

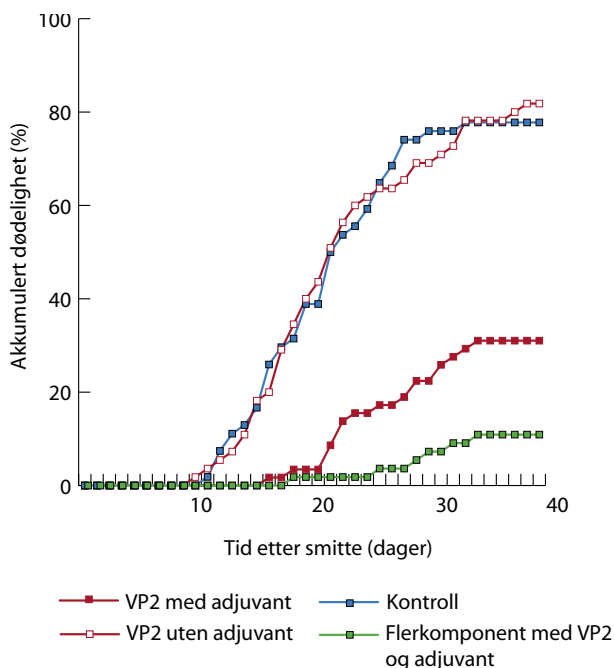
# Adjuvanter: en viktig komponent i vaksiner

Arild Tangerås, Intervet Norbio as

De fleste vaksiner inneholder i tillegg til antigen som induserer den spesifikke beskyttelsen, også en adjuvant. Denne gir i seg selv ingen beskyttelse, men er en viktig del av vaksiner da adjuvanter påvirker hvor god beskyttelse vaksinen vil gi, hvor hurtig beskyttelsen setter inn, og hvor lenge den varer.

Betydningen av vaksiner i norsk akvakultur er vel dokumentert og all laksefisk og så og si all torsk vaksineres i dag før den settes i sjø. Vaksiner virker ved at fisken eksponeres for en ufarliggjort komponent (antigen) av en sykdomsfremkallende mikroorganisme. Dermed aktiveres immunsystemet som deretter vil være langt bedre i stand til å uskadeliggjøre den samme mikroorganismen dersom fisken skulle bli eksponert for denne senere. Antigenet kan være inaktiverte hele bakterier eller virus, eller en komponent av disse. Men som regel er ikke antigenet alene i stand til å indusere den beskyttelse en ønsker å oppnå med vaksinen. Derfor inneholder de aller fleste vaksiner også hjelpestoffer som betegnes adjuvanter. Ordet kommer fra latin der "adjuvare" betyr "å hjelpe". De aller fleste fiskevaksiner som benyttes i dag inneholder adjuvanter. Det mest fremtredende unntaket er rene vibriose vaksiner som ofte kan gi tilstrekkelig beskyttelse også i fravær av adjuvanter.

Allerede for mer enn 80 år siden ble det vist at nivået av antitoksiner mot difteritoksin, det vil si antistoff mot toksinet produsert i hest, kunne økes ved å tilsette så forskjellige ting som bl.a. agar og brødsmler til vaksinen. Siden den gang har en lang rekke substanser blitt vist å kunne virke som adjuvanter. Men selv om vår viten om hvordan immunsystemet virker har økt formidabelt, ikke minst de siste tiår, er virkningsmekanismene for de forskjellige adjuvantene som benyttes i dag ikke fullt ut klarlagt. De forskjellige adjuvantsystemene vil påvirke flere deler av immunsystemet, noe som kompliserer bildet ytterligere. Så selv om design av adjuvantsystemer for vaksiner i dag bygges på en langt bedre kunnskapsplattform enn tidligere, er prøving og feiling fortsatt en sentral del i utviklingen av hver enkelt vaksine.



## Adjuvant absolutt påkrevd for mange antigener

Selv om enkelte antigener kan gi tilstrekkelig beskyttelse uten at det benyttes adjuvant i vaksinen, vil en for disse også som regel oppnå en bedre beskyttelse med en lengre varighet når adjuvant er tilstede. For andre antigener er adjuvant absolutt påkrevd da en oppnår så godt som ingen beskyttelse dersom vaksinen ikke inneholder dette. Det gjelder for eksempel for proteinet VP2 som er en del av viruset som forårsaker infeksiøs pankreas nekrose, IPN (Fig. 1). En rekke Gram-negative bakterier som for eksempel *Vibrio anguillarum* har en mengde lipopolysakkarider på sin overflate. Slike molekyler er vist også å kunne virke som adjuvant. Dette kan være en av forklaringene til at en oppnår en ytterligere økning i beskyttelse når vaksinen i tillegg til adjuvant også inneholder andre bakteriekomponenter (Fig. 1). Slike kombinasjonsvaksiner hører til de mest benyttede vaksinetypene til laks i dag.

Fig. 1.

### Innvirkning av adjuvant på beskyttelse mot IPN

Laks (rundt 40 g) ble vaksinert med formular som inneholdt enten kun VP2 fra IPN viruset, eller med samme mengde VP2 men nå i adjuvant (vann-i-olje type). En tredje gruppe ble vaksinert med en vaksine som i tillegg til VP2 og adjuvant også inneholdt bakteriekomponenter som induserer beskyttelse mot vibriose, kaldtvannsvibriose, furunkulose og vintersår. Kontrollgruppen ble injisert med fysiologisk saltvann. Etter rundt 8 uker ble fisken smoltifisert og deretter badsmittet med IPN virus. Dødelighet ble så registrert daglig.

Adjuvant i seg selv gir ingen eller kun en svært lav beskyttelse og som da er uspesifikk (Fig. 2). Her er laks vaksinert med en *Vibrio anguillarum* O1 komponent i et vann-i-olje adjuvantsystem og fisken smittet 6 uker etter vaksinerings. Dette formularet ser en gir en svært god beskyttelse (RPS<sup>1</sup> på 94 %), mens tilsvarende formular kun med adjuvant uten bakterikomponent gir nesten ingen beskyttelse (RPS<sup>1</sup> på 10 %).

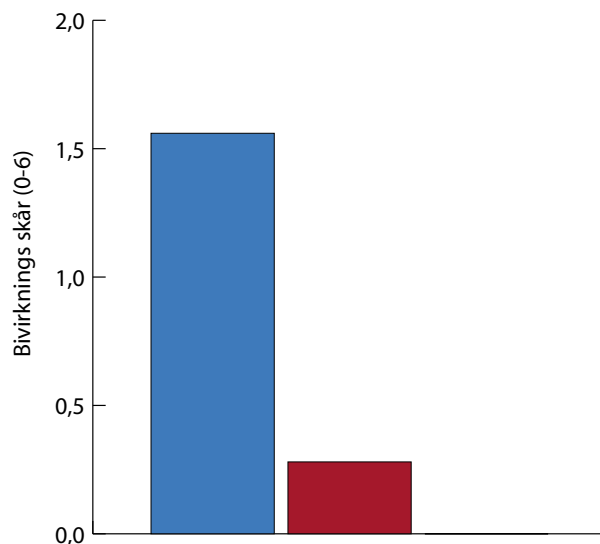
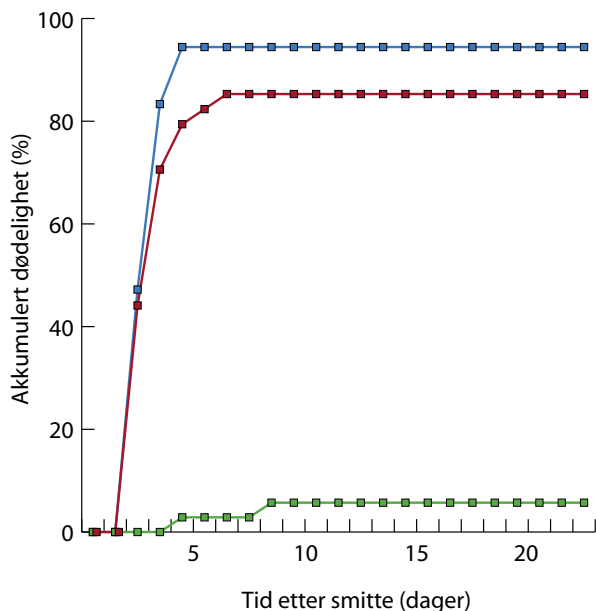


Fig. 2.

**Adjuvant alene gir ingen beskyttelse**

Laks (ca 35 g) ble vaksinert med en vaksine som i tillegg til adjuvant inneholdt formalinaktivert *Vibrio anguillarum* O1. En tilsvarende gruppe med laks ble injisert med samme adjuvant, men uten antigen. Seks uker etter vaksinerings ble fisken smittet med *V. anguillarum* O1. Mens det var nesten ingen dødelighet i vaksinert gruppe, var dødeligheten i gruppen der bare adjuvant var brukt nesten like stor som hos kontrollfisk.

Fig. 3.

**Adjuvant alene gir nesten ikke bivirkninger**

Tilsvarende grupper av fisk som de beskrevet i Fig. 2 ble evaluert for bivirkninger etter Speilbergs metode etter at fisken hadde gått ved 17 °C i 9 uker etter vaksinerings. Fisk som kun hadde fått adjuvant viste svært lave Speilberg skår, mens gruppen som hadde fått adjuvant med antigen viste en skår som i gjennomsnitt har rundt fem ganger høyere.

**Adjuvanter påvirker både effekt og bivirkningsprofil for vaksinen**

Vaksinene som benyttes til laks i dag og som inneholder en eller annen adjuvant gir alle en viss grad av bivirkninger der sammenvoksninger i bukhulen er det som hyppigst observeres. Adjuvanter i seg selv gir som regel ingen eller kun en svært lav grad av slike bivirkninger (Fig. 3).

Som nevnt finnes det i dag en lang rekke forbindelser som er vist å virke som adjuvanter i vaksiner. For en og samme antigensammensetning vil disse gi forskjellig grad av både beskyttelse og bivirkninger. I tillegg kan små variasjoner i ett og samme adjuvantsystem også påvirke effekt og bieffekt. I en serie forsøk har vi testet en og samme antigenkombinasjon som representerer en kombinasjon vanlig brukt til laks i dag, med en rekke forskjellige adjuvantsystemer. Presmolt på 30 - 40 gram har blitt vaksinert med disse testvaksinene og etter 6 - 7 uker er fisken så blitt smittet med *Aeromonas salmonicida* som er en av bakteriene vaksinene gir beskyttelse mot. En annen parallell gruppe med fisk er undersøkt for bivirkninger 11 - 12 uker etter vaksinerings. Som en ser av Fig. 4 induserer de forskjellige adjuvantsystemene svært ulik grad av så vel beskyttelse som bivirkninger. Generelt ser en at vann-i-olje emulsjonsystemer gir den beste beskyttelsen. Videre er det en tendens til at adjuvanter som induserer god beskyttelse også fører til høyere grad av bivirkninger.

<sup>1</sup> Relativ Prosent overlevelse (engelsk: Survival) =  $\left(1 - \frac{\% \text{ død i vaksinert gruppe}}{\% \text{ død i uvaksinert gruppe}}\right) * 100$

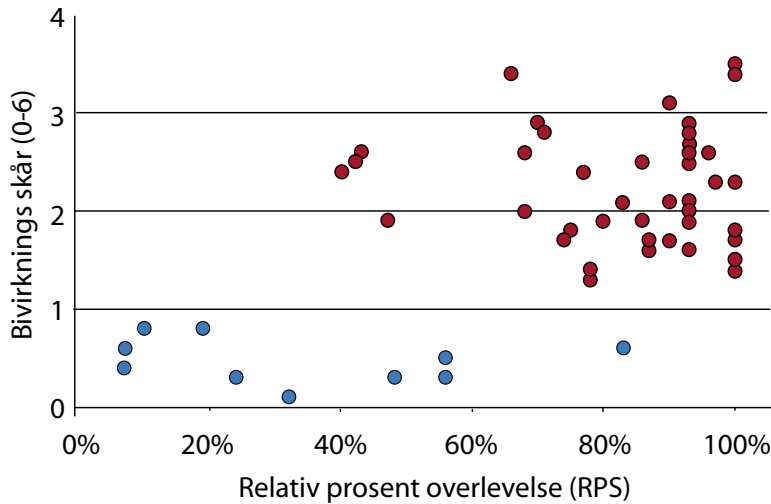


Fig. 4. **Vann-i-olje emulsjoner gir høyere beskyttelse og høyere grad av bivirkninger enn mer vannholdige adjuvantsystemer**

I en serie forsøk ble laks vaksinert med flerkomponent vaksiner som alle inneholdt den samme antigen sammensetningen men forskjellige adjuvantsystemer. Seks til syv uker etter vaksinering ble fisken smittet med *Aeromonas salmonicida*. Dødelighet ble registrert i rundt 21 dager og relativ prosent overlevelse (RPS) ved slutt beregnet. Fisk vaksinert med de samme vaksinerne ble evaluert for bivirkninger (Speilberg skår) etter at fisken hadde gått 11 - 12 uker ved 12 °C. Hvert punkt i kurven representerer en bestemt testvaksine. Vaksiner med adjuvantsystemer basert på vann-i-olje emulsjoner er vist med rødlige symboler, mens vaksiner med andre adjuvantsystemer er markert med blå symboler.

### Vann-i-olje emulsjoner dominerer for fiskevaksiner i dag

De fleste vaksiner som brukes til fisk i dag benytter adjuvantsystemer basert på vann-i-olje emulsjoner. Disse består av små vanndråper i en kontinuerlig olje-fase (Fig. 5). Slike emulsjoner er i seg selv ustabile og etter kort tid vil vanndråpene gå sammen og danne en kontinuerlig vannfase som vil samle seg nederst i vaksineflasken, mens oljen vil utgjøre den andre fasen som vil legge seg oppå vannfasen. For å stabilisere slike emulsjoner tilsettes det derfor alltid en eller annen detergent. Dette er små molekyler som har en vannløslig (hydrofil) del ("hode") og en fettløslig (lipofil) del ("hale"). Detergenten gjør at slike emulsjoner kan holde seg stabile i flere år. I vaksiner av vann-i-olje emulsjonstypen vil antigenene som i stor grad er vannløslige, ligge inni vanndråpene. Dette gjør at antigenene kun sakte frigjøres fra vaksinen, og denne depoteffekten er en viktig egenskap for denne type adjuvanter. Her oppnår en at fiskens immunsystem eksponeres for små mengder antigen over en lang tid, etter hvert som antigenet frigjøres av vaksinen. I tillegg vil adjuvanten øke tilstrømningen av celler fra fiskens immunsystem slik at disse kommer i kontakt med antigenet i vaksinen og dermed setter i gang en kaskade av reaksjoner som medvirker til å gi beskyttelse hos fisken.

Hvor god beskyttelse og hvilken bivirkningsprofil en vaksine med et vann-i-olje adjuvantsystem gir for et bestemt antigen påvirkes blant annet av hvilken olje som benyttes, forholdet mellom mengde vann og mengde olje i vaksinen, hvilke detergent(er) som benyttes, og mengden av disse. Også størrelsen på vanndråpene er med på å bestemme både effekt og bivirkningsgrad. Dette siste kan man variere ut i fra hvor kraftig man blander eller "pisker" emulsjonen under fremstillingen av vaksinen.

Olje-i-vann emulsjoner kan også benyttes som adjuvant i vaksiner (Fig. 5). Antigenet, som nå ligger i den kontinuerlige ytre vannfasen, vil her frigjøres mye raskere enn hva som er tilfellet for vann-i-olje emulsjoner, og i tråd med dette vil slike adjuvantsystemer stort sett gi mindre beskyttelse med kortere varighet.

Det er også mulig å lage såkalte vann-i-olje-i-vann emulsjoner. Slike dobbeltemulsjoner består av små vanndråper inni større oljedråper, som så er spredd i en kontinuerlig vannfase. Teoretisk sett er slike dobbeltemulsjoner svært attraktive som adjuvantsystemer da en her kan tenke seg at antigener som krever sterk adjuvant kunne plasseres i de små vanndråpene inni oljedråpene, mens antigener som kan klare seg med svakere adjuvant kunne plasseres i den ytterste vannfasen. Slike dobbeltemulsjoner er fortsatt på det eksperimentelle stadiet når det gjelder brukt som adjuvant i vaksiner.

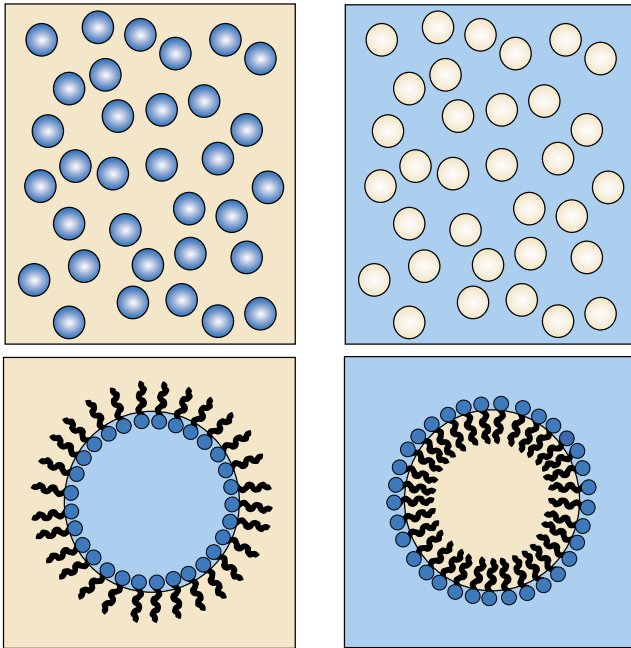


Fig. 5.

**Vann-i-olje og olje-i-vann emulsjoner**

Vann-i-olje emulsjoner består av små vanddråper i en kontinuerlig oljefase (venstre panel). Detergenten som benyttes vil ha sitt hydrofile "hode" inne i vanddråpen, mens dets lipofile "hale" stikker ut av vanddråpen og derved gjør dens overflate lipofil. For olje-i-vann emulsjoner (høyre panel) er dette bildet snudd, slik at oljedråpene får en hydrofil overflate som gjør at dråpene vil kunne holde seg dispergert i vannfasen i lengre tid.

### Fremtidens adjuvanter?

I utforskning av nye adjuvanter til vaksiner benyttes vanligvis dyr der en har kommet langt i kartleggingen av dets immunsystem, atskillig lengre enn det som er tilfellet for fisk i dag. Tidligere hadde enkelte en ide om at en skulle klare å finne fram til "den ideelle adjuvant" som skulle kunne benyttes for alle antigener og til ulike dyr. Men etter hvert som vår kunnskap om immunsystemet har økt, er det blitt klart at en slik universell adjuvant ikke er mulig å finne. Forskjellige typer antigen vil kreve forskjellige adjuvanter, og dette må igjen tilpasses til det dyret vaksinen skal benyttes til. Forskning på hvordan adjuvanter virker og identifisering av nye mulige kandidater er et aktivt felt som vil bidra til at vi får bedre vaksiner i fremtiden. I de nærmeste årene er det imidlertid grunn til å tro at adjuvanter basert på vann-i-olje emulsjoner fortsatt vil dominere for injeksjonsvaksiner til fisk. Videreutvikling av denne type adjuvantsystemer vil fortsette og kan bidra til at vi får bedre fiskevaksiner som gir tilstrekkelig beskyttelse og mildere bivirkningsprofiler.