2010. 184. 136.44.
103. SHENDEROV, K. – BARBER, D. L. et al.: Cord factor and peptidoglycan recapitulate the Th17-promoting adjuvant activity of mycobacteria through mincle/CARD9 signaling and the inflammasome. *J. Immunol.*, 2013. 190. 5722–5730.
104. SHRYOCK, T. R.: The future of anti-infective products in animal health. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004. 2. 425–430.
105. SIMECKA, J.: Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1998. 34. 235–259.
106. SJÖLANDER, A. – DRANE, D. et al.: Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. *Vaccine*, 2001. 19. 2661–2665.
107. SOÓS T. – TUBOLY S.: *Vakcinológia*. A/3 Nyomdaipari és Kiadói Szolgáltató Kft. Budapest, 2009. 33–37.
108. SPARWASSER, T. – KOCH, E. S. et al.: Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 1998. 28. 2045–2054.
109. SPARWASSER, T. – MEITHKE, T. et al.: Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated shock. *Eur. J. Immunol.*, 1997. 27. 1671–1679.

110. STRATH, M. – CLUTTERBUCK, E. J. – SANDERSON, C. J.: Production of human and murine eosinophils *in vitro* and assay for eosinophil differentiation factors. *Methods Mol. Biol.*, 1990. 5. 361–378.
111. STUART-HARRIS, C. H.: Adjuvant influenza vaccines. *Bull. WHO*, 1969. 41. 617–621.
112. SU, S. B. – SILVER, P. B. et al.: Essential role of the MyD88 pathway, but nonessential roles of TLRs 2, 4, and 9, in the adjuvant effect promoting Th1-mediated autoimmunity. *J. Immunol.*, 2005. 175. 6303–6310.
113. TAKEUCHI, O. – AKIRA, S.: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010. 140. 805–820.
114. TRAVIS, K.: Deciphering immunology's dirty secret. *The Scientist*, 2007. 21. 46–51.
115. TROSS, D. – KLINMAN, D. M.: Effect of CpG oligonucleotides on vaccine-induced B cell memory. *J. Immunol.*, 2008. 181. 5785–5790.
116. VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. – BABIUK, S. L. – BABIUK, L. A.: Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol. Rev.*, 2004. 199. 113–125.
117. VASSILEV, T. L.: Aluminium phosphate but not calcium phosphate stimulates the specific IgE response in guinea-pigs to tetanus toxoid. *Allergy*, 1978. 33. 155–159.
118. VILLACRES, M. C. – BEHBOUDI, S. et al.: Internalization of ISCOMS-borne antigens and presentation under MHC class I or class II restriction. *Cell Immunol.*, 1998. 185. 30–38.
119. VOGEL, F. R.: Adjuvants in Perspective. *Dev. Biol. Stand.*, 1998. 92. 241–248.
120. WALLS, R. S.: Eosinophil response to alum adjuvants. Involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Medical.*, 1977. 156. 431–435.

121. WINDON, R. G. – CHAPLIN, P. J. et al.: Induction of lymphocyte recruitment in the absence of a detectable immune response. *Vaccine*, 2000. 19. 572–578.
122. YOSHIKI, Y. – KUDOU, S. – OKUBO, K.: Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998. 62. 2291–2299.
123. YUAN, Q. – WALKER, W. A.: Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2004. 38. 463–473.



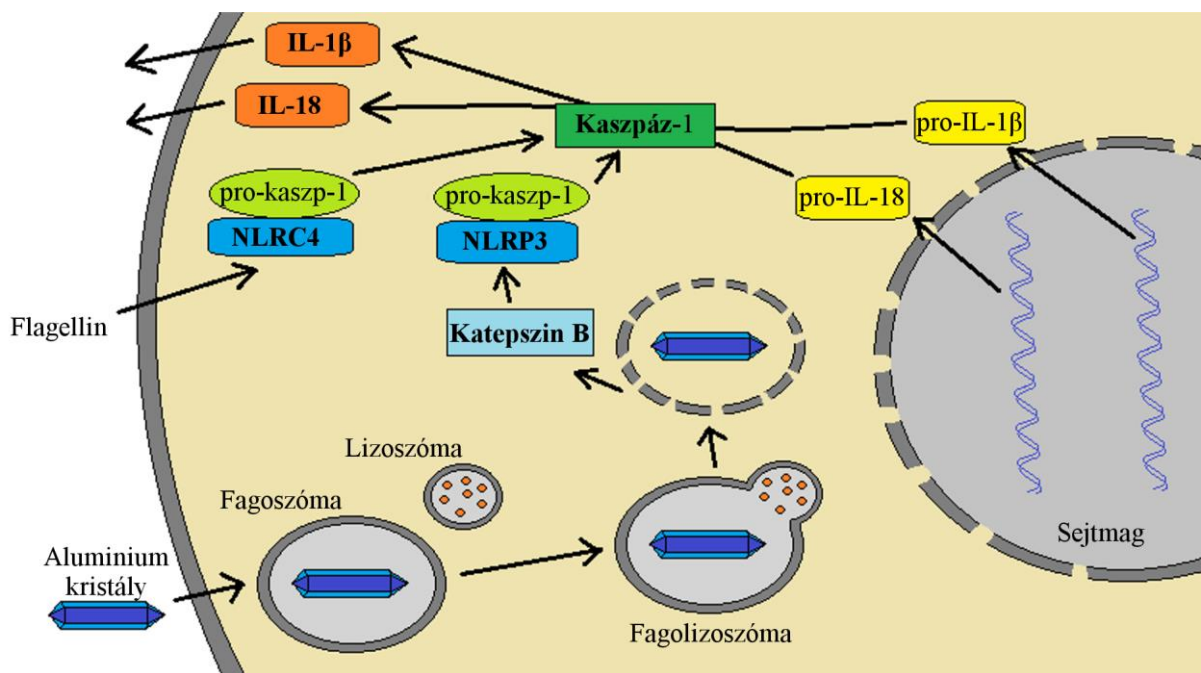


1. ábra. A toll-like receptorok (TLR) jelátviteli útvonalai.

A sejtmembránban található TLR4 a lipopoliszacharidok felismerésére képes és a TRIF/TRAM útvonalon keresztül az INF- $\beta$  expresszióját serkenti. Ugyanezt az útvonalat aktiválja az endoszomális TLR3, amely az egyszálú RNS molekulák megkötésére képes. A TLR5 extracelluláris doménja a flagellint, a TLR2/TLR1 vagy TLR2/TLR6 dimer a lipopeptideket érzékeli. Az endoszómák membránjában lokalizálódó TLR7 a duplaszálú RNS-t, a TLR9 a metilálatlan CpG motívumokat ismeri fel. Mindegyik a MyD88 útvonalat aktiválja, amely végül a TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$  gének expressziójához vezet (84).

Figure 1. Signalling pathways of the toll-like receptor (TLR) family.

TLR4 is localized in the cell membrane, binds to lipopolysaccharides and upregulates the expression of the INF- $\beta$  through the TRIF/TRAM pathway. The endosomal TLR3 activates same pathway as TLR4 but it recognizes single-stranded RNAs. The extracellular domain of the TLR5 detects flagelline while the TLR2/TLR1 and the TLR2/TLR6 complexes bind lipopeptides. TLR7 and TLR 9 are localised in the membrane of the endosomes. TLR7 recognizes double-stranded RNA whereas TLR9 recognizes un-methylated CpG motifs. These receptors activate the MyD88 pathway that lead to the expression of the TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\alpha$  genes (84).



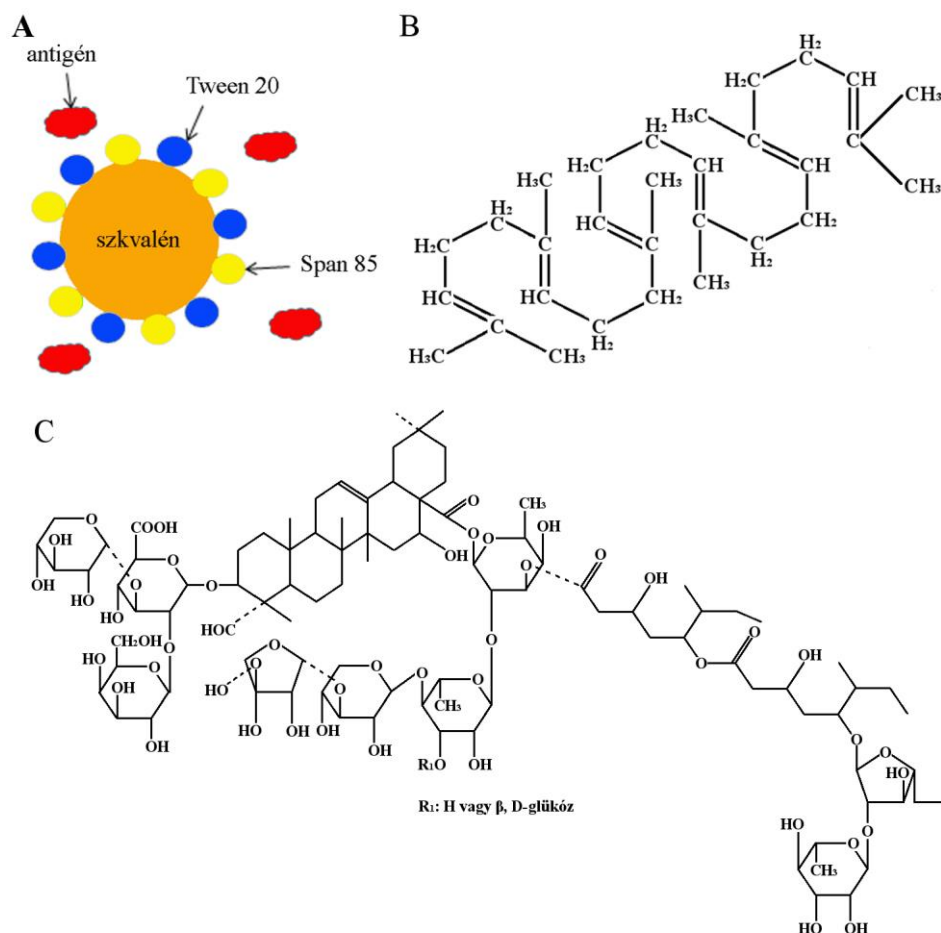
2. ábra. Kristályos szerkezetű adjuvánsok jelátviteli útvonala.

A kristályos szerkezetű részecskék felvétele (pl. alumínium sók, húgysav) a sejtek sérülésével járhat, ugyanis károsíthatják az endoszómák és lizoszómák membránjait, amelyekből ennek hatására katepszin B jut ki a citoplazmába. Ezt követően a katepszin B a NOD-like receptorokon (NLRP3 és NLRC4) keresztül beindítja az inflammaszómák képződését. Az inflammaszómák aktiválják a kaszpáz-1 fehérjét, amely a pro-IL-1 $\beta$ , illetve pro-IL-18 hasítására képes, amelyek így aktív interleukinokká alakulnak (51).

Figure 2. Signalling pathway of adjuvants with crystallized particles.

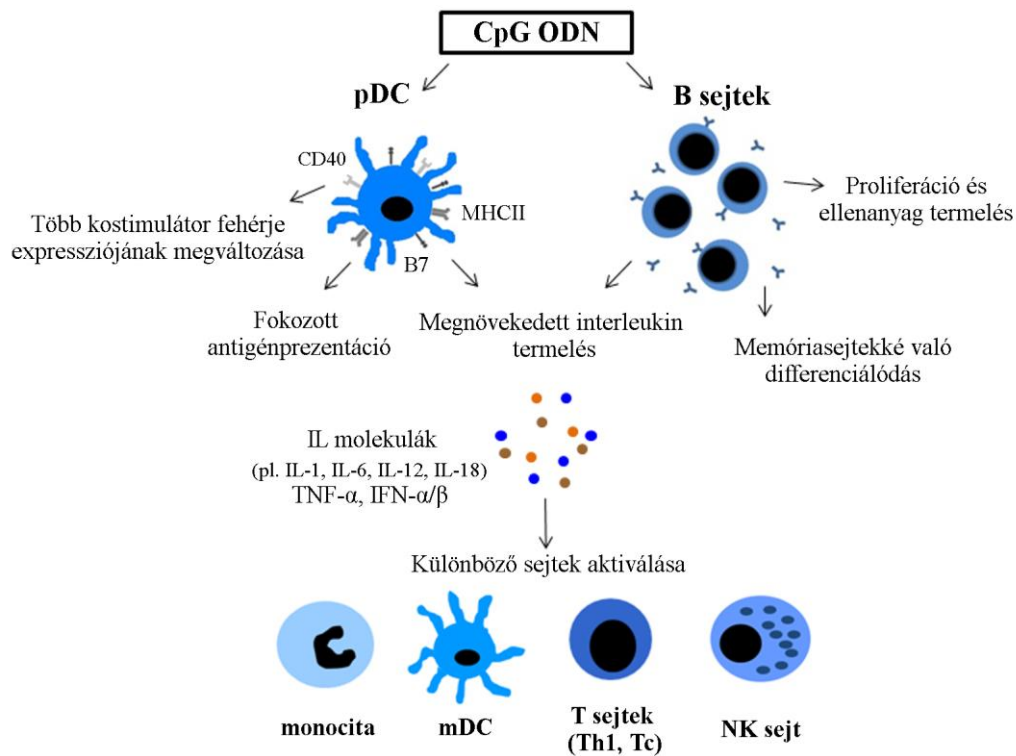
Endocytosis of crystallized particles (e.g. aluminum salts, uric acid) may damage endosomal and lysosomal membranes and can lead to the releasing of cathepsin B to the cytoplasm.

Binding of cathepsin B to NOD-like receptors (NLRP3 and NLRC4) initiates the formation of inflammasomes, which in turn activate the caspase-1 protein that cleaves pro-IL-1 $\beta$  and pro-IL-18 creating active interleukins (51).



3. ábra. Emulziós és szaponin alapú adjuvánsok. A. Az MF59 sematikus képe. Előállításakor szkvalént diszpergálnak citrát pufferben, Span 85 és Tween 80 nem ionos detergensekkel stabilizálva (30). B. A szkvalén szerkezeti képlete. C. A Quil A szerkezeti képlete.

Figure 3. Emulsion and saponine based adjuvants. A. Schematic figure of MF59. The squalene is dispersed in citrate buffer and stabilized with Span 85 and Tween 80 non-ionic detergents (30). B. Structural formula of squalene. C. Structural formula of Quil A.



4. ábra. A CpG oligodezoxinukleotidok (ODN) immunstimuláló hatása. A metilálatlan CpG-ket tartalmazó ODN-ek a plazmacitoid dendritikus sejtek (pDC) és B sejtek endoszómáiban található TLR9 receptorokkal kölcsönhatásba lépve a természetes és az adaptív immunrendszer aktiválására is képesek. Hatásukra fokozódik több kostimulátor fehérje expressziója, valamint az interleukinok (IL) és ellenanyagok termelése. A termelt molekulák mieloid DC-eket, T sejteket (Th1, Tc), monocitákat, valamint természetes ölösejteket (NK) aktiválnak (54).

Figure 4. Immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides (ODN). Unmethylated CpG-containing ODNs interacting with TLR9 receptors in the endosomes of plasmacytoid dendritic cells (pDC) and B cells can activate the innate and the adaptive immunsystems. They increase the expression of costimulatory molecules and the production of antibodies and

interleukins (IL). The produced immunomodulators activate myeloid DCs, T cells (Th1, Tc), monocytes and natural killer (NK) cells (54).

Célállat	Adjuvánsok megnevezése							
	Alumíniumsók	Szaponin	Quil A	Kálciumsók	Szkvalán	Montanide**	ISCOM	Paraffinolaj
kutya	14	0	0	0	0	0	0	0
macska	7	0	2	0	0	0	0	0
szarvasmarha	10	2	2	0	0	0	0	1
sertés	7	0	0	0	1	3	0	4
baromfi	4	0	0	0	0	0	0	13
ló	5	0	0	0	0	0	1	0
egyéb	1‡	0	0	0	0	0	1†	0
összes adott adjuváns tartalmazó vakcina száma*	39	2	4	0	1	3	2	18

1. táblázat. A magyarországi állatorvosi gyakorlatban jelenleg használt 69 inaktivált vakcina adjuvánsai. A Magyarországon jelenleg engedélyezett élő attenuált vakcina száma 192, az összes állatorvosi vakcina száma 261. \*Az értékek nem feltétlen kumulatívak, mivel egy adott vakcinát esetleg több állatfajra is ajánlhatnak. \*\*Montanide ISA 70, Montanide ISA 35VG, Montanide ISA 708, Montanide ISA 763AVG, Montanide-888 együttes adatok. †galamb, ‡nyúl.

1. table. Adjuvants of the 69 inactivated veterinary vaccines licensed in Hungary. The number of veterinary vaccines licensed in Hungary is 261, the number of live, attenuated vaccines is 192. \*The values are not cumulative as certain vaccines can be applied to several animal species. \*\*Summarized data of Montanide ISA 70, Montanide ISA 35VG, Montanide ISA 708, Montanide ISA 763AVG, Montanide-888. †pigeon, ‡rabbit.