



Uit

**NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET**

Det helsevitenskapelige fakultet

Sammenligning av cytokinmålinger med ELISA og multiplex ved eksperimentell sepsis hos gris

Nora Lamark Ueland

Masteroppgave i medisin profesjonsstudium (MED-3950)

Veileder: Espen Waage Skjeflo

Biveileder: Tom Eirik Mollnes



Forord

Oppgaven er skrevet i forbindelse med masteroppgave for profesjonsstudium i medisin (MED-3950). Formålet med oppgaven var å se på hvilken metode som er mest sensitiv for å kvantifisere cytokiner i plasma og vev fra gris ved bruk av ELISA og multiplex. Det finnes mange studier med kvantifisering av biologiske komponenter, inkludert cytokiner målt hos gris, hvor man har basert seg på bruk av enten ELISA eller multiplexteknikker. Vi er ikke kjent med at disse to teknikkene tidligere har vært systematisk sammenlignet, selv om data fra ulike studier kan tyde på at sensitiviteten ved disse teknikkene er ulike. Spørsmålet vi stilte oss var følgelig om disse to analysemetodene er like sensitive og vil gi samme svar for ulike cytokiner hos gris.

Jeg har lenge vært veldig interessert i immunologi, da dette er et veldig spennende og utfordrende fagfelt. Oppgjennom studietiden har jeg blitt forelest mye i hvor stor rolle cytokiner har i en immunrespons. Økt bakgrunnskunnskap vil kunne gi bedre alternativ for behandling ved flere kliniske tilstander – eksempelvis ved sepsis. Innenfor forskning har det spesielt blitt mer fokus på forholdet mellom økte cytokin nivåer og patogenesen for en rekke sykdommer.

Arbeidet med oppgaven har vært lærerikt. Jeg vil først og fremst rette en stor takk til mine veiledere Espen Waage Skjeflo og Tom Eirik Mollnes som introduserte meg for en spennende problemstilling og prosjekt våren 2018. Jeg har fått veldig god hjelp og mange gode råd under våre veiledersamtaler. Spesielt takk til min hovedveileder Espen som har lagt inn mye tid for veiledning, med jevnlig mailkorrespondanser og møter for spørsmål og diskusjon. Jeg ønsker samtidig å takke bioingeniør Judith Anita Ludviksen som har hjulpet meg med utførelsen av laboratorieanalysene. Til slutt vil jeg takke min kjære familie som har støttet meg og tilrettelagt for meg gjennom masterperioden. Spesielt takk til min storebror, André for korrekturlesing.



01.06.2019

Nora Lamark Ueland.

Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i>	<i>I</i>
<i>Sammendrag</i>	<i>IV</i>
<i>1 Innledning</i>	<i>1</i>
1.1 Inflammasjon	1
1.2 Cytokiner	2
1.3 Analysemetoder	3
1.4 Formål	4
<i>2 Materiale og metode</i>	<i>5</i>
2.1 Cytokinanalyser	5
2.2 Statistiske analyser	5
<i>3 Resultater</i>	<i>6</i>
3.1 Plasmaprøver	6
3.2 Vevsprøver	7
3.3 Bland-Altman plot for plasmaprøver	8
<i>4 Diskusjon</i>	<i>9</i>
4.1 Viktigste funn	9
4.2 ELISA vs. multiplex	10
4.3 Styrker og svakheter	11
<i>5 Konklusjon</i>	<i>13</i>
<i>6 Referanser</i>	<i>14</i>
<i>7 Tabeller og figurer</i>	<i>16</i>
<i>9 Sammendrag av kunnskapsevalueringer</i>	<i>34</i>

Sammendrag

Inflammasjon er immunsystemets respons på skadelige stimuli. Cytokiner er nøkkelkomponenter i responsen og identifisering og kvantifisering av cytokiner gir viktig informasjon om inflammasjonsstatus. I studien undersøkte vi plasmaprøver fra 24 gris tatt 15 minutter før og ved start av intravenøs infusjon av *Neisseria meningitidis*. Deretter ble prøver tatt etter 60, 120, 180 og 240 minutter under utvikling av gramnegativ sepsis. To kontrollgriser uten bakterier ble inkludert. Videre undersøkte vi homogeniserte vevsbiopsier tatt *post mortem*. 5 sentrale cytokiner: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 og TNF ble målt og formålet med oppgaven var å sammenligne to multiplexkit med ELISA. Data ble analysert i GraphPad Prism, ved bruk av variansanalyse (ANOVA) og vha. Bland-Altman's plots.

Plasmaprøver viste følgende:

- IL-8: 13-plex mest sensitiv, ELISA moderat og 9-plex ikke påvisbar.
- IL-6: ELISA mest sensitiv, 13-plex knapt påvisbar og 9-plex ikke påvisbar.
- TNF: ELISA mest sensitiv, 9-plex og 13-plex knapt påvisbar.
- IL-1 β : 13-plex og ELISA mest sensitiv, 9-plex ikke påvisbar.
- IL-10: 9-plex med stigning i forløpet, 13-plex og ELISA uten endring.

Vevsprøvene viste følgende:

- IL-6 og IL-8: 13-plex klart mest sensitiv i alle organer.
- IL-10: 9-plex var mest sensitiv i alle organer.
- TNF og IL-1 β : ELISA var generelt mest sensitiv.

Bland-Altman's plot viste at ELISA generelt ga høyere verdier enn 13-plex for plasmaprøver og at differansen økte ved økende cytokinkonentrasjon.

Vi konkluderte at det er en vesentlig forskjell på hvilken analysemetode man bruker for kvantifisering av cytokiner hos gris. ELISA og 13-plex var generelt mer sensitive enn 9-plex. Resultatene har betydning for valg og tolkning av cytokinverdier i fremtidige forsøk med gris. Med de leverandørene vi bruke, kan ELISA anbefales for plasma IL-6, TNF og IL-1 β , og for vev TNF og IL-1 β . 13-plex kan anbefales for plasma IL-8 og IL-1 β og for vev IL-6 og IL-8. 9-plex kan anbefales for både plasma og vev IL-10.

1 Innledning

1.1 Inflammasjon

Inflammasjon er immunsystemets respons på skadelige stimuli som utgjør en fare for organismen. Slike stimuli kan for eksempel være vevsskade, frie radikaler eller fremmede mikroorganismer. Immunsystemets hovedmål er å gjenkjenne og fjerne skadelig stimuli og deretter starte tilhelingen, som vi kaller betennelsesprosessen. Immunsystemet er spesialisert på å gjenkjenne et rikt antall fremmede mikroorganismer, samtidig som det skal unngå å angripe kroppens egne celler. Systemet inneholder et førstelinjeforsvar, det medfødte immunforsvaret og et andrelinjeforsvar, det adaptive immunforsvaret. Det medfødte forsvaret endrer seg lite i løpet av livet, i motsetning til det adaptive. En annen viktig forskjell er at det medfødte immunforsvaret har evnen til å reagere raskt og kommer til uavhengig av hvilken type fare det er snakk om. I noen tilfeller er faren større enn det førstelinjeforsvaret klarer å håndtere, og rekrutteringen fra det adaptive forsvaret trer inn, hovedsakelig bestående av lymfocytter og deres antistoffer. Dette systemet er helt avhengig av aktivering fra det medfødte immunsystemet. Lymfocytter har en lang responstid på dager, fordi B- og T-celler må igjennom klonal seleksjon og proliferasjon slik at de er spesialiserte for akkurat en type mikroorganisme. Klonal seleksjon gir en gevinst- immunologisk minne, som betyr at systemet vil reagere hurtigere og med større stagkraft ved påfølgende infeksjoner med samme patogen (1–3).

Patogener som bryter den fysiske barrieren, vil raskt blir gjenkjent av førstelinjeforsvaret. Ute i vevet ligger stasjonære makrofager. Deres oppgave er å gjenkjenne og fagocyttere fremmede mikroorganismer. Gjenkjennelsen skjer ved at evolusjonært konserverte mønstergjenkjennende reseptorer, pattern recognition receptors (PRRs), eksempelvis Toll-like reseptorer (TLR), som gjenkjenner strukturer fra eksterne farer, slik som patogener (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) eller fra endogene strukturer presentert pga, stress, skadede celler og/eller malfunksjon i vevet (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Effektorceller som uttrykker TLR er monocytter, makrofager og nøytrofile granulocytter i det medfødte immunforsvaret. Disse blir da aktiverte og vil starte med å produsere inflammatoriske mediatorer, slik som cytokiner som induserer den inflammatoriske responsen (4). Dette er første fase av betennelsesprosessen.

Videre vil dette føre til aktivering av kaskadesystemene: komplementsystemet, koagulasjonssystemet, det fibrinolytiske systemet, og kinin-kallkreinsystemet, samt kjemoaxi av leukocytter fra den generelle sirkulasjonen (5). Disse er viktige bidragsytere for betennelsesprosessens 3 faser; gjenkjenning av faren, eliminasjon av fremmed mikroorganisme og det skade vevet og til slutt reparasjon av vevsskaden. Inflammasjon i det infiserte vevet karakteriseres av vasodilatasjon av blodårer (rubor), og dermed varme (calor), ødemdannelse på grunn av lekkasje fra kapillærer (tumor) og smerte fra blant annet cytokiner (dolor) (6). Lokalt er disse responsene velregulerte slik at man får minst mulig skade og raskt gjenoppretter homeostase. Sluttresultatet vil da bli vevsreparasjon og helbredelse (7).

1.2 Cytokiner

Cytokiner er nøkkelkomponenter i immunresponsen. Disse er løselige signalmolekyler, som har autokrine og parakrine funksjoner (8). Proteinene har en viktig rolle i inter- og intracellulær signalering. Når de binder til spesifikke reseptorer skjer det en kaskade av signaler inne i cellen, som fører til en endring av genuttrykket. Dette kan resultere i vekst, celledød og differensiering av cellen selv eller ved påvirkning av andre celler. Hovedfunksjonen er å alarmere spesielt de stasjonære makrofagene i vevet, samt andre immunceller i blodbanen til å bli med i bekjempelsen av inflammasjonen. Cytokinene blir som kommunikasjonsnettverket til immunsystemet (7). Med begrepet nøkkelkomponent, menes at cytokinene står for koordinasjon av immuncellene, forsterkning av inflammasjonen og immunmodulering (9).

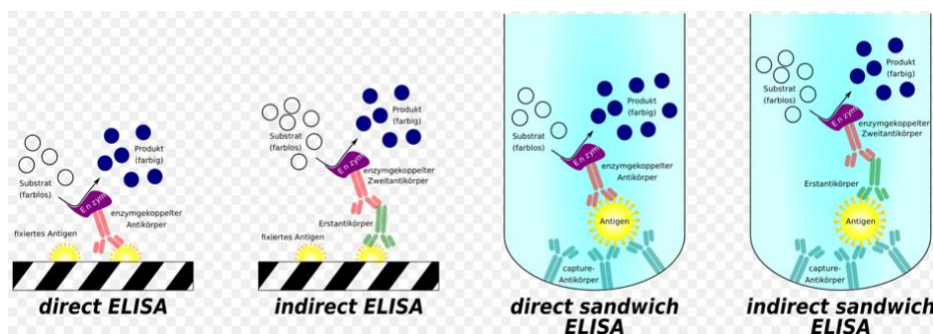
Grovt kan cytokiner deles inn etter struktur og funksjon, hvor man har interleukiner (IL), interferoner (INF), tumor nekrose faktor (TNF), vekstfaktorer og kjemokiner (9). Cytokiner kan være proinflammatoriske, slik som IL-1 β , IL-6 og TNF eller antiinflammatoriske, slik som IL-4, IL-10 og INF- γ . De proinflammatoriske cytokinene står for rekruttering av immunceller, dermed økt aktivering av første steg i en inflammasjon som er eliminering av faren. De antiinflammatoriske cytokinene er med på å modulere og/eller dempe inflammasjonen. Balansen mellom pro- og antiinflammatoriske cytokiner regulerer den inflammatoriske prosessen. Hvis det skjer en overdrevet produksjon kan dette føre til vevsskade, hemodynamiske endringer, organdysfunksjon og til slutt død (6). Et typisk eksempel på dette er sepsis. Sepsis er definert som et livstruende syndrom med organdysfunksjon på grunn av en dysregulert immunrespons med en antatt «cytokinstorm» i

den tidlige fasen (10). Denne overdrevne responsen vil blant annet forårsake endotelskade og generelt det kliniske bilde av systemisk inflammatorisk responsyndrom (SIRS). I alvorlige tilfeller kan det også overaktivere den hemostatiske komponenten av det medfødte immunsystemet og gi disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC), flerorgansvikt og hemodynamisk kollaps til følge (11). Septisk sjokk har en dødelighet opp mot 40% (12).

1.3 Analysemetoder

1.3.1 ELISA

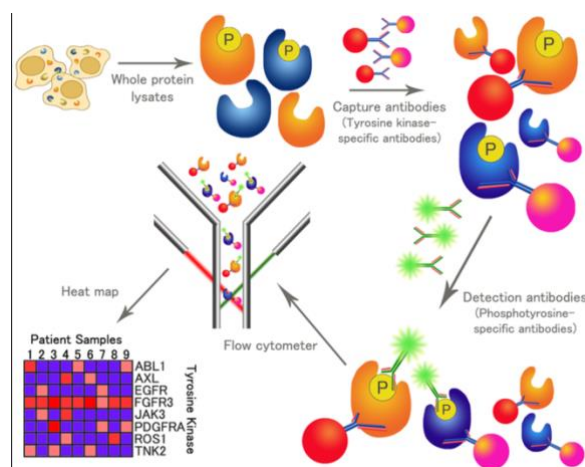
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ble introdusert tidlig på 1970-tallet (13). ELISA er en standardisert metode for å detektere og kvantifisere cytokiner. Denne metoden er mest validert og betraktes som gullstandard innenfor klinisk- og biokjemiskforskning. ELISA brukes for å detektere ett spesifikt cytokin av gangen. Analysemetoden inneholder en brønn kledd av et antistoff som binder til det bestemte cytokinet. Deretter tilsetter man en prøve, som for eksempel i dette arbeide er plasma- eller vevs-prøver fra gris, for å se om prøven inneholder det spesifikke cytokinet man er på utkikk etter. Videre inkuberer og vasker man brønnen, og tilsetter et deteksjonsantistoff som binder på en annen epitop av cytokinet. Dette kan være enzym-merket, og ved å se på enzymaktiviteten, blir det tilsatt et enzymsubstrat med farge. Enzymaktiviteten blir målt ved å måle hvor mye farge som dannes fra substrat. Dette avleses vha. et spektrofotometer. Får man farge, har man fått ett positiv svar som betyr binding til cytokinet. Intensiteten av fargen viser til mengde antistoff som er bundet og kvantifiseres relativt til en kjent kontrollprøve/standard. (14).



Figur 1. Illustrasjon av ELISA. Hentet fra wikimedia. (15). Den varianten vi har brukt til måling av cytokinene er den som er merket «direct sandwich ELISA».

1.3.2 Multiplex

En rekke ulike cytokiner, med delvis overlappende biologisk effekt, er involvert i dannelsen av en immunrespons. Multiplex gjør det mulig å kvantifisere flere cytokiner samtidig, i samme prøve. Brønnen inneholder magnetiske kuler «beads» med egen fargeidentitet. Disse kulene er kovalent bundet til et spesifikt antistoff. Antistoffet vil i sin tur binde til sitt respektive cytokin. Kulene avgir lys ved en spesifikk bølgelengde, hvor man kan adskille bølgelengdene ved hjelp av et flowcytometer. Ut fra hvilke lysutslag man får, kan man bestemme hva slags cytokin det tilsvarer. Fargekodene blir som adresselapper. I neste steg tilsetter man deteksjonsantistoffer som kan kvantifisere mengden analytt som er på hver enkelt av kule-populasjonene, som da representerer hvert sitt cytokin (16).



Figur 2. Illustrasjon av multiplex, som beskrevet. Kilden er hentet fra wikimedia (17). Vi har i dette arbeidet brukt to multiplex kit som kvantiterer hhv. 9 og 13 cytokiner i samme brønn.

1.4 Formål

Identifisering og kvantifisering av cytokiner gir viktig informasjon om inflammasjonsstatus. En slik kjennskap til inflammasjonsstatus kan gi en bedre kartlegging og potensielt bedret behandling av inflammatoriske sykdommer. De sirkulerende nivåene av cytokiner er oftest ganske lave, dette er fordi de er potente med stor biologisk aktivitet. Kvantifisering må derfor være så nøyaktig som mulig og krever en metode med høy sensitivitet og spesifisitet. Formålet med oppgaven er å se på hvilken av metodene ELISA, 9- og 13-plex som er mest sensitiv for å kvantifisere cytokiner i plasma og vev. Dette gjøres gjennom grafisk og statistisk sammenligning. Spørsmålet er om metodene er like gode eller om de gir forskjellige mål på samme prøve. Da ELISA er den mest etablerte metoden, vil resultatene fra ELISA være referansen som multiplex sammenlignes med.

2 Materiale og metode

Tallmaterialet som er brukt i laboratoriearbeidet ble hentet fra analyser gjort på immunologisk forskningslaboratorium ved Nordlandssykehuset i Bodø. Det biologiske materialet var fra 24 gris påført gramnegativ sepsis gjennom intravenøs infusjon av *Neisseria meningitidis* samt 2 kontrollgris, som beskrevet i Hellerud et al (18). Tallmaterialet omfatter cytokinsvar fra blodprøver ved 15 minutter før og ved infusjonsstart av bakterier, samt etter 60, 120, 180 og 240 minutter samt homogeniserte vevsbiopsier fra nyre, lever, venstre lunge, venstre ventrikkel, høyre ventrikkel og milt ble tatt *post mortem*.

2.1 Cytokinanalyser

Plasma- og vevsprøver ble analysert med enten en kommersielt tilgjengelige ELISA-kits (R&D System, Minneapolis, MN, USA) eller 2 forskjellige multiplex på Luminex-plattformen, hhv. 13-plex (EMD, Milipore, Billerica, MA, USA) og 9-plex (eBioscience, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific inc). Analysene er utført etter produsentens instruksjoner og avlest på mikroplate for ELISA og Bio-plex 200, X-Mapteknologi for multiplexene. Det ble fokusert på 5 sentrale cytokiner: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 og TNF. Disse 5 ble kjørt i separate ELISA-kits og samtlige 5 cytokiner inngikk i de to multiplex-kitene. Prøver som gikk over øverste standard ble satt til «upper detection limit», UDL.

2.2 Statistiske analyser

Dataene fra ELISA, 9- og 13-plex ble først samlet inn i Microsoft Excel. De statistiske analysene ble utført i GraphPad Prism versjon 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Vevsprøvene ble analysert med en-veis variansanalyse (ANOVA) med Tukeys post hoc-test. Der dataene ikke passerte programvarens test for normalfordeling, ble det gjort en ikke-parametrisk Friedmans post hoc-test. Plasmaprøvene ble analysert med to-veis ANOVA. $P < 0,05$ ble antatt som statistisk signifikant. Sist ble forskjeller mellom analysemetoder vurdert i et Bland-Altman plot der differansen av to metoder ble plottet mot gjennomsnittet av de to metodene. Alle data er representert grafisk med gjennomsnitt og 95% konfidensintervall.

3 Resultater

3.1 Plasmaprøver

ELISA og 13-plex viste sammenlignbare resultater mens 9-plex kun detekterte lave cytokinnivå. Generelt kan man se at infiserte griser fremviste høye verdier av alle 5 cytokiner etter 60 minutter. TNF-nivåene toppet seg etter 60 minutter mens IL-1 β , IL-6 og IL-8 steg utover i forløpet. De statistiske sammenligningene er også gjengitt i tabellene 1-5.

3.1.1 IL-8

IL-8 analysert ved 13-plex steg mest i konsentrasjon over tid, fra en gjennomsnittskonsentrasjon på 235 pg/ml ved -15 minutter til en gjennomsnittskonsentrasjon på 39615 pg/ml ved 180 minutter (fig. 3).

3.1.2 IL-6

ELISA detekterte mest IL-6, som steg fra 23 pg/ml til 34525 pg/ml mot 139 pg/ml til 7544 pg/ml for 13-plex og 6 pg/ml til 1051 pg/ml for 9-plex (fig. 4).

3.1.3 IL-10

IL-10 hadde ingen endring gjennom forløpet for ELISA og 13-plex, men de to analysemetodene lå på helt forskjellige grunnlinjer, hhv. gjennomsnittskonsentrasjonen for ELISA på 83 pg/ml og 1091 pg/ml for 13-plex (fig. 5). IL-10 analysert ved 9-plex, derimot, steg utover i forløpet, fra verdier med nivå av det ELISA detekterte, til nivå av det 13-plex detekterte.

3.1.4 IL-1 β

Forløpet for IL-1 β var svært likt som IL-6, både for ELISA og 13-plex, der nivået steg fra 5 pg/ml til 13875 pg/ml for ELISA og fra 263 pg/ml til 16660 pg/ml for 13-plex (fig. 6).

3.1.5 TNF

TNF var høyest for ELISA, og da med størst forskjell etter 60 min (1352 pg/ml for 13-plex, 6115 pg/ml for ELISA og 1975 pg/ml for 9-plex. Ut forsøket lå gjennomsnittskonsentrasjonen på 18457 pg/ml ved eutanasi for ELISA mot 3276 pg/ml for 13-plex og 5004 pg/ml for 9-plex) (fig. 7). På tross av ulike kvantitative mål økte cytokinnivåene proporsjonalt for ELISA og 13-plex.

3.2 Vevsprøver

Det var totalt 26 griser hvor det ble tatt biopsier fra nyre, lever, venstre lunge, venstre ventrikkel, høyre ventrikkel og milt.

3.2.1 IL-8:

For IL-8 ga 13-plex høyere gjennomsnittlige verdier (41504 pg/ml), enn for 9-plex (2054 pg/ml) og ELISA (5602 pg/ml) (figur 8). I nivåene fra hvert organ vurdert enkeltvis var det klare signifikante forskjeller mellom ELISA og 13-plex, bortsett fra IL-8 i lever, og ikke-signifikante forskjeller mellom ELISA og 9-plex, bortsett fra IL-8 i milt (tabell 6).

3.2.2 IL-6:

IL-6 fulgte det samme mønstret med høyest gjennomsnittlige verdier for 13-plex (5085 pg/ml). Tilsvarende for 9-plex var 1462 pg/ml og 2151 pg/ml for ELISA (figur 9). Det var ikke-signifikante forskjeller mellom ELISA og 9-plex, og signifikante forskjeller mellom ELISA og 13-plex og mellom 9-plex og 13-plex (tabell 7).

3.2.3 IL-10:

Gjennomsnittskonsentrasjonen for alle vevsprøvene var 248 pg/ml for 9-plex, 104 pg/ml for 13-plex og 16 pg/ml for ELISA (figur 10). For hvert organ var også nivåene målt med 9-plex signifikant høyere enn ELISA og 13-plex (tabell 8).

3.2.4 IL-1 β :

Sammenlagt for alle seks vevsprøver var det ELISA som ga høyest gjennomsnittsverdi av IL-1 β (19799 pg/ml), tilsvarende verdier for 13-plex var 10248 pg/ml og 1795 pg/ml for 9-plex (Fig. 11). Bortsett fra at 13-plex ga størst gjennomsnittsverdi for IL-1 β i hjertet- og miltbiopsiene ga også ELISA høyeste verdier i øvrige organer. Videre målte ELISA konsistent og signifikant høyere nivå av IL-1 β sammenlignet med 9-plex (tabell 9).

3.2.5 TNF:

Sammenlagt for alle seks vevsprøver var det ELISA som ga høyest gjennomsnittsverdi av IL-TNF (5470 pg/ml). Tilsvarende verdier for 13-plex var 697 pg/ml for og 862 pg/ml for 9-plex. ELISA var også mest sensitiv for TNF i alle biopsier (figur 12). Videre målte ELISA konsistent og signifikant høyere nivå av TNF sammenlignet med både 9-plex og 13-plex

(tabell 10). Nivåforskjellene av TNF fra de tre målemetodene av nyrebiopsiene var ikke-signifikante.

3.3 Bland-Altman plot for plasmaprøver

Ettersom ELISA og 13-plex i blodprøvene fulgte hverandre over tid ble de fremstilt videre i et Bland-Altman plot. Her viste det seg at differansen mellom ELISA og 13-plex øker mye med økende konsentrasjon av cytokin, der ELISA ga proporsjonalt høyere verdi enn 13-plex med positiv skjevhet for IL-8 (7414 pg/ml), IL-6 (8163 pg/ml) og TNF (19825 pg/ml). 13-plex ga høyere verdier enn ELISA for IL-10 (skjevhet -1008 pg/ml) mens bildet var mer nyansert for IL-1 β der skjevheten lå i favør 13-plex for lave verdier og så svingte ved høye cytokinnivåer, noe som ga (-1387 pg/ml) i skjevhet totalt (figur 13).

4 Diskusjon

4.1 Viktigste funn

Den overordnede null hypotesen for masteren var at det ikke er forskjell mellom de tre ulike analysemetodene, ELISA, 9-plex og 13-plex. Ut fra våre resultater ser man i stor grad diskrepans i kvantiseringen både i plasma- og vevsprøvene. Resultatene får en betydning for valg av metode når cytokiner fra gris skal kvantiteres.

I vev rapporterer 13-plex større mengde IL-8 og IL-6, mens 9-plex gir høyere verdier for det antiinflammatoriske cytokinet IL-10. Forskjellene her er så store og slående at valg av metode vil være helt avgjørende for tolkning av fremtidige biopsiresultater. ELISA, som er mest brukt tidligere, gir høyeste verdier for TNF og IL-1 β i forhold til de andre analysemetodene. Forskjellene synes å være avhengig av hva slags cytokin som kvantifiseres, og ikke hvilken vevstype.

For plasmaprøvene kan man se et noe bedre samsvar mellom ELISA og 13-plex, men forskjellene er også klare her. Generelt fremviste infiserte griser høye verdier av alle fem cytokiner etter 60 minutter med eksperimentell meningokokksepsis.

13-plex ga solid stigning for IL-8, IL-10 og IL-1 β . Men for IL-1 β var det godt samsvar mellom resultatene fra 13-plex og ELISA. ELISA fanget opp større konsentrasjoner av TNF og IL-6, men 13-plex fulgte et svært likt forløp. 9-plex detekterte tilsynelatende svært lite cytokin sammenlignet med de to øvrige metodene. Men av spesiell interesse er at 9-plex var den eneste metoden som viste en sikker IL-10- stigning både i vev og plasma. I plasma var utgangsverdiene veldig ulike i de tre metodene, mens det var kun 9-plex som viste et pent stigende mønster utover sepsisforløpet (fig.5), noe som derfor tenkes å reflektere patofysiologi.

Spørsmålet som man kan stille seg, er om man faktisk detekterer det cytokinet man er på utkikk etter med de ulike teknikkene. Det vil si om metodene er valide og påviser det de utgir seg for å påvise. Kryssreaksjoner med andre cytokiner kan ikke utelukkes. Det ligger dog utenfor denne oppgaven og teste validiteten på de ulike metodene. Vi har brukt kommersielle kits, forutsatt at metoden detekterer det den er angitt å måle. Slike falske reaksjoner gjelder spesielt for multiplex, siden man kvantifiserer flere cytokiner i samme omgang. Dette er

spesielt interessant og viktig for vevsprøvene, der den store forskjellen i cytokinnivå mellom de tre metodene kan implisere falske negative, så vel som falske positive cytokinnivå i prøven. Imidlertid inkluderte vi 5 ulike organer i våre vevsanalyser. Det var generelt meget konsistente funn mellom organene for hver enkelt av analysene, noe som støtter de konklusjonene vi har kommet til når det gjelder sensitivitet for de ulike analysene for vev, selv om vi kun hadde en prøve fra hvert vev (*post mortem*).

For plasmaprøvene ser vi en klar tendens til at ELISA måler det kraftigste signalet ved samme stimuli. En feilkilde her kan være at multiplexene har for mye av det som kalles matrix-effekt (bakgrunnsstøy). Det vil si bindingen man er ute etter ikke kommer til uttrykk på grunn av en uspesifikk reaksjon i stedet. En slik reaksjon kommer fra andre proteiner som er i prøven og som likevel gir signaler. Dette kan for eksempel være proteiner som har lik struktur som det cytokinet man er ute etter, som der igjen gir binding til antistoffet, men ikke sekundæraktivering.

4.2 ELISA vs. multiplex

Kvantifisering av cytokiner er et voksende felt innenfor klinikk og laboratorieforskning. Nøyaktige målinger kan være til stor hjelp for diagnostikk og monitorering i en rekke sykdommer. duPont et al fant ut at multiplex (kit fra LINCOpex og Beadlyte ble analysert på Luminex plattformen) ga vesentlig likt resultat som ELISA ved analysering av 9 ulike cytokiner (19). Ut fra våre resultater ser man det motsatte, hvor det er signifikant forskjell på hvilken analysemetode man bruker. ELISA og multiplex har definitivt begge sine fordeler og ulemper. Prismessig kan begge komme ut omtrent på likt dersom man blander enkelt-plex og inkluderer kun de analytter man er interessert i. Våre resultater viser imidlertid at det er meget viktig å ta hensyn til de ulike metodenes sensitivitet til å detektere de ulike cytokinene, for da å kunne velge det beste kitet for hvert cytokin, enten det er snakk om ELISA eller multiplex. Vi begrenser også våre konklusjoner til å gjelde de aktuelle leverandører for de tre kitene vi testet. For multiplexene var det på det tidspunktet vi utførte analysene kun to kits på markedet (9- og 13-plex).

4.2.1 ELISA

Som tidligere nevnt kan ELISA detektere og kvantifisere kun étt cytokin om gangen. Man bruker et spektrofotometer som rapporteringssystem ettersom hvor mye fargekonsentrasjon substratet avgir. Ulemper ved bruk av ELISA er at det kan være tidskrevende, har lang

analysetid og høye kostnader, spesielt i form personellressurser, og ofte krever et stort prøvevolum. Som for andre immunoassays, multiplex inkludert, er at analysemetoden er avhengig av god kvalitet på antistoffet som skal binde til det bestemte cytokinet. Dette resulterer med at man ikke får et helhetsinntrykk på hele effektormekanismen som er relevant i en inflammatorisk respons. På den andre siden unngår man overlapping av den biologiske effekten av de ulike cytokinene, dermed ingen kryssreaksjon med andre cytokiner eller andre proteiner. En ytterligere fordel ved ELISA er det at resultatene viser god reproduserbarhet (14,16).

4.2.2 Multiplex

Multiplex kan detektere og kvantifisere flere cytokiner samtidig og bruker flowcytometri som rapporteringssystem. På grunn av det, er metoden godt egnet til å evaluere og kvantifisere komplekse immunresponser i en og samme prøve. Dermed kan man raskt få et oversiktsbilde av cytokinkonsentrasjonen ved komplekse, kliniske tilstander fordi det kreves en kortere analysetid og mindre prøvevolum (20). Ulempen er at multiplex er mindre utprøvd og følgelig at der mangler gode studier på dens sensitivitet og spesifisitet. Det er derfor viktig å ha god kunnskap om hvilke kryssreaksjoner som kan oppstå i prøvematerialet. Antistoffet som brukes for det bestemte cytokinet må også ha svært høy affinitet og spesifisitet (21,22).

4.3 Styrker og svakheter

For kommersielle kits kan man alltid stille spørsmålet om antistoffets spesifisitet og affinitet er godt nok, og om prosedyreoppskriften inkluderer prøvfortynningen. Dette ligger som sagt utfor vår oppgave å teste validiteten og vi må ta utgangspunkt i at kitene er pålitelig, da standardiseringen for cytokinene er godkjent av *National Institute of Biological Standards and Control*. Alle cytokinanalysene blir utført etter oppskriften fra produsenten. Smith et al (23) sammenlignet humane kit fra ulike leverandører for ELISA og multiplex, og konkluderte med at cytokinnivåene var sammenlignbare, uansett analysemetode, men at man får et mer valid svar om man bruker kit fra samme leverandør. Et slik studie har enda ikke blitt gjort på kit fra gris og kan derfor ikke trekke sterke konklusjoner fra det i forhold til denne oppgaven. Med forskjellene vi finner i denne oppgaven kan vi klart anbefale hvilke kits som kan brukes og ikke brukes til å kvantitere cytokiner fra gris. Dette er pga at vi avdekket betydelige relative forskjeller mellom prøvene. Den absolutte kvantiteten som rapporteres kan imidlertid være mer usikker, spesielt i biopsimaterialet, men det er for oss ingen overraskelse at ulike

kommersielle kits gir ulike absoluttverdier for ett og samme cytokin. To av cytokinene (IL-1 β og IL-8) ble analysert i serum for ELISA, dette er grunnet leverandøren anbefalte serum. Serum inneholder komponenter i koagulasjonssystemet og det fibrinolytiske systemet og øker risikoen for frigivelse av cytokiner fra blodceller under koaguleringen. Prabhakar et al fant imidlertid at presisjonen av multiplex er lik for serum eller plasma, men at nøyaktigheten for kvantifiseringen er mer avhengig av konsentrasjonen til cytokinet som blir analysert (21). Hennø et al har nylig publisert at EDTA-plasma er det mediet som gir lavest bakgrunn og minst interferens av antikoagulanter for måling av cytokiner, og har derfor anbefalt EDTA-plasma som standard (24). Alle cytokinene i alle assays i vår studie, unntatt disse to, ble målt i EDTA-plasma. Det gjenstår å se om EDTA-plasma gir samme resultat som serum for gris når det gjelder IL-1 β og IL-8.

Etter det vi vet er det ikke tidligere gjort direkte sammenligning av ELISA og multiplex hos gris, slik som i denne oppgaven. Vi har i tillegg sammenlignet disse to analysemetodene i én og samme prøve fra flere objekter fra en homogen studiepopulasjon. En annen styrke er at vi har fulgt objektene fra eksponering til et hardt endepunkt, hvor det blir tatt prøver før grisene fikk eksponering, under eksponering og *post mortem*. Det er også en styrke at studiet ble gjort på gris, som både anatomisk, immunologisk og fysiologisk er svært likt mennesket.

5 Konklusjon

Det var vesentlig forskjell på hvilken analysemetode man bruker for kvantifisering av cytokiner hos gris. Det er forskjell på plasma og vevsprøver mtp. sensitivitet for de ulike cytokinene. ELISA og 13-plex var generelt mer sensitive enn 9-plex. Resultatene har betydning for valg og tolkning av cytokinverdier i fremtidige forsøk med gris. Med de leverandørene vi brukte, kan ELISA anbefales for plasma IL-6, TNF, IL-1 β og for vev TNF og IL-1 β . 13-plex kan anbefales for plasma IL-8 og IL-1 β , og for vev IL-6 og IL-8. 9-plex kan anbefales for både plasma og vev for IL-10. Se tabell 11.

6 Referanser

1. Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Bull.* 2017 Feb 25;33(2):194–204.
2. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Principles of innate and adaptive immunity. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition [Internet]. 2001 [cited 2019 Apr 24]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27090/>
3. Willermain F, Rosenbaum JT, Bodaghi B, Rosenzweig HL, Childers S, Behrend T, et al. Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non infectious uveitis. *Prog Retin Eye Res.* 2012 Mar;31(2):182–94.
4. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation [Internet]. *Nature.* 2008 [cited 2018 Apr 5]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07201>
5. Marcel L. Disseminated Intravascular Coagulation. *The New England Journal of Medicine.* 1999;7.
6. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017 Dec 14;9(6):7204–18.
7. Parham, Peter. The immune system. Third edition. Garland Science; 2009. 58–59, 232 p.
8. Sompayrac LM. *How the Immune System Works, Includes Desktop Edition.* 4 edition. Wiley-Blackwell; 2012. 152 p.
9. Smith L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Medicine & Science in Sports & Exercise* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2019 Mar 21];32(2). Available from: insights.ovid.com
10. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017 Mar 1;43(3):304–77.
11. Matsumoto H. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. *SCientific RePOrTS.* 2018;11.
12. Mayr FB, Yende S, Angus DC. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2014 Jan 1;5(1):4–11.
13. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry.* 2005 Dec 1;51(12):2415–8.
14. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides.* 2015 Oct 1;72:4–15.

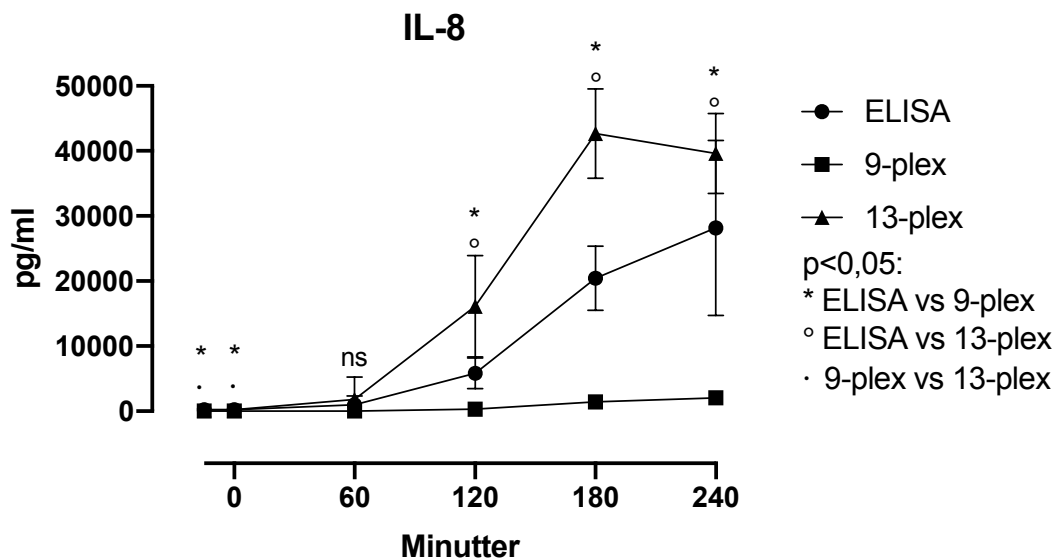
15. Jiver. Deutsch: Verschiedene ELISA-Varianten: direkter ELISA, indirekter ELISA, direkter Sandwich ELISA, indirekter Sandwich ELISA [Internet]. 2017 [cited 2019 May 24]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ELISA.svg>
16. Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA. ELISA AND MULTIPLEX TECHNOLOGIES FOR CYTOKINE MEASUREMENT IN INFLAMMATION AND AGING RESEARCH. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2008 Aug;63(8):879–84.
17. Yeung J. English: Workflow of Luminex immunosandwich assay. [Internet]. 2009 [cited 2019 May 24]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Workflow_IA.png
18. Hellerud BC, Orrem HL, Dybwik K, Pischke SE, Baratt-Due A, Castellheim A, et al. Combined inhibition of C5 and CD14 efficiently attenuated the inflammatory response in a porcine model of meningococcal sepsis. *Journal of Intensive Care*. 2017 Dec;5(1):21.
19. duPont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: Determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of Reproductive Immunology*. 2005 Aug 1;66(2):175–91.
20. Multiplex analysis of cytokines | British Society for Immunology [Internet]. [cited 2018 Apr 4]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/multiplex-analysis-cytokines>
21. Prabhakar U, Eirikis E, Reddy M, Silvestro E, Spitz S, Pendley C, et al. Validation and comparative analysis of a multiplexed assay for the simultaneous quantitative measurement of Th1/Th2 cytokines in human serum and human peripheral blood mononuclear cell culture supernatants. *J Immunol Methods*. 2004 Aug;291(1–2):27–38.
22. Elshal MF, McCoy JP. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to ELISA. *Methods*. 2006 Apr;38(4):317–23.
23. Khan SS, Smith MS, Reda D, Suffredini AF, McCoy JP. Multiplex bead array assays for detection of soluble cytokines: comparisons of sensitivity and quantitative values among kits from multiple manufacturers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004 Sep;61(1):35–9.
24. Hennø LT, Storjord E, Christiansen D, Bergseth G, Ludviksen JK, Fure H, et al. Effect of the anticoagulant, storage time and temperature of blood samples on the concentrations of 27 multiplex assayed cytokines - Consequences for defining reference values in healthy humans. 86-95 [Internet]. 2017 [cited 2019 May 1]; Available from: <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2494481>

7 Tabeller og figurer

Tabell 1. Oversikt over analysemetodene for IL-8 i plasma*. Det ble gjort en to-veis variansanalyse (ANOVA) for å se etter signifikante forskjeller mellom de tre analysemetodene. Gjennomsnittsverdi i pg/ml. *ELISA kjørt i serum.

Plasma	Tid	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	Sum N=156 (100%)
IL - 8	-15 min	Ja	Nei	Ja	N=26 (16,7%)
		Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,8156	Justert p-verdi: 0,0003	
	Gjennomsnittsverdi	236 vs 3	236 vs 199	3 vs 199	
	0 min	Ja	Nei	Ja	N=26 (16,7%)
		Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,9968	Justert p-verdi: 0,0003	
	Gjennomsnittsverdi	216 vs 1	216 vs 221	1 vs 211	
	60 min	Nei	Nei	Nei	N=26 (16,7%)
		Justert p-verdi: 0,3132	Justert p-verdi: 0,8961	Justert p-verdi: 0,5507	
	Gjennomsnittsverdi	1003 vs 37	1003 vs 1808	37 vs 1808	
	120 min	Ja	Ja	Ja	N=26 (16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0002	Justert p-verdi: 0,1036 0,0356	Justert p-verdi: 0,0558 0,0009	
	Gjennomsnittsverdi	5803 vs 312	5803 vs 16148	312 vs 16148	
180 min	Ja	Ja	Ja	N=26 (16,7%)	
	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001		
Gjennomsnittsverdi	20433 vs 1439	20433 vs 4662	1439 vs 4662		
240 min	Ja	Nei	Ja	N=26 (16,7%)	
	Justert p-verdi: 0,0014	Justert p-verdi: 0,2611	Justert p-verdi: <0,0001		
Gjennomsnittsverdi	28165 vs 25068	28165 vs 39615	25068 vs 39615		

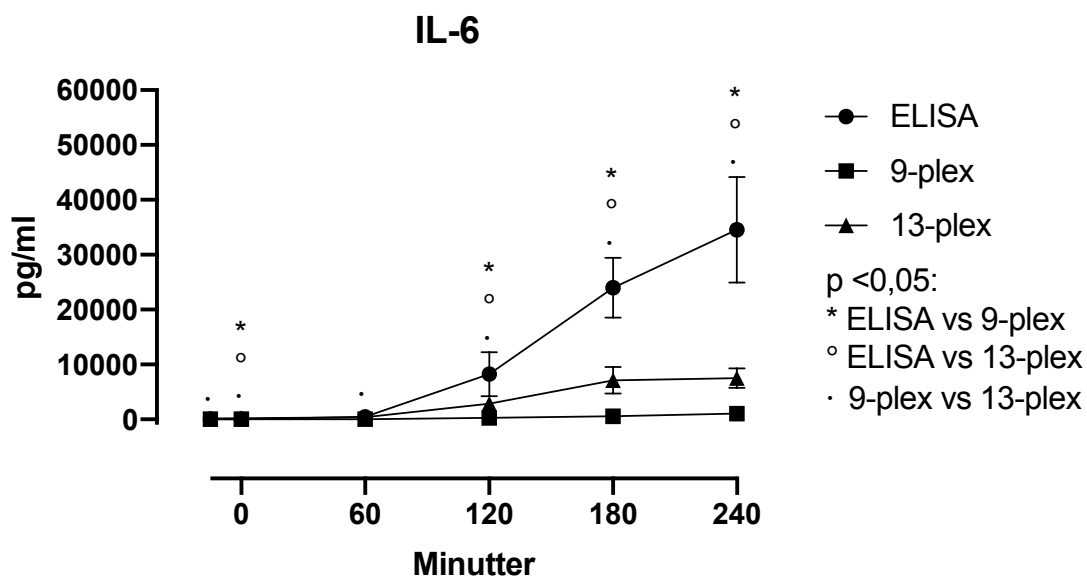
Figur 3. Grafisk framstilling av IL-8 i plasma*. Grafen viser gjennomsnitt med 95% konfidensintervall for de tre analysemetodene. *ELISA kjørt i serum.



Tabell 2. Oversikt over analysemetodene for IL-6 i plasma. Det ble gjort en to-veis variansanalyse (ANOVA) for å se etter signifikante forskjeller mellom de tre analysemetodene. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Plasma	Tid	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	Sum N=156 (100%)
IL - 6	-15 min	Nei	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,5111	Justert p-verdi: 0,0495	Justert p-verdi: 0,0173	
	Gjennomsnittsverdi	29 vs 6	29 vs 139	6 vs 139	
	0 min	Nei	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0765	Justert p-verdi: 0,0183	Justert p-verdi: 0,0044	
	Gjennomsnittsverdi	31 vs 4	31 vs 184	4 vs 184	
	60 min	Nei	Nei	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,3727	Justert p-verdi: 0,9774	Justert p-verdi: 0,0008	
	Gjennomsnittsverdi	456 vs 25	456 vs 390	25 vs 390	
	120 min	Ja	Ja	Ja	N=26(16,7%)
Justert p-verdi: 0,0011		Justert p-verdi: 0,0319	Justert p-verdi: <0,0001		
Gjennomsnittsverdi	8219 vs 283	8219 vs 2887	283 vs 2887		
180 min	Ja	Ja	Ja	N=26(16,7%)	
	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001		
Gjennomsnittsverdi	23984 vs 560	23984 vs 7117	560 vs 7117		
240 min	Ja	Ja	Ja	N=26(16,7%)	
	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001		
Gjennomsnittsverdi	34525 vs 1051	34525 vs 7544	1051 vs 1051		

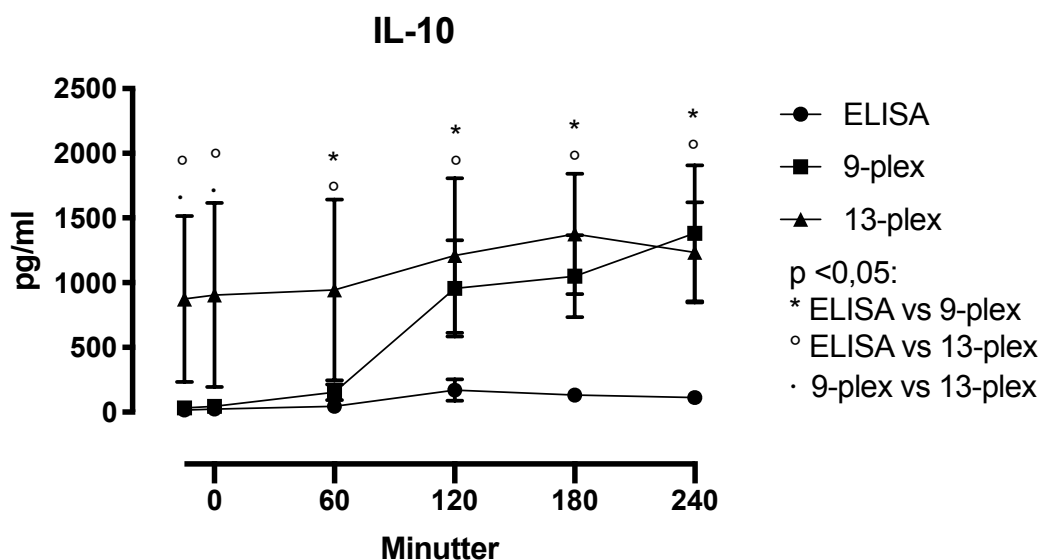
Figur 4. Grafisk framstilling av IL-6 i plasma. Grafen viser gjennomsnitt med 95% konfidensintervall for de tre analysemetodene.



Tabell 3. Oversikt over analysemetodene for IL-10 i plasma. Det ble gjort en to-veis variansanalyse (ANOVA) for å se etter signifikante forskjeller mellom de tre analysemetodene. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Plasma	Tid	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	Sum N=156 (100%)
IL - 10	-15 min	Nei	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,4354	Justert p-verdi: 0,0277	Justert p-verdi: 0,0313	
	Gjennomsnittsverdi	16 vs 32	16 vs 875	32 vs 875	
	0 min	Nei	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,1064	Justert p-verdi: 0,0432	Justert p-verdi: 0,0497	
	Gjennomsnittsverdi	22 vs 45	22 vs 905	45 vs 905	
	60 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0039	Justert p-verdi: 0,0356	Justert p-verdi: 0,0712	
	Gjennomsnittsverdi	45 vs 154	45 vs 943	154 vs 943	
	120 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)
Justert p-verdi: 0,0007		Justert p-verdi: 0,0041	Justert p-verdi: 0,7383		
Gjennomsnittsverdi	171 vs 956	171 vs 1211	956 vs 1211		
180 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)	
	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,4651		
Gjennomsnittsverdi	132 vs 1050	132 vs 1376	1050 vs 1376		
240 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)	
	Justert p-verdi: 0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,8885		
Gjennomsnittsverdi	113 vs 1382	113 vs 1235	1382 vs 1235		

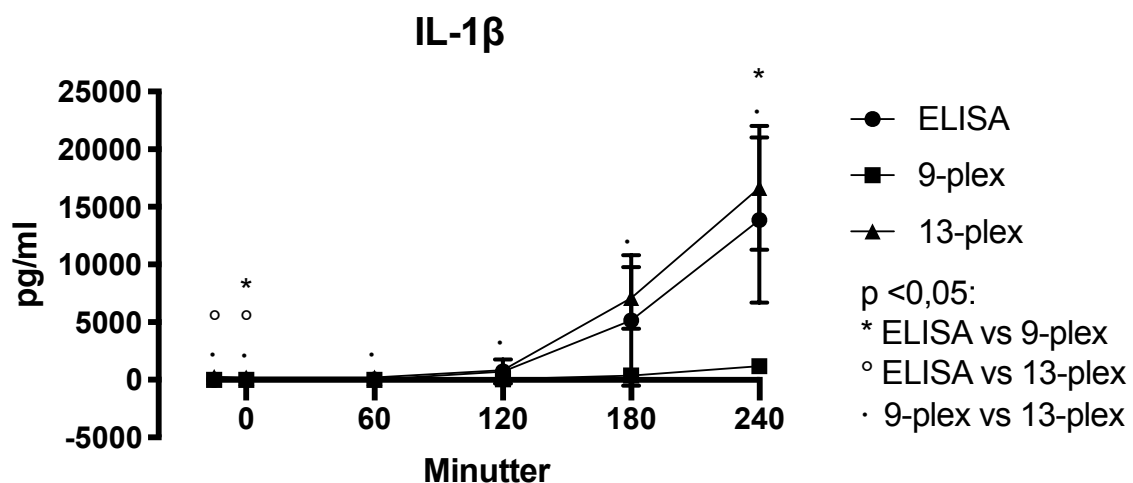
Figur 5. Grafisk framstilling av IL-10 i serum. Grafen viser gjennomsnitt med 95% konfidensintervall for de tre analysemetodene.



Tabell 4. Oversikt over analysemetodene for IL-1 β i plasma*. Det ble gjort en to-veis variansanalyse (ANOVA) for å se etter signifikante forskjeller mellom de tre analysemetodene. Gjennomsnittsverdi i pg/ml. *ELISA kjørt i serum.

Plasma	Tid	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	Sum N=156(100%)
IL – 1 β	-15 min	Nei	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,1560	Justert p-verdi: 0,0067	Justert p-verdi: 0,0061	
		Gjennomsnittsverdi	5 vs 2	5 vs 263	
	0 min	Ja	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0061	Justert p-verdi: 0,0367	Justert p-verdi: 0,0299	
		Gjennomsnittsverdi	7 vs 0	7 vs 205	
	60 min	Nei	Nei	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,2049	Justert p-verdi: 0,1093	Justert p-verdi: 0,0438	
		Gjennomsnittsverdi	33 vs 0	33 vs 209	
	120 min	Nei	Nei	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,3855	Justert p-verdi: 0,9802	Justert p-verdi: 0,0016	
		Gjennomsnittsverdi	741 vs 51	741 vs 846	
	180 min	Nei	Nei	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,2109	Justert p-verdi: 0,8004	Justert p-verdi: <0,0001	
		Gjennomsnittsverdi	5169 vs 392	5169 vs 7105	
	240 min	Ja	Nei	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0034	Justert p-verdi: 0,7993	Justert p-verdi: <0,0001	
		Gjennomsnittsverdi	13875 vs 1200	13875 vs 16660	

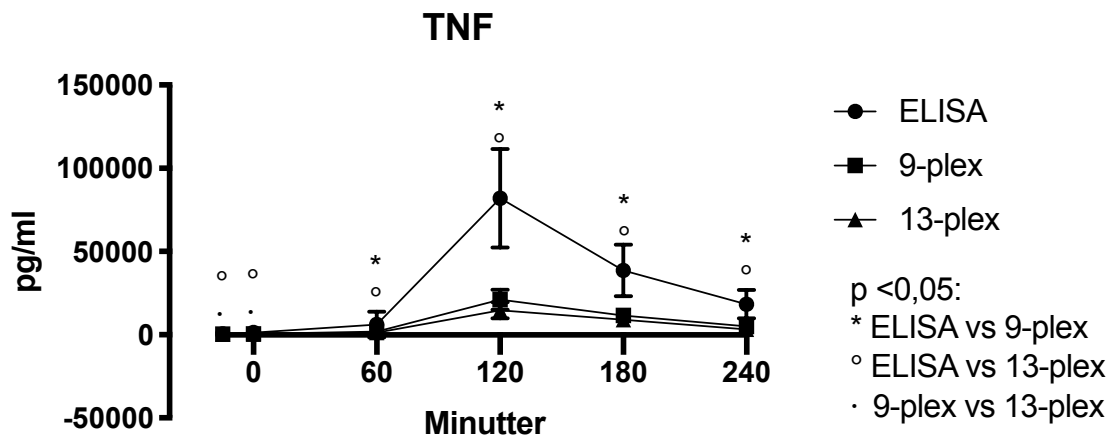
Figur 6. Grafisk framstilling for IL-1 β i plasma*. Grafen viser gjennomsnitt med 95% konfidensintervall for de tre analysemetodene. *ELISA kjørt i serum.



Tabell 5. Oversikt over analysemetodene for TNF i plasma. Det ble gjort en to-veis variansanalyse (ANOVA) for å se etter signifikante forskjeller mellom de tre analysemetodene. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Plasma	Tid	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	Sum N= 156 (100%)
TNF	-15 min	Nei	Nei	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,9234	Justert p-verdi: 0,5038	Justert p-verdi: 0,8108	
	Gjennomsnittsverdi	602 vs 437	602 vs 293	437 vs 293	
	0 min	Nei	Nei	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,5612	Justert p-verdi: 0,4079	Justert p-verdi: 0,9182	
	Gjennomsnittsverdi	1413 vs 536	1413 vs 442	536 vs 442	
	60 min	Nei	Nei	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,5530	Justert p-verdi: 0,4027	Justert p-verdi: 0,8183	
	Gjennomsnittsverdi	6115 vs 1975	6115 vs 1352	1975 vs 1352	
	120 min	Ja	Ja	Ja	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0008	Justert p-verdi: 0,0002	Justert p-verdi: 0,0427	
	Gjennomsnittsverdi	82006 vs 21131	82006 vs 1473	21131 vs 1473	
	180 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0043	Justert p-verdi: 0,0010	Justert p-verdi: 0,2155	
	Gjennomsnittsverdi	38731 vs 11557	38731 vs 9062	11557 vs 9062	
	240 min	Ja	Ja	Nei	N=26(16,7%)
		Justert p-verdi: 0,0124	Justert p-verdi: 0,0027	Justert p-verdi: 0,3484	
	Gjennomsnittsverdi	18458 vs 5004	18458 vs 3276	5004 vs 3276	

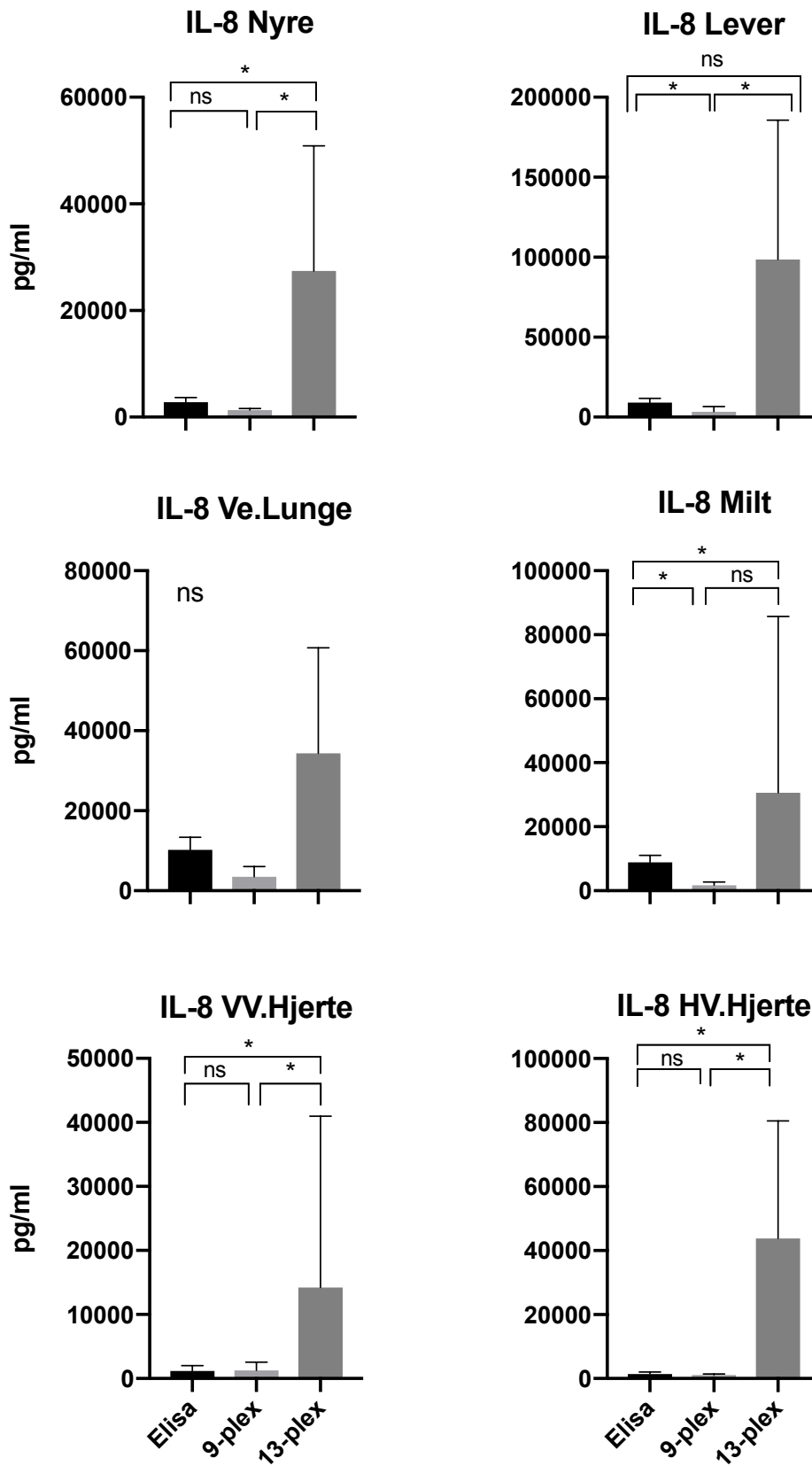
Figur 7. Grafisk framstilling av TNF i plasma. Grafen viser gjennomsnitt med 95% konfidensintervall for de tre analysemetodene.



Tabell 6. Sammenligning av analysemetodene for IL-8 i vevsprøvene. Data analysert ved enveis ANOVA og Friedmans post hoc-test. VV=venstre ventrikkel, HV= høyre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Vev	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	N total= 156 (100%)
Nyre	Nei	Ja	Ja	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,2883	Justert p-verdi: 0,0005	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	2813 vs 1318	2813 vs 27427	1318 vs 27427	
Lever	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,009	Justert p-verdi: 0,0457	Justert p-verdi: 0,7155	Justert p-verdi: 0,0009	
• Gjennomsnittsverdi	9005 vs 3364	9005 vs 98609	3364 vs 98609	
Ve. Lunge	Nei	Nei	Nei	N= 26 (16,7%)
• Ikke signifikant	Justert p-verdi: 0,0795	Justert p-verdi: 0,3815	Justert p-verdi: >0,9999	
• Gjennomsnittsverdi	10235 vs 3511	10235 vs 34338	3511 vs 34338	
VV. Hjerne	Nei	Ja	Ja	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	1167 vs 1283	1167 vs 14225	1283 vs 14225	
HV. Hjerne	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	1490 vs 1147	1490 vs 43804	1147 vs 43804	
Milt	Ja	Ja	Nei	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0002	Justert p-verdi: 0,0004	Justert p-verdi: 0,0134	Justert p-verdi: 0,9951	
• Gjennomsnittsverdi	8908 vs 1702	8908 vs 30619	1702 vs 30619	

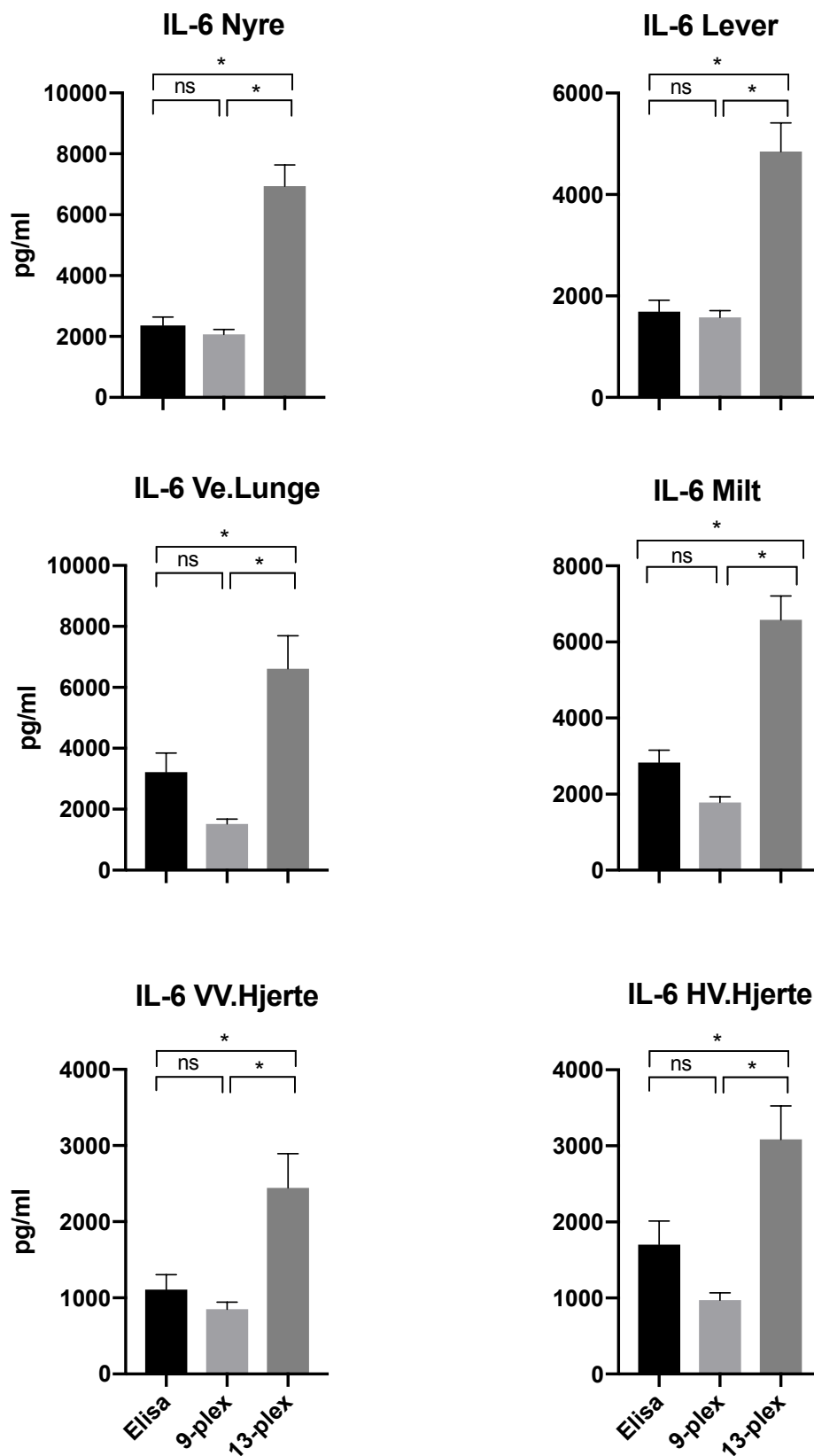
Figur 8. Grafisk framstilling av de tre analysemetodene for IL-8 i vev. Dataene er analysert ved enveis ANOVA med Tukeys post-hoc test. N= 156, * $p < 0,05$. HV= Høyre ventrikkel, VV= venstre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge.



Tabell 7. Sammenligning av analysemetodene for IL-6 i vevsprøvene. Data analysert ved enveis ANOVA og Friedmans post hoc-test. VV=venstre ventrikkel, HV= høyre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Vev	Elisa vs 9 – plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	N total= 156 (100%)
Nyre	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	2362 vs 2067	2362 vs 6941	2067 vs 6941	
Lever	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,4966	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	1691 vs 1576	1691 vs 4849	1576 vs 4849	
Ve. Lunge	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,2883	Justert p-verdi: 0,0005	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	3218 vs 1518	3218 vs 6611	1518 vs 6611	
VV. Hjerne	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	>0,9999	<0,0001	<0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	1108 vs 851	1108 vs 2445	851 vs 2445	
HV. Hjerne	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,8018	Justert p-verdi: 0,0002	Justert p-verdi: <0,0001	
	1701 vs 972	1701 vs 3084	972 vs 3084	
Milt	Nei	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,2143	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	2830 vs 1785	2830 vs 6580	1785 vs 6580	

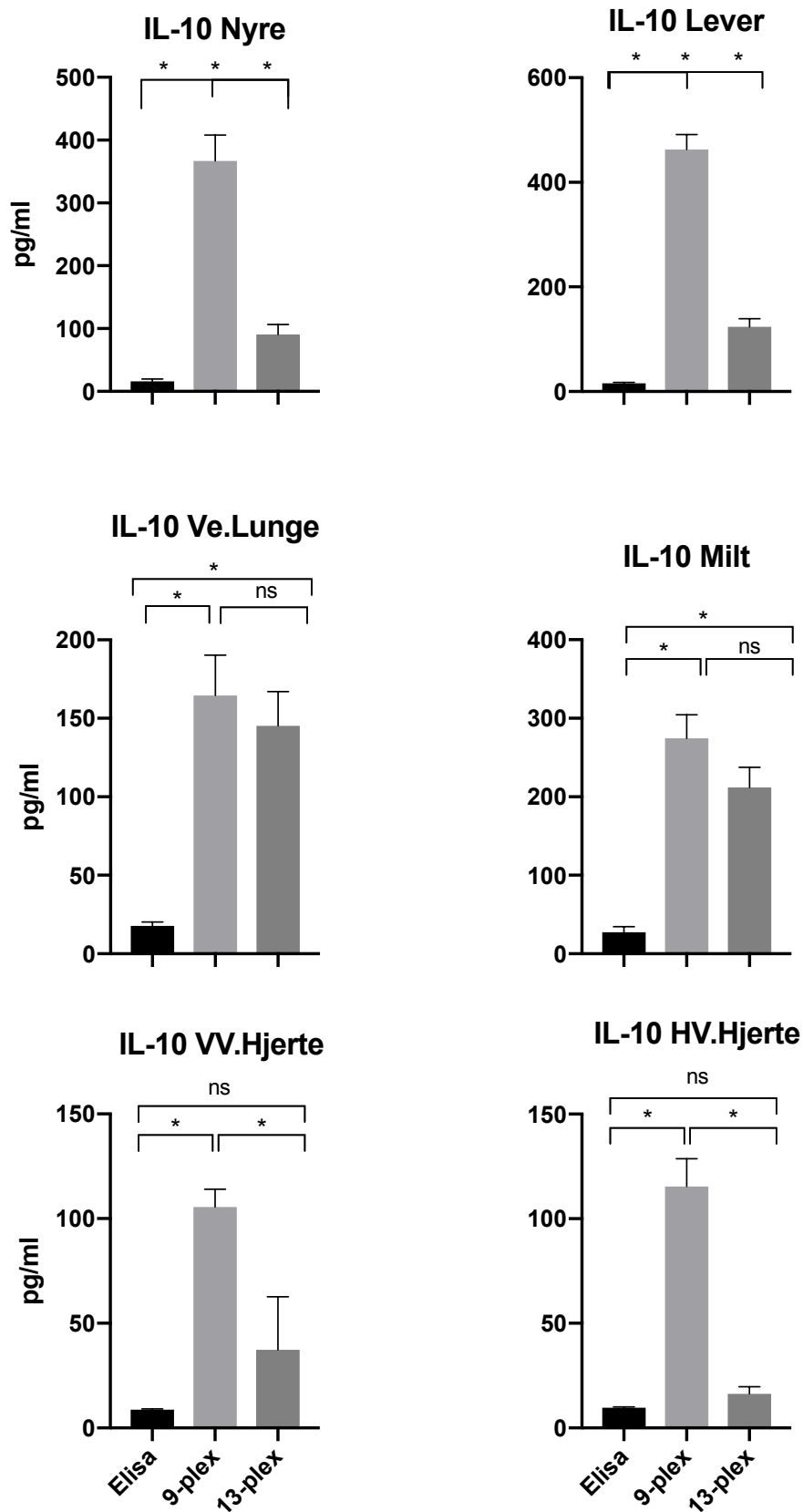
Figur 9. Grafisk framstilling av de tre analysemetodene for IL-6 i vev. Dataene er analysert ved enveis ANOVA med Tukeys post-hoc test. N= 156, * $p < 0,05$. HV= Høyre ventrikkel, VV= venstre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge.



Tabell 8. Sammenligning av analysemetodene for IL-10 i vevsprøvene. Data analysert ved enveis ANOVA og Friedmans post hoc-test. VV=venstre ventrikkel, HV= høyre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Vev	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	N total = 156 (100%)
Nyre	Ja	Ja	Ja	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0108	Justert p-verdi: 0,0002	
• Gjennomsnittsverdi	16 vs 367	16 vs 91	367 vs 91	
Lever	Ja	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0026	Justert p-verdi: 0,0005	
• Gjennomsnittsverdi	16 vs 462	16 vs 124	462 vs 124	
Ve. Lunge	Ja	Ja	Nei	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,6360	
• Gjennomsnittsverdi	18 vs 165	18 vs 145	165 vs 145	
VV. Hjerne	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	9 vs 106	9 vs 37	106 vs 37	
HV. Hjerne	Ja	Nei	Ja	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	10 vs 115	10 vs 16	115 vs 16	
Milt	Ja	Ja	Nei	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,2883	
• Gjennomsnittsverdi	27 vs 274	27 vs 212	274 vs 212	

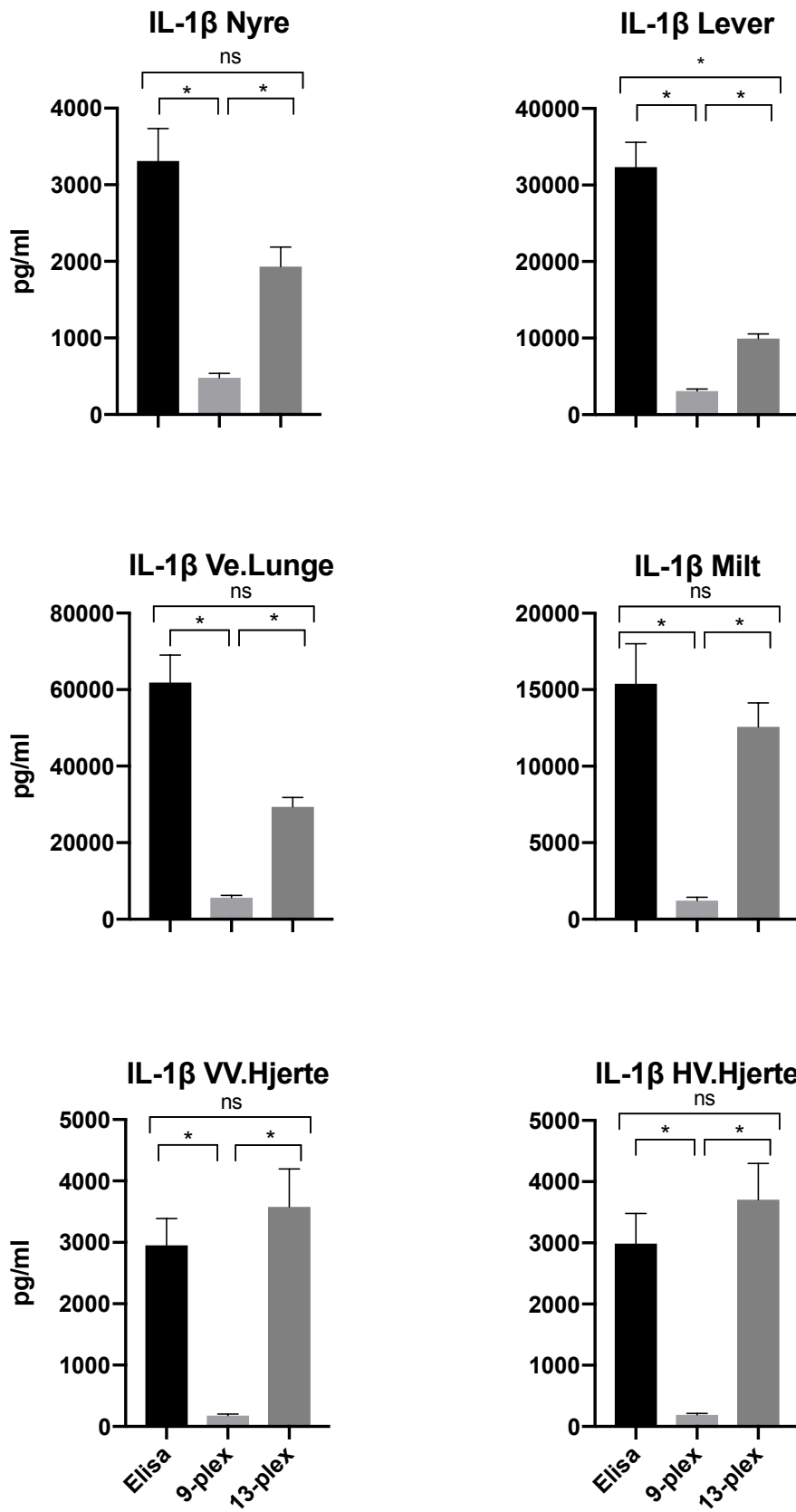
Figur 10. Grafisk framstilling av de tre analysemetodene for IL-10 i vev. Dataene er analysert ved enveis ANOVA med Tukeys post-hoc test. N= 156, * $p < 0,05$. HV= Høyre ventrikkel, VV= venstre ventrikkel og Ve.Lunge i venstre lunge.



Tabell 9. Sammenligning av analysemetodene for IL-1 β i vevsprøvene. Data analysert ved enveis ANOVA og Friedmans post hoc-test. VV=venstre ventrikkel, HV= høyre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Vev	ELISA vs 9 - plex	ELISA vs 13- plex	9-plex vs 13- plex	N total = 156 (100%)
Nyre	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0552	Justert p-verdi: 0,0004	
• Gjennomsnittsverdi	3313 vs 481	3313 vs 1931	481 vs 1931	
Lever	Ja	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0026	Justert p-verdi: 0,0005	
• Gjennomsnittsverdi	32344 vs 3092	32344 vs 9934	3092 vs 9934	
Ve. Lunge	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0552	Justert p-verdi: 0,0002	
• Gjennomsnittsverdi	61804 vs 5603	61804 vs 29364	5603 vs 29364	
VV. Hjerte	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	2951 vs 176	2951 vs 3576	176 vs 3576	
HV. Hjerte	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,2883	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	2990 vs 189	2990 vs 3705	189 vs 3705	
Milt	Ja	Nei	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: <0,0001	
• Gjennomsnittsverdi	15390 vs 1227	15390 vs 12580	1227 vs 12580	

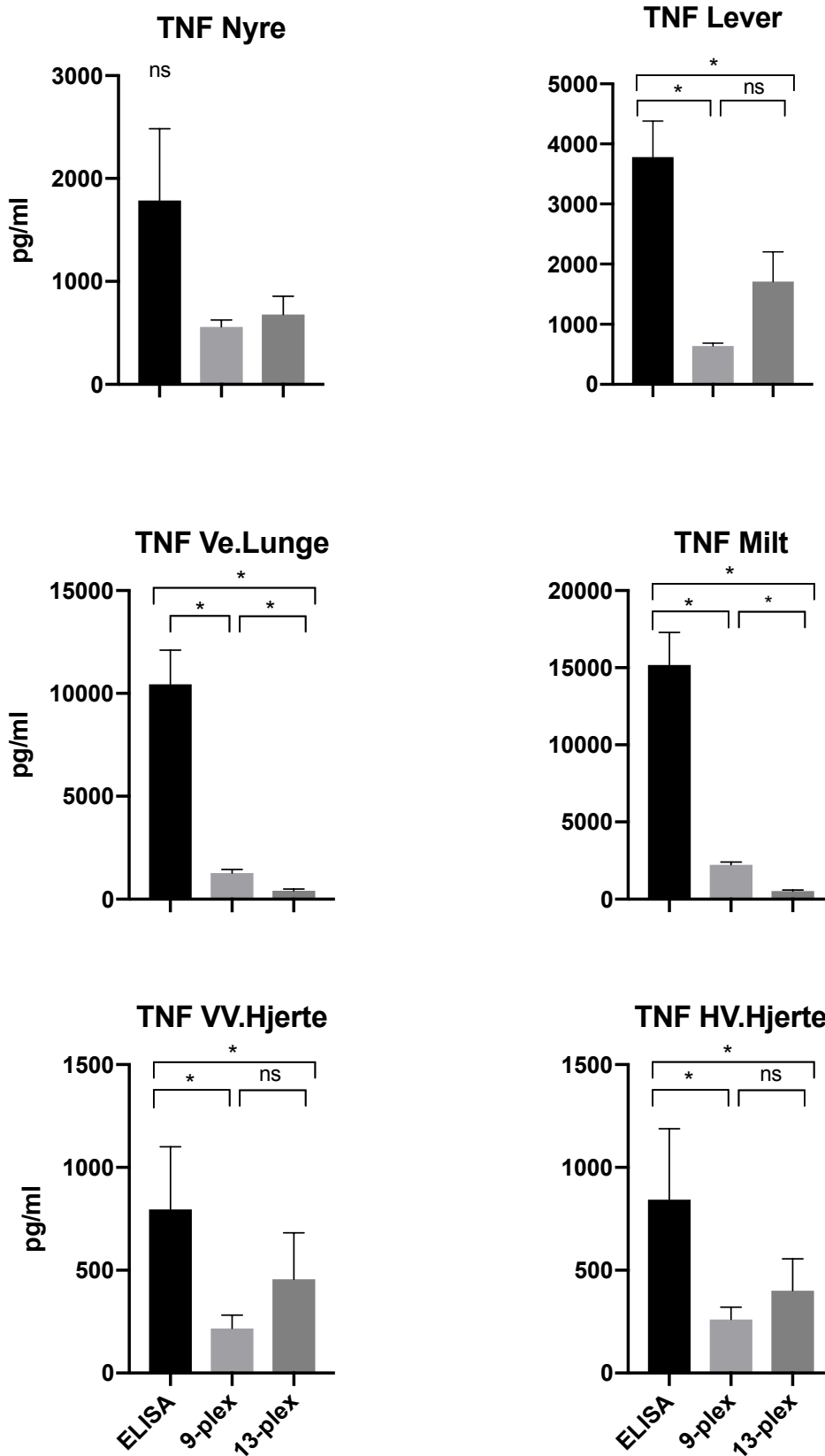
Figur 11. Grafisk framstilling av de tre analysemetodene for IL-1 β i vev. Dataene er analysert ved enveis ANOVA med Tukeys post-hoc test. N= 156, * p <0,05. HV= Høyre ventrikkel, VV= venstre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge.



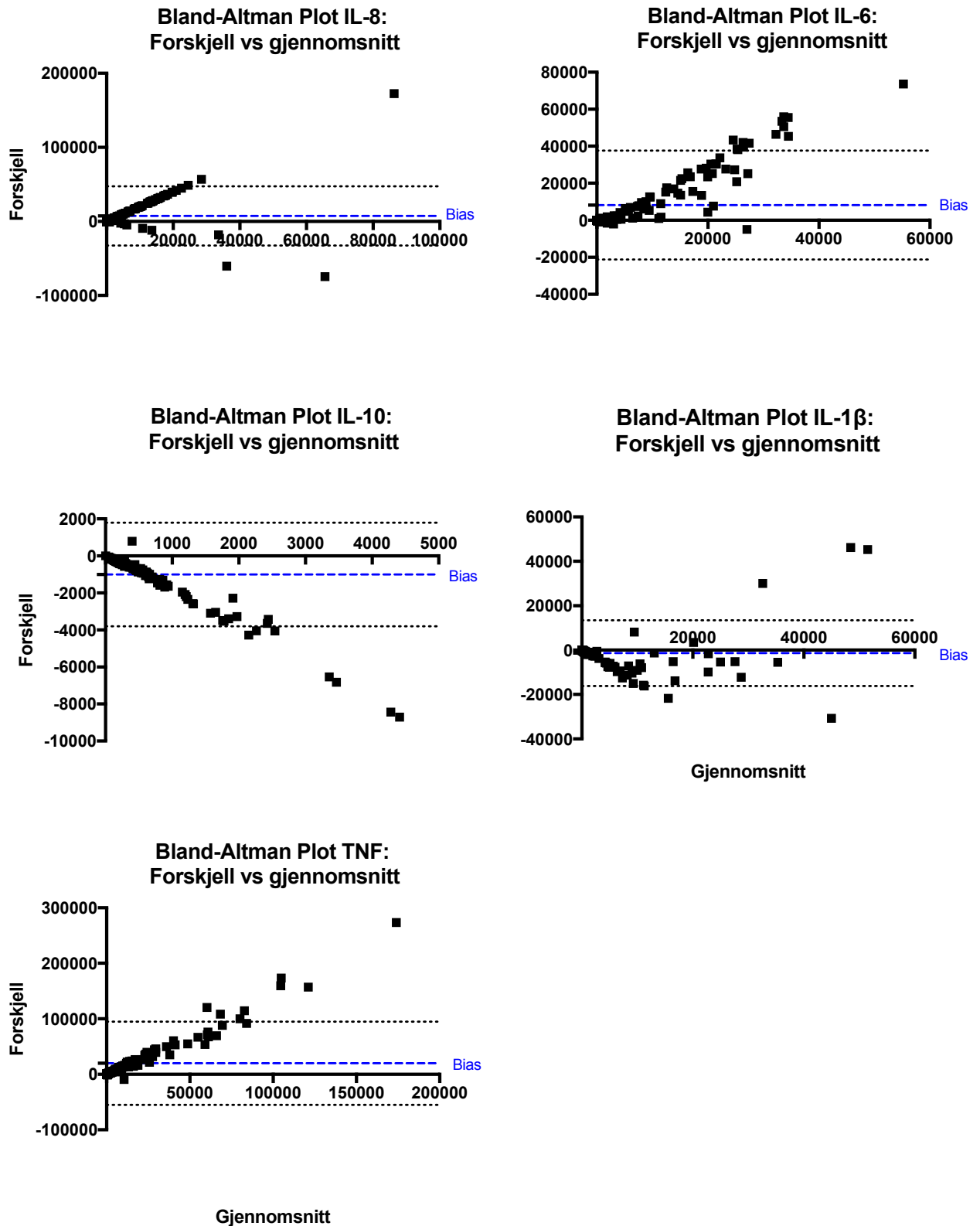
Tabell 10. Sammenligning av analysemetodene for TNF i vevsprøvene. Data analysert ved enveis ANOVA og Friedmans post hoc-test. VV=venstre ventrikkel, HV= høyre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge. Gjennomsnittsverdi i pg/ml.

Vev	ELISA vs 9-plex	ELISA vs 13-plex	9-plex vs 13-plex	N total = 156 (100%)
Nyre	Nei	Nei	Nei	N= 26 (16,7%)
• Ikke signifikant p: 0,5531	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: >0,9999	Justert p-verdi: >0,9999	
• Gjennomsnittsverdi	1787 vs 560	1787 vs 679	560 vs 679	
Lever	Ja	Ja	Nei	N=26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,0003	Justert p-verdi: 0,0002	Justert p-verdi: >0,9999	
• Gjennomsnittsverdi	3780 vs 640	3780 vs 1713	640 vs 1713	
Ve. Lunge	Ja	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,0016	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0068	
• Gjennomsnittsverdi	10444 vs 1270	10444 vs 408	1270 vs 408	
VV. Hjerte	Ja	Ja	Nei	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,0002	Justert p-verdi: 0,0003	Justert p-verdi: >0,9999	
• Gjennomsnittsverdi	795 vs 217	795 vs 456	217 vs 456	
HV. Hjerte	Ja	Ja	Nei	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,0009	Justert p-verdi: 0,0016	Justert p-verdi: >0,9999	
• Gjennomsnittsverdi	843 vs 269	843 vs 400	269 vs 400	
Milt	Ja	Ja	Ja	N= 26 (16,7%)
• Signifikant p<0,0001	Justert p-verdi: 0,0005	Justert p-verdi: <0,0001	Justert p-verdi: 0,0026	
• Gjennomsnittsverdi	15172 vs 2224	15172 vs 523	2224 vs 523	

Figur 12. Grafisk framstilling av de tre analysemetodene for TNF i vev. Dataene er analysert ved enveis ANOVA med Tukeys post-hoc test. N= 156, * $p < 0,05$. HV= Høyre ventrikkel, VV= venstre ventrikkel og Ve.Lunge= venstre lunge.



Figur 13. Grafisk fremstilling av bland-Altman for plasmaprøvene.



Tabell 11. Anbefalt metode for kvantitering av 5 cytokiner i gris plasma og vev¹.

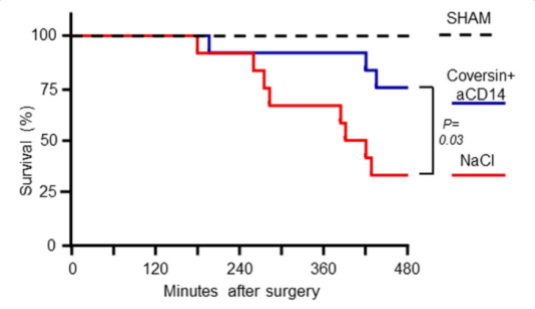
Cytokin	Plasma			Vev		
	ELISA	9-plex	13-plex	ELISA	9-plex	13-plex
TNF	X			X		
IL-1 β	X ²		X	X ²		
IL-6	X					X
IL-8			X			X
IL-10		X			X	

¹ Se metodebeskrivelse for leverandør av de ulike kits.

² IL-1 β var tilnærmet likeverdige i plasma og vev detektert i ELISA.

9 Sammendrag av kunnskapsevalueringer

Mine hovedartikler som ble bruk til masteroppgaven (MED-3950) er mer relatert til laboratoriearbeid og metode. Derfor har vi valgt ut fem artikler hvor det er gjort kliniske studier med tanke på bruken av ELISA og multiplex. Se neste side.

Referanse: Skjeflo EW, Sagatun C, Dybwik K, Aam S, Urving SH, Nunn MA, et al. Combined inhibition of complement and CD14 improved outcome in porcine polymicrobial sepsis. Critical Care. 2015 Dec;19(1):415.		Design: RCT	
		Dokumentasjonsnivå	2
		GRADE – kvalitet	☺☺
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Hemming av TLR og komplementsystemet som behandlingsregime for å dempe den inflammatoriske responsen i sepsis.	Populasjon: 24 norske griser som kom fra en autorisert griseprodusent. Inklusjonskriterier: Grisene hadde samme vekt (4±0,5 kg), kjønn, alder og griserase. Antallet hadde samme diett og allmenntilstand før eksperimentet.	Hovedfunn: Kombinert C5 og CD14 hemming ga en signifikant bedre overlevelse (p=0,03). 9 griser overlevde i behandlingsgruppen, mens 4 i kontrollgruppen.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? Ja. • Hvem er inkludert/ekskludert (seleksjon/generaliserbarhet)? Grisene hadde samme vekt, kjønn, alder og rase. Samt måtte være friske. • Var gruppene like ved starten (seleksjon, har randomiseringen fungert)? Ja. • Randomiseringsprosedyre? Grisene ble blindet randomisert til enten å få behandling (n=12) eller saltvann (n=12). • Ble deltakere/studiepersonell blindet mtp. gruppetilhørighet? Ja • Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? Ja, grisene gjennomgikk samme kirurgi og anestesi. • Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien (frafalls-/oppfølgingsbias)? Nei. • Hva er resultatene? Kombinasjonsbehandlingen ga en signifikant overlevelse. • Kan resultatene overføres til praksis? Bli ikke tatt opp i forskningsartikkelen. • Ble alle utfallsmål vurdert? Ja • Er fordelene verdt ulemper/kostnader? Var ikke et tema i artikkelen. • Annen litteratur som styrker resultatene? Ja Hva diskuterer forfatterne som: Styrker? <ul style="list-style-type: none"> • Tydelige forskjeller mellom gruppene på MPAP/MAP ratio som gir en tydelig effekt for hemming av C5 og CD14 på de hemodynamiske parameterne. • Komplimentaktivering var markert økt i den ubehandla gruppen, sammenlignet med gruppen som fikk behandling hvor disse hadde ingen til lave nivåer
Konklusjon	Eksklusjonskriterier: Ingen tegn til infeksjon eller inflammasjon før eksperimentet.		
Kombinert hemming av C5 og CD14 ga en signifikant bedre overlevelse, hemodynamiske parameterer og inflammasjon i en 8 timers modell for sepsis.	Randomiseringsprosedyre: Grisene ble blindet randomisert til enten å få behandling (n=12) eller saltvann (n=12). Intervensjonen var ukjent for forskerne.	Plasma sC5b-9 nivået var signifikant lavere i behandlingsgruppen (p<0,0001) og korrelerte signifikant med mortalitet (p=0,0006).	
Land	Intervensjon: Behandling gikk ut på å gi C5 hemmet coversin (OmCI) og anti-CD14. Dette ble gitt via IV infusjon. Under anestesi, sepsis var induisert via innsnitt cecalt og grisene ble observert i 8 timer.	Mellom utsatt/ikke utsatt: Alle 3 SHAM griser overlevde gjennom de 8 timene med observasjon.	
Norge	Datagrunnlaget (prøvene som ble tatt): Blodprøver ble tatt rett etter IV tilgang og før kirurgi, etter kirurgi og 1,2,3,4,5,6 og 8 timer etter kirurgi.	Rate/andel/ratio/rateforskjell: Behandlingsgruppen hadde lavere MPAP (p=0,04) og MPAP/MAP ratio (p<0,0001).	
År for datainnsamling	2015	Hvor sterk er assosiasjonen (OR)? Fant en signifikant assosiasjon mellom sC5B-9 nivå og død (p=0,006 og OR på 25,00)	
CI:	Bredt. 95% CI fra 2,094 til 298,5.		

Utfall (outcome) validering:

Komplimentaktivering var målt ved sC5b-9 med bruk av immunoassay. Cytokiner (n=9) var målt og analysert med multiplex.

Viktige konfunderende faktorer:**Statistiske metoder:**

Statistiske analyser ble gjort via GraphPad Prism 6. Overlevelseskraver ble sammenlignet ved bruk av log-rank (Mantel-Cox) test og korrelasjonsanalyser ble kalkulert ved bruk av Pearson koeffisient. For å se på forskjell mellom og innad gruppene ble det brukt en ikke-parametrisk test – Wilcoxon matched-pairs signed-rank test, hvor en p-verdi på 0,05 var betraktet som signifikant.

Bifunn:

- IL-8 og IL-10 var signifikant lavere i behandlingsgruppen ($p < 0,05$). Grunnen til at cytokinene ble målt var for å se om redusert complimentaktivering og TLR aktivering fører til mindre utskillelse av cytokiner og kjemokiner.
- Fant både gram positive og gram negative bakterier i alle blodkulturene. Som resulterer med at dette blir en polymikrobal sepsis.

av complimentaktivering etter blokkering av C5. Resulterer med mangel på aktivering kan redusere iskemi-indusert inflammasjon under septisk sjokk.

- sC5b-9 var lavere hos behandlingsgruppen som da kan tyde på et godt mål for påvirkning av utfallet.
- Tidligere studier har bruk mus i sin forskning, ved bruk av gris får man en nærmere tilnærming til menneskelige sykdommer og gir dermed med relevant informasjon.
- Tidligere forskning har vist at IL-8 og IL-10 har en assosiasjon med alvorlig sepsis og dårlig utfall. Det viste seg at blokkering av CD14 påvirker disse cytokinene, som er en fordel i sepsis.

Svakheter?

- Komplement mediert endotelcelle aktivering var ikke målt, som betyr at man ikke har måling på protrombotisk aktivitet som er viktig for intravaskulær koagulasjon. Koagulasjonssystemet er en viktig effektormekanisme i inflammasjonen. Dette vil til syvende og sist redusere vevsperfusjonen og bidra til hemodynamisk instabilitet.
- En direkte årsaks effekt for complimentaktivering alene kan man ikke bevise i studiet.
- Det var en relativ kort observasjonstid og liten populasjon.
- Bruken av ikke-parametrisk statistiske analyser, hvor man da får økt risiko for type II error.
- Begrenset mengde hemmere og de høye kostnadene resulterte med at man brukte unge griser i stede for voksne. Derfor blir dette studiet mer relevant for neonatal sepsis.
-

Har resultatene plausible forklaringer? Ja

Referanse: Andaluz-Ojeda D, Bobillo F, Iglesias V, Almansa R, Rico L, Gandía F, et al. A combined score of pro- and anti-inflammatory interleukins improves mortality prediction in severe sepsis. Cytokine. 2012 Mar 1;57(3):332–6.			Design: Kohortstudie
			Dokumentasjonsnivå 3
			GRADE – kvalitet ☺
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Kvantifisering av cytokiner ved bruk av 17-plex for pasienter med sepsis, hvor dette kan ha klinisk relevans innenfor behandling av alvorlig sepsis eller septisk sjokk.	Populasjon: 17 immunmediatorer fra plasma hos 29 pasienter med alvorlig sepsis eller septisk sjokk i løpet av de første 24 timer etter innleggelse. Inklusjonskriterier: Pasienter som er lik eller over 18 år som var diagnostisert ved innleggelse. Sepsis var diagnostisert ut fra ≥ 2 SIRS kriterier ved dag 1. Alvorligheten for sepsis ble vurdert etter APACHE II skår og SOFA skår. Eksklusjonskriterier: Tilstedeværelse av immunsvekkelse eller bruk av immunsuppressiv behandling, graviditet, HLR- og hjertestans.	Hovedfunn: Av de 17 cytokinene som ble målt var det økt plasmakonsentrasjoner av IL-6, IL-8, IL-10 og MCP-1 for pasientene som ikke overlevde (n=12) sammenlignet med de som overlevde (n=17). Største forskjellen var konsentrasjonen av IL-10 (p=0,014). IL-6, IL-8 og IL-10 viste assosiasjon til økt mortalitet, både ved dag 3 og dag 28. Videre laget forskerne en kombinert poengsum basert på interleukin konsentrasjonen. Delte pasientene inn i to grupper basert på P75. Pasienter som hadde interleukin verdier over P75 fikk verdien 1 og de under P75 fikk verdien 0. ut fra dette ble det laget en ny Cox regresjonsanalyse for å kombinere skårene som i sin tur viste sterk signifikant assosiasjon for mortalitet ved dag 3 og 28 (se under på assosiasjon). Rate/andel/ratio/rateforskjell: Så på ratio mellom median nivå for døde/overlevende. Størst ratio for IL-10 som var på 57,4. Hvor sterk er assosiasjonen (HR)? APACHE-II, IL-6, IL-8, IL-10 og MCP-1 ble signifikant assosiert med økt mortalitet etter utførelse av en univariant Cox regresjonsanalyse. Analysen ble repetert med en justert Cox regresjonsanalyse hvor APACHE-11, IL-6, IL-8 og IL-10 fremdeles hadde en signifikant assosiasjon til økt mortalitet.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? Nei. • Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe (seleksjonsbias)? Kom ikke fram i artikkelen. • Var gruppene sammenlignbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer (seleksjonsbias)? Ja. • Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? Nei, gjennomsnittsalderen på populasjonen var 66,1 år. • Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene (klassifikasjonsbias)? Ikke angitt. • Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet for gruppetilhørighet? Nei. • Var studien prospektiv? Ja • Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp (frafallsbias/oppfølgingsbias)? Nei, dette ble ikke angitt. • Er det utført frafallsanalyser (evalueringsbias, frafallsbias)? Nei. • Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? Pasientene ble ikke fulgt opp. • Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser? Nei. • Tror du på resultatene? Nei, biologisk plausibilitet spiller inn her ved at multiplex ikke alltid gir like validert svar grunnet biologiske overlappingen. • Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen? Usikkert. • Annen litteratur som styrker/svekker resultatene? Ja.
Konklusjon			
Forskerne har beskrevet en skår for både proinflammatoriske og antiinflammatoriske interleukiner som er assosiert med alvorlig sepsis og septisk sjokk. Ut fra dette kan man forutsi mortalitet i mortalitet i sepsis og kan dermed brukes i videre forskning for behandlingsvalg for sykdommen.	Hovedutfall: Blodkulturer ble tatt for deteksjon av bakteriell- og soppinfeksjoner. Samt deteksjon for antistoffer til Legionella pneumophila og Streptococcus pneumoniae i urin. Det ble også tatt en enkel blodprøve fra vær pasient som ble lagt på EDTA innen de første 24 timene etter innleggelse.		
Land			
Spania			
År for datainnsamling			
2011	Datagrunnlag: Ser prospektivt på pasienter fra Juni 2010 til Januar 2011. Plasma kjemokiner og cytokiner ble kvantifisert ved bruk av Bio-Plex Human Cytokine 17-Plex panel.	<ul style="list-style-type: none"> • Kombinert skår ved dag 3: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ujustert HR: 9,53 (p=0,005). ○ Justert HR: 10,82 (p=0,030). • Kombinert skår ved dag 28: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ujustert HR: 9,53 (p=0,005). ○ Justert HR: 7,07 (p=0,018). 	

	<p>Statistiske metoder:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SPSS. • Det ble brukt 75 persentil (P75) som cut-off. • For sammenligning ble det brukt en Mann-Whitney U test. • For å finne Hazard ratio (HR) og 95% CI ble det brukt Cox regresjonsanalyse. • Først ble alder, kjønn, SOFA og APACHE II skår og cytokin nivåer testet med en univariant analyse. For variabler som deretter hadde p-verdier under 0,1 ble det gjort multivariant statistikk. • Grupper ble sammenlignet vha log-rank test (Mantel-Haenzel). 	<p>CI (bredt/smalt): Bredt.</p> <p>Bifunn:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hovedområdet for Infeksjonsfokus var nedre luftveisinfeksjoner. Man klarte å dokumentere en agens i 79,3% av tilfellene, hvor det var mest av Gram negative bakterier (41,1% hos de som overlevde og 58,3% for de som ikke overlevde). • Majoriteten døde i løpet av de første 72 timene grunnet MODS. Alle utenom 1 som døde fikk septisk sjokk. 	<ul style="list-style-type: none"> • Hva betyr resultatene for endring av praksis? Andre behandlingsalternativer for alvorlig sepsis og septisk sjokk. <p>Hva diskuterer forfatterne som:</p> <p><i>Styrker?</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Ved bruk av multiplex kvantifisering kunne forskerne bruke sin kombinerte P75 skår for cytokiner og dermed bedre forutsi dødeligheten i kohorten, basert på Cox regresjonsanalyse. Ved en slik skår fikk dem sterkere assosiasjon til dødelighet (stor HR) enn ved individuelle konsentrasjoner. • Alle pasientene hadde lik bakgrunnsfaktor. <p><i>Svakheter?</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Liten populasjon inkludert. • Majoriteten av dødelighet oppstod veldig tidlig etter innleggelse. • Ser ikke på cytokinkonsentrasjonen i tidlig kontra sen mortalitet, dermed får man ingen prediktiv verdig.
--	--	---	---

Referanse: Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, et al. Cytokine profile in severe gram-positive and gram-negative abdominal sepsis. Scientific Reports. 2015 Jun 16;5:11355.			Design: Tverrsnittstudie	
			Dokumentasjonsnivå	5
			GRADE – kvalitet	😊😊
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste	
Bestemme hvorvidt tidlig cytokin profil kan skille mellom Gram-positive (GPB) og Gram-negative (GNB) bakteriemi og evaluere det prognostiske utfallet i kritisk syke pasienter med alvorlig abdominal sepsis.	Populasjon: 165 pasienter (gjennomsnittsalder var 52,5 år, aldersspenn var 19-81 år, 104 kvinner og 61 menn) som var innlagt grunnet alvorlig sepsis eller septisk sjokk. Studiet varte i 3år og 10 måneder og oppfølgingsperioden var på 1år.	Hovedfunn: 80 pasienter (48,5%) utviklet GPB, 65 pasienter (39,4%) utviklet GNB og 20 pasienter (12,1%) hadde polymikrobal bakteriemi (POLY). Ved sammenligning av GPB, GNB og POLY gruppene var det en signifikant forskjell i mortalitetsrate (p=0,045, x ² = 5,789). Signifikant høyest mortalitet i GNB. De 3 grupper av pasienter som var sammenlignet (GPB, GNB og POLY), viste en signifikant forskjell i TNF-alpha, IL-8, INF-gamma, IL-1ra, IL-4 og IL-10 konsentrasjoner (p<0,001). For GPB gruppen var det en optimal sensitivitet og spesifisitet for IL-1ra, IL-8 og IL-10. For GNB så man det samme for TNF-alpha, IL-8, IL-12, IL-1ra, og IL-10. Se tabell under.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? Ja. • Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe (seleksjonsbias)? Bli ikke oppgitt i forskningsartikkelen. • Var gruppene sammenlignbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer (seleksjonsbias)? Ja. • Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? Til en viss grad, hvor pasientene måtte ha alvorlig sepsis eller septisk sjokk og være lik eller over 18 år. Men studiet tok ikke til høyde for sammenligning i forhold til kjønn, alder eller morbiditet. • Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig (validert) i de to gruppene (klassifikasjonsbias)? Ja, analysene ble gjort på samme måte. Etter oppskrift fra leverandøren. • Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet for gruppetilhørighet? Nei. • Var studien prospektiv? Ja. • Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp (frafallsbias/oppfølgingsbias)? Alle ble fulgt opp i 1år. • Er det utført frafallsanalyser (evalueringsbias, frafallsbias)? Nei. • Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? Ikke relevant til det som var formålet. • Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring/analyser? Ja • Tror du på resultatene? Ja. I diskusjonen tar forfatterne opp plausible forklaringer for resultatet og viser til annen forskning. 	
Konklusjon	Inklusjonskriterier: Pasientene må være over eller lik 18 år og oppnådd daværende kriterier for alvorlig sepsis og septisk sjokk. Sepsis ble diagnostisert vha SIRS og APACHE II skår innen de første 24 timene etter innleggelse.			
Cytokinprofilene indikerte at TNF- alpha var 2-fold, IL-8 var 3,3-fold, INF-gamma var 13-fold, IL-1ra var 1,05 fold, IL-4 var 1,4 fold, IL-10 var 1,83 fold høyere i GNB sammenlignet med GPB. Nivåene av TNF-alpha var 4,7 fold, IL-8 var 4,6 fold, IL-1ra var 1,5 fold og IL-10 var 3,3 fold høyere i ikke overlevde sammenlignet med dem som overlevde.	Eksklusjonskriterier: Pasienter med annet infeksjonsfokus annet enn peritonitt.			
Land	Datagrunnlag: Blodprøver for kvantifisering av cytokiner og blodkultur ble tatt rett etter innleggelse da alvorlig sepsis eller septisk sjokk var diagnostisert. Blodprøvene innehold EDTA plasma, gjennomgikk sentrifugering og lagt på is inntil analysering.			
Serbia	Analysene ble gjort med ELISA.			
År for datainnsamling				
16, juni 2015.	Hovedutfall:	Det var en signifikant positiv korrelasjon mellom de proinflammatoriske cytokinene TNF-alpha, IL-8, IL-12 og INF-gamma. For de antiinflammatoriske cytokinene var det en		

AUC/ROC data regarding inflammatory mediators and Gram-positive bacteraemia						
Mediator	AUC	95% CI	Sensitivity	Specificity	Cut-off (pg/mL)	p
TNF-alpha	0.542	0.410-0.674	low	low	N/A	p > 0.05
IL-8	0.719	0.590-0.848	80%	73.3%	<7.50	0.001
IL-12	0.310	0.180-0.439	low	low	N/A	p > 0.05
INF-gamma	0.489	0.355-0.624	low	low	N/A	p > 0.05
IL-1ra	0.655	0.534-0.775	74.3%	53.3%	<123.50	0.018
IL-4	0.508	0.362-0.653	low	low	N/A	p > 0.05
IL-10	0.786	0.683-0.889	68.6%	68.9%	<6.50	0.000
TGF-beta1	0.327	0.199-0.455	low	low	N/A	p > 0.05
AUC/ROC data regarding inflammatory mediators and Gram-negative bacteraemia						
Mediator	AUC	95% CI	Sensitivity	Specificity	Cut-off (pg/mL)	p
TNF-alpha	0.912	0.830-0.993	90.2%	87.5%	>0.56	0.000
IL-8	0.999	0.780-1.00	97.6%	100%	>11.50	0.000
IL-12	0.632	0.453-0.810	85.4%	62.5%	>18.50	0.045
INF-gamma	0.528	0.388-0.669	low	low	N/A	p > 0.05
IL-1ra	0.662	0.530-0.793	58.5%	54.2%	>200.00	0.031
IL-4	0.551	0.410-0.712	low	low	N/A	p > 0.05
IL-10	0.799	0.686-0.911	75.6%	87.5%	>10.50	0.000
TGF-beta1	0.025	0.000-0.067	low	low	N/A	p > 0.05

Sykehus mortalitet.

Statistiske metoder:

Statistiske analyser ble utført i SPSS. Det ble gjort en Kolmogorov-Smirnov og Shapiro test for normalfordeling. For å finne statistisk signifikante forskjeller ble det brukt Kruskal- Wallis test (signifikant ved $p < 0,05$). Videre ble det utført en korrelasjonsanalyse – Spearman. For å finne sensitivitet og spesifisitet ble det brukt ROC kurve prosedyre.

signifikant korrelasjon mellom IL-1ra og IL-10. Signifikant korrelasjon mellom TGF-beta1 og IL-4. Samt en signifikant negativ korrelasjon mellom TGF-beta1 og IL-1ra eller IL-10.

Totalt sett var sykehusmortalitet på 53,3%. Forskerne sammenlignet de som ikke overlevde og de som overlevde, hvor man så en signifikant forskjell i nivåene av ulike cytokiner ($p < 0,01$). For de ikke overlevende var det økte nivåer av TNF-alpha, IL-8, IL1-ra, IL-10 og IL-4. For de overlevende var det økte nivåer av TGF-beta1.

CI (bredt/smalt):

Ut fra tabellen over er det beregnet 95% CI på hver cytokin, dette viser smale konfidensintervall.

Bifunn:

- Hyppigste bakteriefunn for de gram positive bakteriene var koagulasenegative staphylococcus aureus og enterococcus. For gram negative var det Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii og Klebsiella pneumoniae.

- **Kan resultatene overføres til den generelle befolkningen?** Forfatter oppgir at resultatene dem fant er uklart for om det kan overføres til den generelle befolkningen. Trenger da større studier med flere subpopulasjoner.
- **Annen litteratur som styrker/svekker resultatene?** Ja.

Hva diskuterer forfatterne som:

Styrker?

- Forfatterne viser til studier som har gjort det samme, og fått likt resultat. Gir da en god reliabilitet og reproduisibilitet. Samt kan dette forsterke validiteten, at de som måles faktisk blir målt siden annen forskning har kommet fram til det samme.
- Prøvde å få gruppene så homogen som mulig, slik at produksjon fra andre cytokiner ikke skulle påvirke resultatet.
- Alle pasientene ble tatt blodprøver til samme tid for innhenting av data.

Svakheter?

- Populasjonen på pasienter var begrenset for alvorlig abdominal sepsis som følge av peritonitt.
- Tre av åtte målte cytokiner (TNF-alpha, INF-gamma og IL-4) hadde median under 1 pg/mL. Som betyr at disse ikke blir detektert av ELISA siden de er out of range (OR)
- Cytokinene ble kun målt ved diagnosetidspunktet, de var ikke kontinuerlig monitorert i ulike tidsaspekt. Derfor er det usikkert når de ulike cytokinene nådde sin topp konsentrasjon.
- Fant at E.Coli var mindre hyppig å observere enn hva majoriteten av andre studier så.

Referanse: Russell JA, Fjell C, Hsu JL, Lee T, Boyd J, Thair S, et al. Vasopressin Compared with Norepinephrine Augments the Decline of Plasma Cytokine Levels in Septic Shock. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2013 Aug;188(3):356–64.			Design: RCT
			Dokumentasjonsnivå 2
			GRADE – kvalitet ☺☺☺
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Hypotesen var at endring i cytokinnivåer i plasma over 24 timer er forskjellig mellom overlevende og ikke overlevende, samt se om det er endring i cytokiner ved respons på vasopressin eller noradrenalin i septic sjokk.	Rekruttering av deltakere: 394 randomiserte pasienter ut fra et tidligere kohorte - VASST (Vasopressin and Septic Shock Trial) fra et multisenter. Inklusjonskriterier: Pasientene var over 16 år og hadde septisk sjokk (≥ 2 av SIRS kriteriene, infeksjon, nytt organ og hypotensjon).	Hovedfunn: Overlevende hadde signifikant større reduksjon generelt i cytokin nivåer fra baseline til 24 timer ($p < 0,001$). Endring av cytokinkonsentrasjon i plasma over 24 timer mellom overlevende og ikke overlevende var mer uttalt for dem med mer alvorlig sjokk enn for de som hadde mindre alvorlig sjokk. Man så økte nivåer av IP-10, IL-6, IL-8 og G-CSF i overlevende enn de som ikke overlevde, som ikke hadde like stor alvorlighetsgrad for sjokk.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? Ja. • Var gruppene like ved starten (seleksjon, har randomiseringen fungert?)? Ble ikke tatt fram i studiet. • Randomiseringsprosedyre? Blir ikke nøyet beskrevet. Men at randomiseringen var for de som fikk vasopressin eller noradrenalin. • Ble deltakere/studiepersonell blindet mtp. gruppetilhørighet? Ja. • Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? Nei. • Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien (frafalls-/oppfølgingsbias)? Blir ikke oppgitt i artikkelen. • Kan resultatene overføres til praksis? Ja. • Ble alle utfallsmål vurdert? Ja. • Er fordelene verdt ulemper/kostnader? Blir ikke diskutert i artikkelen. • Annen litteratur som styrker resultatene? Ja.
Konklusjon	Eksklusjonskriterier: Ustabile koronare syndromer, akutt mesenterisk iskemi, alvorlig kronisk hjertesykdom og vasospastisk lidelse.	De fant en muligens klinisk fordel for vasopressin i mindre alvorlig sjokk. Man så en signifikant endring i plasma cytokiner. IP-10 ($p=0,03$) og G-CSF ($p=0,04$) hadde en signifikant reduksjon for gruppen som fikk vasopressin i forhold til noradrenalin ($p=0,037$).	
De som overlevde septic sjokk hadde mer reduksjon av cytokiner, kjemokiner og vekstfaktorer i tidlig fase. Vasopressin reduserte 24timers plasma av cytokin nivåer mer enn hva noradrenalin gjorde.	Intervensjon: Pasientene var randomisert og blindet til å få vasopressin eller noradrenalin under septic sjokk. Dette ble gitt helt til pasienten døde, alvorlig bivirkning eller bedring.	CI: 95% CI på -0,13 til 0,01. Gjennomsnittsverdien var -0,06.	
Land		Bifunn – andre viktige endepunkter: Av de 394 pasientene var det 203 pasienter som fikk vasopressin og 191 fikk noradrenalin. Studiet viste en nedgang på 5% mortalitet ift. VASST studiet. Vasopressin hadde 30% reduksjon og noradrenalin hadde 34% reduksjon i mortalitet etter 28 dager. Dette var grunnet eksklusjon av pasienter som døde etter 24 timer.	Hva diskuterer forfatterne som:
Canada	Datagrunnlaget: Plasmaprøver ble tatt fra baseline (angitt som 2 timer etter injisert dose) og etter 24-timer. Dette ble totalt 39 plasma cytokiner.		Styrker? <ul style="list-style-type: none"> • Oppgir de er det første til å bruke begge typer analyse for sortering av data. Ved å bruke både kløsteranalyse og hovedkomponent analyse for å lage subgrupper av de ulike cytokiner, får man et høyere dimensjonal av data som kan styrke validiteten og resultatene mer. • Stor størrelse på populasjon. • Studien er blindet randomisert for vasopressin og noradrenalin. • Multicenter design • Svært kompleks protokoll
År for datainnsamling	Videre brukte forskerne kløsteranalyse og hovedkomponent analyse for å lage subgrupper av de ulike cytokiner. Videre sammenlignet overlevende og ikke overlevende (28 dager) og sammenlignet vasopressin vs.		
24.juni 2013			

	<p>Noradrenalin induerte cytokin nivåer over 24 timer.</p> <p>Utfallsvalidering: Analyttene ble kvantifisert og analysert ved bruk av Luminex multiplex bead assay.</p> <p>Statistiske metoder:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kjikvadrattest og uparret t-test. • Kløsteranalyse og hovedkomponent analyse • Måling av SD, median og 95% CI for cytokinkonsentrasjonene. • Cox regresjonsanalyse og lineær regresjonsanalyse, hvor man først laget en ujustert og deretter en justert. 		<ul style="list-style-type: none"> • Evaluering av mange cytokiner, kjemokiner og vekstfaktorer i plasma <p>Svakheter?</p> <ul style="list-style-type: none"> • En svakhet er at de begrenset cytokinene til 39 cytokiner i plasma ved baseline og ved 24 timer. Derfor kan det ikke antyde vasopressin sin effekt VS noradrenalin sin effekt på andre inflammatoriske markører ved lengre tid enn 24 timer. • Mange av cytokinkonsentrasjonene var under lower detection limit, som betyr at de ikke ble detektert. Det var snakk om rundt 20% av verdiene lå under LDL. • Kløsteranalyse og hovedkomponent analyse ga like subgrupper for cytokinene, men var ikke identiske. <p>Har resultatene plausible forklaringer?</p>
--	---	--	--

Referanse: Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. Crit Care. 2007;11(2): R49.		Design: Kohortestudie	
		Dokumentasjonsnivå	3
		GRADE	😊
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer
<p>Formålet var å bestemme plasmakonsentrasjonen av 17 cytokiner for pasienter med alvorlig sepsis ved bruk av multiplex.</p>	<p>Rekruttering av deltagere: Inkluderte 60 pasienter prospektivt med nylig diagnostisert alvorlig sepsis.</p> <p>Inklusjonskriterier var pasienter som hadde oppfylt kriteriene innenfor SIRS (Systemisk inflammatorisk respons syndrom), APACHE II skår, SOFA skår og hadde en åpenbar kilde til infeksjon.</p> <p>Eksklusjonskriterier var pasienter under 18 år og ved død innen 6 timer.</p> <p>Det var ingen intervensjon med i studiet.</p> <p>Datagrunnlaget Blodprøver ble samlet inn med et intervall på 10-12 timer ved bruk av arteriekran eller perifer vene. Multiplex kit fra Bio-Rad. Analyserte IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IFN-γ, G-CSF, MCP-1, makrofag inflammatory protein-1 og TNF-α. Disse ble analysert etter produsentens instruksjoner.</p>	<p>Hovedfunn Multiplex klarte å detektere cytokiner i 710 av cytokinene i de individuelle plasmaene fra de 60 pasientene. Man så en økt konsentrasjon av IL-6, IL-8, IL-10 OG MCP-1 i 95% av analysene. Generelt var det en økning i både pro- og antiinflammatoriske cytokiner.</p> <p>Studiet evaluerte cytokinkonsentrasjonen mot alvorlighetsgraden av akutt organsvikt, bedømt etter SOFA skåren. Det var best korrelasjon med IL-8 og MCP-1 og SOFA skår på dag 1 (r= 0,50 og 0,43, P<0,01).</p> <p>Ut fra de 17 cytokinene som ble studert, var 5 cytokiner signifikant forhøyet hos de ikke overlevende (IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8 og MCP-1). Fra regresjonsanalysen var det MCP-1 og APACHE-II skåren assosier med økt dødelighet.</p> <p>Bifunn Av de 60 pasientene som var med i studiet, 31 pasienter overlevde og 29 pasienter døde. 9 pasienter døde innen de første 48 timene. Pasientene som døde hadde høyere APACHE II og SOFA skår enn forventet. Agens var detektert i 50 av de 60 pasientene, hvor man så en dominans av Gram – negative bakterier.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Var gruppene sammenliknbare i forhold til viktige bakgrunnsfaktorer? Tok med bakgrunnsfaktorer slik som hvilken tilstand innenfor sepsis, alder og kjønn. • Er gruppene rekruttert fra samme populasjon/befolkningsgruppe? Ja • Var de eksponerte individene representative for en definert befolkningsgruppe/populasjon? Ja • Var studien prospektiv? Ja • Ble eksposisjon og utfall målt likt og pålitelig i de to gruppene? Nei • Ble mange nok personer i kohorten fulgt opp? Ikke angitt i studiet. . • Er det utført frafallsanalyser? Nei • Var oppfølgingstiden lang nok til å påvise positive og/eller negative utfall? Ikke angitt i studiet. • Er det tatt hensyn til viktige konfunderende faktorer i design/gjennomføring? Nei • Er den som vurderte resultatene (endepunktene) blindet gruppetilhørighet? Nei • Viser forfatterne til annen litteratur som styrker/svekker resultatene? Ja • Har resultatene plausible biologiske forklaringer? Ja
Konklusjon			
Cytokinkonsentrasjonen kan gi informasjon om den inflammatoriske prosessen forbundet med organ dysfunksjon, samtidig info om tidlig eller sen mortalitet.			
Land			
Rio de Janeiro, Brasil			
År			
År: 2007	<p>Utfall (outcome) Om cytokiner kunne forutsi utfallet, ved død som oppstår de første 48 timene eller ved organsvikt. Studiet sammenlignet cytokinprofiler ved alvorlig sepsis, septisk sjokk, organsvikt og ved død.</p>		

Statistiske metoder:
Brukte SPSS og GraphPad Prism

Hva diskuterer forfatterne som.
Styrke: Forfatterne tar ikke opp noe styrke i studiet.

Svakhet
Liten populasjonsgruppe, liten generaliserbarhet, kun et tidspunkt ble brukt for måling av cytokiner.