



Det Helsevitenskapelige fakultet

Viridans gruppe streptokokker – inflammatorisk respons i en blodmodell

Bjørn Martin Broback

Masteroppgave i medisin, MED-3950, vår 2022.

Veileder: Professor Claus Klingenberg, IKM

Biveileder: Førsteamanuensis Jorunn Pauline Cavanagh, IKM

Biveileder: Førsteamanuensis Hildegunn Norbakken Granslo, IKM

Forord

Denne oppgaven er masteroppgaven i medisin, som skrives på 5. studieår ved Universitetet i Tromsø (UiT), Norges Arktiske Universitet.

Før jeg begynte på medisinstudiet hadde jeg tenkt at jeg skulle jobbe med barn. En av årsakene til valg av dette studiet var muligheten det gir for å kunne jobbe med barn. Derfor følte det naturlig for meg å skrive masteroppgaven min i pediatrik retning. Jeg tok kontakt med Trond Flægstad og Pediatrik forskningsgruppe ved UiT og jeg ble satt i kontakt med infeksjonsgruppen som la frem forslaget om denne oppgaven.

Jeg vil takke mine veiledere Claus Klingenberg, Hildegunn Norbakken Granslo og Jorunn Pauline Cavanagh for god oppfølging, gode tilbakemeldinger, veiledning i statistikk og muligheten for å kunne skrive denne oppgaven. Setter også veldig pris på at jeg har fått være med på forskningsgruppens møter. Det gjorde at jeg har følt meg veldig godt tatt imot. På laboratoriet har jeg fått god og tett oppfølging av både Pauline og Ina Isabell Høiland. Dere har vært ivrige veiledere for opplæring og gjennomføring av forsøkene. Tusen takk for at dere var så til stede og gode veiledere mens forsøkene pågikk. Takk til Trine Kalstad som var veldig hjelpelig med bruk av Luminex/Bio-plex og analyse av resultater. Jeg er veldig takknemlig for alle ressursene, tiden og økonomien som har blitt lagt tilrette for at jeg skulle få gjennomføre og skrive denne oppgaven.

Jeg vil også takke Elen Naomi Våga Lwin for et godt samarbeid. Vi har samarbeidet godt, og delt frustrasjoner, stress og ikke minst gode opplevelser på labben sammen. Har vært veldig fint å kunne jobbe sammen med deg på laboratoriet, og vært godt å ha deg som labpartner.

Og ikke minst, takk til kona mi Kristin som har oppmuntret og motivert meg med skriveingen, og til datteren min Signe som har gjort at jeg har tenkt på andre ting når jeg har kommet hjem fra universitetet. Det har vært viktig for meg.



Bjørn Martin Broback

Tromsø 29.05.2022

Innhold

1	Sammendrag	4
2	Bakgrunn	5
2.1	Bakterier som kan gi sykdom hos nyfødte og immunsvekkede	5
2.1.1	Viridans gruppe streptokokker	5
2.1.2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	6
2.1.3	Gruppe B streptokokker	7
2.2	Immunforsvaret	8
2.2.1	Det medfødte immunforsvaret	8
2.2.2	Det adaptive immunforsvaret	9
2.2.3	Immunforsvaret hos nyfødte	10
2.2.4	Immunsupprimerte barn	10
2.3	Early onset sepsis – hos nyfødte.....	11
2.4	Infeksjoner hos immunsupprimerte	11
2.5	Formål.....	12
3	Material og metode.....	13
3.1	Populasjon og blodprøvetaking	13
3.1.1	Inklusjonskriterier	13
3.1.2	Prøvetaking.....	13
3.2	Overnattkultur.....	13
3.3	Varmeinaktivering:.....	14
3.4	Vasking av bakterier	15
3.5	Telling av bakterier.....	15
3.6	Blodmodellen.....	16
3.7	Analyse av cytokiner	17
3.8	Vurdering av resultater til statistikk	17

3.9	Etikk.....	18
3.10	Statistikk	18
4	Resultater.....	19
5	Diskusjon.....	21
5.1	Diskusjon immunrespons	21
5.2	Diskusjon av metodedel og begrensinger:.....	22
5.3	Diskusjon egne erfaringer fra arbeid i laboratorier	24
6	Konklusjon	26

Tabelliste

Tabell 1:	Inndeling av viridans gruppe streptokokker (VGS).....	31
Tabell 2:	Oversikt over blodmodellen.....	32
Tabell 3:	VGS sammenlignet med GBS og <i>S. haemolyticus</i> og sammenligning av to og fire timer inkubasjon for VGS.	33
Tabell 4:	Negativ kontroll sammenlignet VGS, GBS og <i>S. haemolyticus</i>	34
Tabell 5:	Sammenligning av GBS og <i>S. haemolyticus</i> og sammenligning av to og fire timer inkubasjon for GBS og <i>S. haemolyticus</i>	35
Tabell 6:	Sammenligning ved bruk av Luminex og Bio-plex immunoassay.	36

Figurliste

Figur 1:	Oversikt over komplementsystemet.	37
Figur 2:	Virkemekanismen til multiplex immunoassay	38
Figur 3:	Oversikt over IL-6 utskillelse.....	39
Figur 4:	Oversikt over IL-8 utskillelse	40
Figur 5:	Oversikt over TNF- α	41

Vedlegg

Vedlegg 1:	Informasjonsskriv «Eksperimentelle bakterielle infeksjoner – studier i en blodmodell»	42
Vedlegg 2:	Vedtaksbrev REK	46

1 Sammendrag

Bakgrunn: Viridans gruppe streptokokker (VGS) er en heterogen gruppe med bakterier som er sett på som opportunistiske bakterier. De har nå blitt en vanligere årsak til alvorlig sepsis hos nyfødte og immunsupprimerte barn. Formålet med denne studien er å sammenligne immunresponsen til en VGS bakterie (*Streptococcus mitis*) mot en gruppe B streptokokk (GBS) og *Staphylococcus haemolyticus* i en *ex vivo* blodmodell.

Metode: Blod fra friske voksne mennesker (n=9) ble studert i en *ex vivo* blodmodell. Jeg benyttet bakterier isolert fra kliniske infeksjoner; *Streptococcus mitis*, gruppe B streptokokk og to stammer av *S. haemolyticus*. Bakteriene ble varmeinaktivert før bruk. Multiplex immunoassay ble brukt for analyse av utskillelse av tre pro-inflammatoriske cytokiner (IL-6, IL-8 og TNF- α) etter stimulering med de ulike bakteriene i to eller fire timer. Wilcoxon Signed-Rank test ble brukt for statistiske analyser.

Resultater: GBS har en høyere utskillelse av TNF- α sammenlignet med VGS ($p = 0,028$) etter fire timer inkubasjon. Det var ingen forskjell i utskillelse av cytokiner mellom VGS og *S. haemolyticus*. For VGS var det økt utskillelse av IL-6 ($p=0,012$) og IL-8 ($p=0,025$) etter fire timer sammenlignet med to timer for VGS.

Konklusjon: I denne oppgaven fant jeg at GBS ga høyere utskillelse av TNF sammenlignet med VGS. Alle bakteriene analysert ga klar immunrespons sammenlignet med kontroller, som tegn på at blodmodellen med varmeinaktiverte bakterier fungerte. Det var bedre respons etter fire timer, slik at lengre inkubasjon vil være best med tanke på fremtidige forsøke. Studier i blod fra relevante pasientgrupper (navlestrengsblod og blod fra barn med kreft) vil i fremtiden være nyttig for å gi oss økt kunnskap og forståelse av immunologisk respons på VGS.

2 Bakgrunn

2.1 Bakterier som kan gi sykdom hos nyfødte og immunsvekkede

Oppgaven fokuserer på Viridans gruppe streptokokker (VGS) som kan gi sykdom hos nyfødte og immunsupprimerte. Jeg har spesifikt undersøkt hvilken immunrespons VGS gir i en sepsis fullblodsmodell. I oppgaven har jeg sammenlignet immunresponsen opp mot to andre bakterier, gruppe B streptokokker (GBS) og *Staphylococcus haemolyticus*, som også kan gi infeksjoner i samme pasientgruppe. Av den grunn vil alle tre bakteriegruppene omtales først i denne oppgaven.

2.1.1 Viridans gruppe streptokokker

Viridans gruppe streptokokker er en heterogen gruppe streptokokker som i hovedsak er α -hemolytiske, de produserer en grønnaktig farge på blodagaren og har derav fått tilnavnet viridans som på latin betyr grønn (1). De er Gram-positive, klumper seg sammen i kjeder og er katalase negative (2). Viridans-gruppen omfatter ca 20 ulike arter som deles inn i 5 hovedgrupper; *Streptococcus salvarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus sanguinis* og *Streptococcus mutans* og disse gruppene omfatter en rekke bakterier (**Tabell 1**) (2). Klassifiseringen av VGS er kompleks og litteraturen spriker når det kommer til antall hovedgrupper og antall arter (3).

I en studie av Facklam (2) ble det inkludert 26 ulike streptokokker innenfor VGS. Det ble også inkludert bakterier som hadde opprinnelse fra andre arter enn menneske siden man hadde sett at noen av disse kan føre til infeksjon hos mennesker. For at de skulle regnes som VGS skulle de fenotypisk være; leucine aminopeptidase positive, pyrrolidonylarylamidase negative og ikke gi vekst i 6,5% NaCl løsning (2).

VGS er en del av normalfloraen til mennesker og finnes i munnhulen, luftveiene og mage-tarm trakten. De regnes som opportunistiske bakterier (4). Det er særlig ved redusert immunforsvar som hos immunsupprimerte pasienter, premature og nyfødte barn at disse bakteriene kan føre til alvorlig sykdom (5).

Ulike virulensfaktorer hos bakterier gjør det mulig for bakterien å overleve i verten og forårsake sykdom. VGS er en heterogen gruppe med bakterier og har derfor noen ulike, men også en del felles virulensfaktorer:

- i) Adhesiner er generelt viktig for bakteriens evne til å feste seg og kolonisere verten. VGS uttrykker i stor grad adhesiner, og har god evne til å feste seg til vevet (6-8).
- ii) *S. mitis* danner IgA1 protease som kløyver IgA antistoff, og på den måten unngår de immunforsvaret (6).
- iii) Dannelse av kapsel er en annen virulens egenskap hos VGS som bidrar til å unngå immunforsvaret (7).
- iv) Enkelte VGS har en svært god evne til å danne biofilm som kan bidra til å unngå immunforsvaret og gjør at bakteriene fester seg til tenner, hjerteklaffer og katetre (8).
- v) VGS kan også binde seg direkte til trombocytter, og på den måten fraktes rundt i blodet noe som kan føre til endokarditt (6, 8).

VGS som lever i munnhulen blir ofte utsatt for oral antibiotika når verten bruker dette. For å kunne overleve kan VGS som koloniserer pasienten utvikle eller erverve ulike resistensmekanismer som respons på antibiotika-bruken og på den måten kan VGS danne et reservoar av antibiotikaresistente bakterier. VGS kan overføre resistensgener til andre arter, som den mer virulente *Streptococcus pneumoniae* (4). Ved en eventuell senere immunsuppresjon kan pasientene også få infeksjoner med antibiotikaresistente VGS som er en del av normalfloraen til pasientene.

2.1.2 *Staphylococcus haemolyticus*

Staphylococcus haemolyticus er en koagulase negativ stafylokokk (KNS) som betyr at den ikke produserer koagulase. *S. haemolyticus* og en rekke andre KNS-arter er en del av vår normalflora. I motsetning til eksempelvis *Staphylococcus aureus* er *S. haemolyticus* en opportunistisk og lavvirulent bakterie, som i hovedsak gir sykdom hos pasienter med redusert immunforsvar som premature, nyfødte og immunsupprimerte (9, 10).

S. haemolyticus har en god evne til å danne biofilm og dette er en viktig virulensfaktor for bakterien. Biofilm gjør at bakterien har evne til å kunne feste seg på blant annet fremmedlegemer i kroppen. En studie har vist at kliniske stammer av *S. haemolyticus* har tendens til å danne mer biofilm enn normalflora (kommensale) stammer (11). Enkelte *S. haemolyticus* har også en evne til å danne kapsel. Kapsel kan beskytte bakterien mot å bli fagocyttert. Det er vist at enkelte av *S. haemolyticus* stammene har en kapsel som har over

70% likhet med genene som er med i produksjonen av kapsel hos den høyvirulente fetteren, *S. aureus* (10).

S. haemolyticus har god evne til å tilegne gener som koder for antibiotikaresistens. Det er i en studie vist at 89% av kliniske stammer var resistente mot betalaktam antibiotika og 85% var rasistene mot aminoglykosider, hvorav 82% var resistente mot både betalaktamer og aminoglykosider (12). Flere av resistensgenene i *S. haemolyticus* befant seg på mobile genetiske elementer (10).

2.1.3 Gruppe B streptokokker

Gruppe B streptokokker (GBS) er en ledende årsak til early-onset sepsis (EOS) og andre alvorlige tilstander som pneumoni og meningitt hos nyfødte. Dette til tross for at man i enkelte land har målrettet forebyggende tiltak mot GBS ved fødsel (13). GBS er en opportunistisk bakterie, og det finnes 10 forskjellige serotyper med ulike virulens egenskaper (14). Opp mot en tredel av den voksne befolkningen er bærere av GBS som kan kolonisere tarm og genitalia. Hos gravide kvinner som er kolonisert med GBS i underlivet kan GBS vandre opp til livmoren (oppadstigende infeksjon) og forårsake prematur fødsel, dødfødsel eller alvorlig infeksjon hos det nyfødte barnet, spesielt etter vannavgang når de beskyttende hinnene rundt fosteret er brutt (på engelsk: rupture of membranes) (15).

GBS har gode adhesjonsegenskaper. Den kan feste seg til blant annet laminin og fibrinogen. Dette gjør at den har gode muligheter til å feste seg og starte biofilmdannelse (16, 17). Hemolysin er en annen virulensfaktor som GBS benytter seg av for å invadere verten. Hemolysin fremmer GBS evne til å bryte gjennom amnionepitel og dermed kunne komme til fosteret i amnionsekken (18). Hyaluronsyre er en barriere som den gravide kan produsere for å beskytte fosteret mot oppadstigende infeksjoner (19). GBS kan skille ut hyaluronan-lyase som bryter ned hyaluronsyre. Dermed har GBS mulighet til å bryte gjennom en av vertens barrierer og lettere kunne føre til oppadstigende infeksjon hos en gravid kvinne (15). Per i dag er de fleste GBS følsomme for penicillin, og penicillin brukes som førstevalg ved intrapartum antimikrobiell profylakse (IAP). I enkelte land har man de siste årene sett økning i penicillinresistens blant GBS, samt økning i resistens mot andrevalg antibiotika som erytromycin og klindamycin (20).

2.2 Immunforsvaret

Immunforsvaret inndeles ofte i det medfødte og det adaptive immunforsvaret.

2.2.1 Det medfødte immunforsvaret

Det medfødte immunforsvaret består av cellulære komponenter som granulocytter, monocytter, makrofager og dendrittiske celler, og løselige proteiner som komplementproteiner. Dette er menneskers førstelinjeforsvar imot fremmede mikroorganismer (21).

Makrofager og dendrittiske celler skiller fremmede celler fra egne celler ved hjelp av *pattern recognition receptors (PRR)* som kjenner igjen *pathogen associated molecular patterns (PAMPs)* på overflaten av mikrober som normalt ikke er til stede i kroppen. I tillegg har både nøytrofile granulocytter og makrofager reseptorer for komplement og antistoffer slik at når komplementproteiner eller antistoffer har festet seg til overflaten av mikroorganismen (=opsonisering) bidrar disse til gjenkjenning og fagocytose av mikroorganismene (22).

Komplementsystemet sine hovedoppgaver er 1. opsonisering av patogener, 2. lysing av patogener og 3. fremme inflammasjon. Komplementsystemet kan bli aktivert på 3 måter; klassisk-, lektin- og alternativ reaksjonsvei (**Figur 1**) (23). Den klassiske reaksjonsveien blir aktivert gjennom C1q, en komponent av C1, enten ved direkte gjenkjenning av bakterielle overflatestrukturer som lipid A og beta-sheet amyloide fibriller. Eller den kan bli aktivert ved å binde direkte til IgG eller IgM antistoffer som er bundet til overflaten av bakterien. Lektin reaksjonsveien blir aktivert ved at mannose-bindende lektin (MBL) binder til bakterieoverflaten. Den alternative reaksjonsveien blir aktivert ved tilstedeværelse av en bakteriell overflate (24). De tre ulike veiene møtes nå i det man får aktivering av C3. C3 blir spaltet, og den ene hovedkomponenten C3b sørger for opsonisering av bakterien. Videre blir C5 aktivert og spaltet til C5a som har kjemotaktisk virkning og C5b. C5b-C9 danner et membran-angreps kompleks, som fester seg i bakteriemembranen og medfører cellelysering, *terminal-complement complex (TCC)* (22).

2.2.1.1 Cytokiner

Cytokiner er proteiner som hovedsakelig blir skilt ut av antigenpresenterende celler (APC) som makrofager og dendrittiske celler. Cytokiner har potensiale for blant annet vekst, differensiering og styring av immunresponsen. Cytokinene kan bli induisert av mange ulike

patogener og de virker på flere ulike målceller, de er altså pleiotropiske (25). Når et menneske er friskt og ikke har noen infeksjon er det lave, eller ikke målbare nivåer av cytokiner, mens ved sykdom kan konsentrasjonen av cytokiner øke kraftig (26).

Cytokiner kan deles inn i flere grupper, blant annet proinflammatoriske og antiinflammatoriske cytokiner. Det vil si at det er noen cytokiner som fremmer inflammasjonsresponsen, mens andre vil hemme den (25).

I tillegg til at patogener påvirker produksjonen av cytokiner, er det også flere andre faktorer som spiller inn; blant annet biologiske faktorer som alder og kjønn, i tillegg til genetiske faktorer og sesongvariasjoner (26)

2.2.2 Det adaptive immunforsvaret

Det adaptive immunforsvaret består i hovedsak av B- og T-lymfocytter. Det er disse cellene som bidrar med den immunologiske hukommelsen. Disse cellene kan kjenne igjen mange ulike mikroorganismer grunnet genetisk rekombinasjon av reseptorene (27). Det adaptive immunforsvaret bruker lengre tid på å bli aktivert. Aktivering av det adaptive immunforsvaret skjer ved at APC, som for eksempel dendrittiske celler fra det medfødte immunforsvaret presenterer antigen (28).

I utvikling av B-lymfocytter kan man dele disse inn i B1 og B2 celler. B1 cellene utvikler seg først og er de som produserer antistoffer som IgM. IgM er mer polyreaktive, har lavere affinitet, men kan kjenne igjen noe flere ulike antigener. B2 cellene uttrykker IgM og IgD til de møter på antigen. Ved aktivering starter dannelsen av et germinalt senter hvor det vil skje et immunoglobulin skifte, og de begynne å produsere IgG, IgA og IgE. Somatisk hypermutasjon gjør at disse antistoffene blir veldig spesialiserte til å kjenne igjen en type antigen. B-cellene kan produsere både bundet antistoff, festet på overflaten til B-lymfocytten, eller løselige sirkulerende antistoffer (22).

T-lymfocytter har i motsetning til B-lymfocytter kun membranbundet antistoff som danner T-celle reseptoren. CD4+ T-celler binder til *major histocompatibility complex klasse 2* (MHC 2) og har funksjon som hjelperciller, mens CD8+ T-celler binder til MHC 1 og har en cytotoksisk effekt (22). Det finnes også T-regulatoriske celler som er viktig i utviklingen av immunologisk selvtoleranse (29).

2.2.3 Immunforsvaret hos nyfødte

Immunforsvaret hos nyfødte karakteriseres av at det er umodent ved fødsel og at det utvikler seg gjennom livet mot et mer modent forsvar. Immunforsvaret ved fødsel er mindre effektivt i forhold til immunforsvaret hos en voksen. Dette er fordi immuncellene i det medfødte immunforsvaret dannes og modnes i til ulik tid i fosterlivet og etter fødselen (21). Nøytrofile granulocytter hos nyfødte er både færre i antall og de fungerer dårligere enn hos voksne. Nøytrofile granulocytter har blant annet dårligere evne til fagocytose (29) dårligere evne til å initiere kjemotaksi (30) og har nedsatt evne til å danne *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)* og dermed dårligere evne til ekstracellulært drap av bakterier (31). Samtidig har også nyfødt lavere konsentrasjoner av komplement enn eldre (21).

Nyfødte har færre lymfocytter enn voksne, både B- og T- lymfocytter. I tillegg er lymfocytene hos nyfødte relativt umodne i sin funksjon. Blant annet har nyfødte høyere andel av naive T-celler, og mindre andel av T-hukommelsesceller. Det nyfødte barnet trenger tid på å få flere og modne lymfocytter (32).

På en måte kan man si at immunforsvaret er umodent ved fødsel. På den andre siden er immunforsvaret akkurat slik det må være ved fødselen. Immunforsvaret til et foster og nyfødt har dårligere egenskaper mot patogener, men det har en toleranse mot de maternelle omgivelsene *in utero*. Fosteret og mor lever i et semi-allogenisk samvær fordi fosteret har halvparten av genomet sitt fra far og halvparten fra mor. Fosteret er derfor avhengig at immunforsvaret er delvis «supprimert» for å ha toleranse mot mor og dermed unngå en tilstand med systemisk inflammasjon. Dette viser kompleksiteten til immunforsvaret hos fostre og nyfødte der samværet med mor og beskyttelsen mot mikrober står opp mot hverandre (33).

2.2.4 Immunsupprimerte barn

Pasienter med hematologiske kreft som behandles med cellegift får hemmet/reduert funksjon både i det medfødte og adaptive immunforsvaret. En alvorlig bivirkning med bruk av cytostatika er at pasienten kan utvikle nøytropeni (viktig i forsvaret mot bakterielle infeksjoner) og disse pasientene har en stor risiko for å utvikle alvorlige infeksjoner. Bruken av kjemoterapi kan påvirke de nøytrofile granulocyttenes evne til å fagocyttere og dermed reduserer deres evne til å drepe intracellulære mikroorganismer. Det er også mulig at

pasienten får defekter innenfor andre cellelinjer som B- og T lymfocytter som kan føre til hypogammaglobulinemi (34). Lavt nivå av immunoglobuliner fører til redusert aktivering av komplementsystemet gjennom den klassiske reaksjonsvei. Konsekvensen av dette er mindre opsonisering og redusert evne til fagocytose, særlig ved for eksempel kapselkledd bakterier som *S. pneumoniae* (35).

2.3 Early onset sepsis – hos nyfødte

Neonatal sepsis defineres som sepsis innen de første 28 dagene til den nyfødte. Når det gjelder early-onset sepsis (EOS) spriker det i litteraturen mellom å definere det som debut i de første 72 timene eller innen første leveuke (36, 37). EOS fører til høy mortalitet og morbiditet hos nyfødte. For tiden er det GBS og *E. coli* som er de to mest vanlige årsakene til EOS (37). Til tross for at man har en målrettet profylakse (IAP) mot GBS, forblir GBS en av de vanligste årsakene til EOS (38).

Bakteriene som forårsaker EOS koloniserer ofte genitaltraktus hos moren, og kan dermed føre til infeksjon. Det er flere risikofaktorer for å utvikle EOS, både faktorer hos mor og den nyfødte; prematur fødsel, lav fødselsvekt, langvarig fostervannavgang (PROM; premature rupture of membranes) over 18 timer og kjent genitalt bærerskap av GBS under svangerskapet (13).

VGS er også relativt vanlig årsak til EOS. I en norsk studie så man at 3 av 5 positive blodkultur sepsiser var VGS (39). I en Sør-afrikansk studie fant de VGS i 24% av tilfellene med EOS. Det var den nest hyppigste Gram-positive bakterien etter GBS, og også totalt sett den nest hyppigste årsaken til EOS (40). Imidlertid er det også flere studier der man ikke finner VGS ved EOS (38) eller en betydelig lavere andel med VGS (41, 42). Vår kunnskap om VGS som en årsak til EOS er begrenset og derfor vil videre forskning på denne bakterien i nyfødt setting være viktig.

2.4 Infeksjoner hos immunsupprimerte

Hos barn med hematologisk- og onkologiske sykdommer er VGS i dag en hyppig årsak til bakteriemi. Risikofaktorer for å utvikle en VGS-bakteriemi er behandling med høydose

cytarabin og generelt hos barn som er alvorlig nøytropene og under behandling for kreft (43). En komplikasjon ved VGS-bakteriemi er at pasienten kan utvikle et VGS-sjokk syndrom. Dette er en tilstand med hypotensjon og akutt respiratorisk distress syndrom. Tilstanden har høy mortalitet. De beste prediktorene for utvikling av VGS-sjokk syndrom i en studie var temperaturtopp før antibiotika og inneliggende pasient når symptomene startet (44).

2.5 Formål

Det er generelt lite forskning på VGS og dermed lite kunnskap om VGS sin evne til å forårsake sykdom.

Hovedformålet med denne oppgaven er å undersøke VGS bakterien *S. mitis* i en *ex vivo* fullblodsmodell og sammenligne immunresponsen (cytokinutskillelse) med en GBS-stamme og to ulike *S. haemolyticus* stammer.

Forsknings spørsmål: Vil *S. mitis* vise en immunrespons som ligner mere på profilen til «høy-virulente» GBS eller mere på profilen til «lav-virulente» *S. haemolyticus*?

Det er ytterligere to andre mål med denne oppgaven:

- For forskningsgruppen var det også viktig å etablere forsøk med VGS i denne blodmodellen med tanke på videre mere «klinisk rettede» forsøk med blod fra navlesnor (nyfødte) og blod fra barn med nøytropeni.
- Personlig ønsket jeg å tilegne meg erfaring med immunologiske og mikrobiologiske laboratorieeksperimenter slik at jeg senere i yrkeskarrieren som lege kan ha større forståelse av slik viktig basalforskning.

3 Material og metode

3.1 Populasjon og blodprøvetaking

Vi rekrutterte 10 friske voksne bloddonorer blant medstudenter og deltagere i forskningsgruppen. Alle donorer ble informert om prosjektet (**Vedlegg 1**) og skrev under på et samtykkeskjema. Av de 10 donorene fikk vi kun analysert blod fra 9, og det ble en fordeling med 5 menn og 4 kvinner, med medianalder på 33 år.

3.1.1 Inklusjonskriterier

Deltagerne skulle ikke bruke faste medisiner med unntak av hormonell prevensjon, være friske siste 7 dager, ingen kroniske sykdommer, fastende og ingen hard fysisk aktivitet tidligere på dagen, og skrevet under samtykke.

3.1.2 Prøvetaking

Blodet ble samlet inn ved venøs blodprøvetaking uten stase. Det ble benyttet blodprøveutstyr der blodet kom direkte fra nålen (Becton Dickson, Plymouth, Storbritannia) over i heparinvakumrør, 6 ml (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Østerrike) og ikke gjennom en slange som ved «butterfly». Dette for å forhindre en eventuell aktivering av immunrespons i en slange. Ved tilfeller der det ikke lot seg gjøre å samle inn 5 heparinvakumrør fra ett stikk, ble prosessen startet på nytt slik at man fikk alle vakumrørene fra samme nye venøse stikk. Dette ble gjort for å sikre mest mulig lik prøvetaking på alle deltagerne. Fra blodet ble tappet til det ble tilført i blodmodellen (se 3.6) skulle det ta kortest mulig tid.

3.2 Overnattkultur

Formålet med overnattkultur var å få oppvekst av en tilstrekkelig mengde med bakterier som kunne benyttes videre i forsøket. Alle bakteriene vi har brukt i dette forsøket er fra blodkulturer tatt av pasienter som har hatt klinisk sykdom:

- *S. mitis* (Mikrobiologisk avdeling, UNN, Tromsø, Norge)
- GBS (serotype III SO-SAG18-1, Norges GBS referanse laboratorium, Trondheim, Norge)
- *S. haemolyticus* 25-63 (uten kapsel, K-) (Mikrobiologisk avdeling, UNN, Tromsø, Norge)

- *S. haemolyticus* 53-38 (med kapsel, K+) (Mikrobiologisk avdeling, UNN, Tromsø, Norge)

For å lage overnattkultur av *S. mitis* brukt vi 1900 ml av vekstmediet; Brain Heart Infusion (BHI) fordelt i 3 kolber. For overnattkultur av *S. haemolyticus* stammene brukte vi 500 ml av vekstmediet Tryptic Soy Broth (TSB) til hver av de to stammene i to separerte kolber. Vi tok bakterier fra blodagarskål og tilsatte dem i vekstmediet. Kolbene med bakterier og vekstmediet ble satt på en risteinkubator (Benchmark Incu-shaker 10LR, Sayreville, USA) ved 37°C over natten. Grunnen til at vi lagde så mye overnattkultur av *S. mitis* var at vi ved tidligere forsøk med mindre vekstmedium ikke fikk tilstrekkelig mengde vekst av bakterier og ønsket derfor større mengde av bakterier.

GBS ble tatt fra forskningsgruppens fryser og var allerede varmeinaktivert.

3.3 Varmeinaktivering:

Formålet med varmeinaktivering av bakteriene var å sørge for at bakteriene dør uten at celleveggen ble skadet. Dermed hadde vi døde bakterier med intakt cellevegg. Da kan ikke bakteriene produsere noe materiale og har mistet muligheten til å formere seg. Dermed fikk vi kontroll på mengden av bakterier vi ønsket å bruke i forsøket.

Varmeblokken (Grant QBD4, Cambridge, Storbritannia) ble satt på 60°C (61°C for *S. haemolyticus* stammene). Vekstmediet og bakterie ble overført til sterile en liters rør. Ett rør ble benyttet per bakterie.

Rørene ble sentrifugeret (Beckman Coulter Avanti J-26 XP centrifuge, Brea, USA) ved 3220 Relative Centrifugal Force (RCF) i 15 min ved 4°C. RCF er tilsvarende G-kraft. *S. mitis* ble sentrifugert 2 ganger for å få dannet en tydeligere og kraftigere pellet. Vi overførte pelleten til to 50 ml rør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) for hver av de ulike *S. haemolyticus* stammene og 1 rør for *S. mitis*. Vi tilførte 50 ml phosphate-buffered saline (PBS: Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) uten kalsiumklorid og magnesiumklorid som var passende for cellekulturer. De ble sentrifugert (Eppendorf Centrifuge 5430R, Hamburg, Tyskland) på 3220 RCF i 15 minutter ved 4°C. Deretter helte vi av supernatanten og resuspenderte med 18 ml PBS. Bakteriene ble fordelt i 10 små 1,8 ml NUNC rør (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

USA). Så varmeinaktiverte vi bakteriene i varmeblokken i 90 minutter ved 60°C (61°C for *S. haemolyticus* stammene).

For å kontrollere at varmeinaktivering var vellykket, overførte vi bakterier til en merket sektor på en blodagarskål fra hvert enkelt rør. Blodagarskålene stod over natten ved 37°C for å se om det var vekst av bakterier. *S. mitis* skålene stod i varmeskap (Thermo Fisher Scientific Heracell vios 250i CO₂ Incubator, Waltham, USA) med CO₂ fordi de vokser best med CO₂. For sektorene der det var vekst av bakterier, kastet vi det tilhørende røret. Sektorene hvor det ikke var vekst visste vi bakteriene var varmeinaktiverte og tilhørende rør ble satt i fryser ved -70°C.

Grunnen til at vi hadde 61°C og fordelte pelleten i to rør for *S. haemolyticus* stammene var at det var en stor mengde pellet, og vi ville forsikre oss om at bakteriene ble tilstrekkelig varmeinaktivert.

3.4 Vasking av bakterier

Vasking av bakterier ble gjort for å fjerne mest mulig av materialet som ikke er selve bakterien. Det vil si materiale som bakteriene har produsert og som ligger rundt bakteriene og kan beskytte bakterien mot å bli gjenkjent av immunforsvaret. Da kan vi på en standardisert måte forske på bakteriecellevegens evne til å starte immunrespons.

Ved vasking tok vi et rør med den respektive bakterien som er varmeinaktivert fra fryseren. Alt innholdet i røret ble overført til et 50 ml rør og tilsatt omtrent 50 ml iskald PBS. Røret ble sentrifugert på 3200 G i 10 min ved 4°C. Supernatanten ble helt av og det ble fylt opp med ny PBS. Vi gjentok denne prosessen 5 ganger. Etter siste vask ble pelleten resuspendert i 10 ml PBS og ble satt på kjølerommet ved 4°C.

3.5 Telling av bakterier

Telling av bakterier ble gjort for å finne ut mengden av bakterier vi hadde og hvor mange vi tilsatte i blodet. Det gjorde at det ble en standardisert mengde med bakterier som ble tilsatt.

Telling av bakteriene ble gjort ved at vi tok bakteriene som var vasket og fortynnet det videre 1:500 med PBS. Av den fortynnede løsningen tok vi 2450 µl og overførte det til rør som passer til flowcytometri. Så tilsatte vi 50 µl CountBright® (Life Technologies Corporation,

USA). De ulike bakteriene ble talt gjennom et flowcytometer (BD LSRFortessa™ Cell Analyzer, BD Biosciences, USA). Etter tellingen brukte vi en formel fra CountBright® til å kalkulere mengden med bakterier.

Vi fikk talt opp henholdsvis:

- GBS 4,5 x 10⁸ bakterier/ml,
- *S. mitis* 2,1 x 10⁸ bakterier/ml,
- *S. haemolyticus* K- 3,6 x 10⁸ bakterier/ml
- *S. haemolyticus* K+ 3,4 x 10⁸ bakterier/ml.

Bakteriene ble satt på kjølerom med 4°C for å være klar til bruk i forsøkene.

Før forsøkene fortynnet vi bakteriene med PBS slik at vi tilsatte bakterier i størrelsesordenen 10⁷ bakterier/ml.

3.6 Blodmodellen

Vi benyttet en såkalt *ex vivo* fullblodsmodell. Formålet ved bruken av fullblodsmodellen var undersøke immunresponsen av ulike bakterier i fullblod i en standardisert modell utenfor kroppen, der alle cellene i immunforsvaret var levende og aktive. Siden forsøket startet umiddelbart etter blodet var tappet og gjennomført innen fire timer regner man at det er fysiologiske forhold i blodet og det kan regnes som et *ex vivo* forsøk.

Vi satte opp blodmodellen med 15 rør (VWR, Radnor, USA) merket fra 1-15 (**Tabell 2**). I blodmodellen benyttet vi *S. mitis*, GBS, og *S. haemolyticus* stammene K- og K+ som var varmeinaktivert. For *S. haemolyticus* stammene benyttet vi også levende bakterier i oppsettet. Vi kjørte to parallelle forsøk samtidig siden vi var to studenter (Elen Naomi Våga Lwin; *Staphylococcus haemolyticus* – betydningen av kapsel og biofilmdannelse for immunrespons) som jobbet samtidig med våre oppgaver. Dette gjør at noen av bakteriene, altså de levende (**Tabell 2**) ikke ble vurdert i min oppgave.

Varmeblokken holdt 37°C. Vi tappet blod fra donor, først ett kasteglass, deretter totalt 30 ml blod fordelt på 5 heparinrør à 6 ml. Rørene ble vendt forsiktig slik at heparinet i røret ble fordelt i blodet. 300 µl blod ble overført til rørene (nr. 1-15) som stod i varmeblokken. Da det

var 300 µl blod i hvert av de 15 rørene tilsatte vi i rør 1 (T0) 14,5 µl EDTA, og overførte dette røret direkte til is. Videre ble 60 µl av de ulike bakteriene eller PBS tilsatt i sine respektive rør. Hver bakterie og negativ kontroll hadde et rør som ble inkubert i to timer og et rør som ble inkubert i fire timer i en «rock and roll shaker» (ELMI Intelli-Mixer RM-2L, Riga, Latvia) ved 37°C. Rock and roll shakeren holdt 30 rpm ved 30° vending. Etter to timer ble det tilført 14,5 µl EDTA for å stoppe immunresponsen til rørene som skulle inkuberes i to timer og de ble satt på is. Blodrørene ble så sentrifugert (Beckman Coulter Allegra X-15R, Brea, USA) på 3000 RCF i 20 minutter ved 4 grader. Erytrocytter hadde nå sedimentert og plasma lå øverst. Minst 2 x 75 µl plasma ble overført til to eppendorfrør, 2 ml (Eppendorf, Hambrug, Tyskland) som så ble fryst ned på -70°C. Samme prosedyre ble gjort for blodet med bakteriene som hadde inkubasjon i fire timer.

3.7 Analyse av cytokiner

Vi benyttet «Luminex performance assay» (R&D systems, Minneapolis, USA) og «Bio-Rad; Bio-Plex Pro Human Cytokine 8-plex» (Hercules, USA) for deteksjon av de proinflammatoriske cytokinene IL-6, IL-8 og TNF- α . I disse assayene blir det brukt fargekodete magnetkuler som har ulike antistoff som fester seg til henholdsvis IL-6, IL-8 og TNF- α . Man tilsetter så biotinylerede gjenkjenningantistoff som er spesifikke for de ulike cytokinene, og dermed fester seg til cytokinene som er festet til kulene. Nå er de ønskede cytokinene blitt merket og kan leses av i et gjenkjenninginstrument (Bio RAD Bio-plex 200 system, Hercules, USA) med en dobbel laser. Den ene laseren klassifiserer magnetkulen og sier noe om hvilket cytokin som er oppdaget og den andre laseren sier noe om mengden (**Figur 2**). Dermed kan vi bruke Luminex og bioplex til å kvantifisere mengden IL-6, IL-8 og TNF- α (45).

Analysene med Luminex og Bio-Plex ble gjort i henhold til produsentenes vedlagte protokoller, *R&D Systems, Luminex Performance Assay, Human Cytokine Premixed Kit A* og *Bio-rad; Bio-plex Pro Human Cytokine 8-plex*.

3.8 Vurdering av resultater til statistikk

For cytokinene vi undersøkte leveres det fra produsenten av Luminex Performance Assay og Bio-plex standarder som benyttes til å lage standardkurver og dermed standardmål for i hvilket område cytokinmengden bør ligge. For analysen kjørte vi i utgangspunktet to

parallele prøver, det vil si at vi fikk to svar per prøve og kunne bruke snittet av disse i analysen vår. Grunnet plassmangel var det for enkelte prøver vi kun fikk 1 parallell. Ved gjennomgang av prøvene sammenlignet vi prøvesvarene og så om noen av svarene lå utenfor standardområdet og/eller om det forelå feilkoder. Mange av prøvene hadde lave verdier og ble definert utenfor standardområdet av programvaren. Det gjaldt for eksempel en del av de negative kontrollene og enkelte av bakterieprøvene etter to timer. Disse prøvene vurderte vi til at var i området som vi egentlig forventet; og ble ikke forkastet. De negative kontrollene skulle i liten grad ha aktivering av cytokiner, og bakterieprøvene etter to timer er trolig for tidlig for markant stigning i cytokinene.

Enkelte prøver ble merket som over eller under «out of range (OOR)». For Luminex og Bioplex har produsenten definert maksimum og minimum måle verdi for hvert av cytokinene beregnet ut fra standardkurvene til de enkelte cytokinene. For prøvene som var over OOR benyttet vi maksimalverdien og for prøvene som var under OOR benyttet vi minimumsverdien for de statistiske analysene.

- Luminex maksimalverdier: IL-6 = 4440 pg/mL, IL-8 = 3070 pg/ml, TNF- α = 3880 pg/mL.
- Luminex minimumsverdier: IL-6 = 5 pg/ml, IL-8 = 4 pg/ml, TNF- α = 5 pg/ml
- Bio-Plex maksimalverdier: IL-6 = 5823 pg/ml, IL-8 = 15080 pg/ml, TNF- α = 62382 pg/ml.
- Bio-Plex minimumsverdier: IL-6 = 0,4 pg/ml, IL-8 = 1 pg/ml, TNF- α = 4 pg/ml

3.9 Etikk

Prosjektet har vært vurdert av REK (**Vedlegg 2**) og anses ikke som framleggingspliktig, jf. helseforskningsloven §2.

3.10 Statistikk

For å undersøke om det var forskjeller i immunrespons mellom gruppene benyttet vi oss av en «dependent non parametrisk test», Wilcoxon Signed-Rank test. Siden hver enkelt bloddonor kan ha egne immunologiske karakteristika er det best å bruke en avhengig test. Statistisk signifikans blir definert som $p < 0,05$. For utregning av statistikken benyttet vi «IBM-SPSS Statistics», versjon 28.0 (IBM Nord-Amerika, New York, USA).

4 Resultater

Vi ønsket å se om det var en forskjell mellom VGS og sammenligne den med GBS og *S. haemolyticus*. Vi fant at GBS hadde en høyere utskillelse av TNF- α etter fire timer ($p=0,028$) sammenlignet med VGS.

Vi fant ingen forskjell i utskillelse av IL-6 for VGS sammenlignet med GBS og *S. haemolyticus* (**Figur 3** og **Tabell 3**). VGS førte til en økt utskillelse av IL-6 etter to timer ($p=0,012$) og fire timer ($p=0,008$) inkubasjon sammenlignet med negativ kontroll (**Tabell 4**). VGS medførte en økning av cytokin utskillelse etter fire timer inkubasjon sammenlignet med to timer inkubasjon ($p = 0,012$) (**Tabell 3**).

Det var ingen forskjell i utskillelse av IL-8 for VGS sammenlignet med GBS og *S. haemolyticus* som vist i figur 4 og tabell 3. Ved sammenligning med negativ kontroll var det en forskjell etter to timer inkubasjon der VGS medførte en økning av utskillelse av IL-8 ($p=0,017$), mens det var ingen forskjell etter fire timer inkubasjon (**Tabell 4**). Det var en forskjell mellom inkubasjon på to og fire timer der VGS førte til en økning av IL-8 etter fire timer inkubasjon sammenlignet med to timer inkubasjon ($p = 0,025$) (**Tabell 3**).

GBS medførte en signifikant høyere utskillelse av TNF- α sammenlignet med VGS etter fire timer inkubasjon ($p=0,028$) (**Figur 5** og **Tabell 3**), mens det ikke var forskjell mellom VGS og *S. haemolyticus*. Ved sammenligning med negativ kontroll medførte VGS økt utskillelse av TNF- α etter 2 timer ($p=0,012$) (**Tabell 4**). Det var ingen forskjell mellom inkubasjon av VGS i to eller fire timer for utskillelse av TNF- α .

Ved sammenlign av GBS og *S. haemolyticus* stammene medførte GBS for flere av cytokinene og tidspunktene høyere utskillelse av cytokiner. Sammenlignet med *S. haemolyticus* K- ga GBS en signifikant høyere utskillelse av IL-6 etter fire timer ($p=0,008$), IL-8 etter fire timer ($p=0,038$) og TNF- α etter to timer ($p=0,012$) og fire timer ($p=0,008$). Sammenlignet med *S. haemolyticus* K+ medførte GBS høyere utskillelse av IL-6 etter to timer ($p=0,017$) og fire timer ($p=0,008$). Ved sammenligning av inkubasjonslengde på to og fire timer for GBS var det en signifikant høyere utskillelse av de proinflammatoriske cytokinene etter fire timer sammenlignet med to timer (IL-6; $p=0,012$, IL-8; $p=0,012$, og TNF- α ; $p=0,012$) (**Tabell 5**).

For *S. haemolyticus* stammene var det ingen forskjell i cytokin utskillelse mellom dem. For *S. haemolyticus* K- var IL-6 ($p=0,008$) og IL-8 ($p=0,008$) signifikant høyere etter fire timer sammenlignet med to timer (**Tabell 5**). *S. haemolyticus* K+ var det signifikant høyere verdier av alle tre cytokinene etter fire timer sammenlignet med to timer (IL-6; $p=0,008$, IL-8; $p=0,008$, TNF- α ; $p=0,028$) (**Tabell 5**). Sammenlignet med negativ kontroll førte begge *S. haemolyticus* stammene til høyere utskillelse av IL-6 med fire timer inkubasjon ($p=0,012$ og $p=0,008$) og IL-8 med to timer inkubasjon ($p=0,015$ og $p=0,008$), mens kun *S. haemolyticus* K+ førte til høyere utskillelse av TNF- α med to timer inkubasjon ($p=0,038$) (**Tabell 4**).

Ved sammenligning av Luminex og Bio-plex (**Tabell 6**) lå Bio-plex med høyere konsentrasjon av cytokiner.

5 Diskusjon

5.1 Diskusjon immunrespons

VGS gir en relativ lik cytokin utskillelse sammenlignet med GBS og *S. haemolyticus*, med unntak av at GBS har en høyere utskillelse av TNF- α etter fire timer inkubasjon sammenlignet med VGS. GBS er den av bakteriene som har generelt høyest utskillelse av cytokiner sammenlignet med de andre bakteriene. Det er tidligere vist at GBS sammenlignet med KNS arten *Staphylococcus epidermidis*, ikke medførte forskjeller i cytokin utskillelse for IL-6, IL-8 og TNF- α (46). Våre resultater viser at det er flere forskjeller mellom GBS og *S. haemolyticus*. Det kan tyde på ulike virulensegenskaper for forskjellige KNS. Vi fant ingen forskjeller mellom VGS og *S. haemolyticus*. Andre har sett at ulike VGS stammer har ulik cytokin utskillelse sammenlignet med *S. epidermidis* (47). Hadde vi testet flere VGS stammer kan hende vi ville funnet forskjeller.

VGS, GBS og *S. haemolyticus* stammene vi undersøkte medførte alle en generell økning i utskillelse av de tre proinflammatoriske cytokinene sammenlignet med de negative kontrollene (48), men kan også variere mellom ulike VGS stammer (47). Dette viser at VGS og de andre bakteriene fører til en økt cytokin respons hos verten.

Vi har sett at alle bakteriene fører til en økt cytokinrespons i mer eller mindre grad i blod fra friske voksne donorer. Ettersom disse bakteriene først og fremst gir alvorlig sykdom hos nyfødte og immunsupprimerte barn er det mulig at deres immunforsvar vil gi en annen respons. Immunforsvaret til nyfødte og immunsupprimerte barn er nedregulert i forhold til hos voksne (33), og de kan ha en lavere utskillelse av cytokiner sammenlignet med voksne (48). Mens andre har sett at navlestrengsblod gir en høyere utskillelse av proinflammatoriske cytokiner enn hos voksne (46).

En interessant vinkling med tanke på cytokin utskillelse er muligheten for å bruke det i klinisk utredning og få raskere svar med tanke på mistanke om EOS. GBS har over lang tid blitt sett på som den vanligste årsaken til EOS. Det har blitt sett på muligheten om man kan begynne å se på cytokin utskillelse av proinflammatoriske cytokiner som IL-6 og IL-8 for tidlig å oppdage EOS (49). Ettersom VGS i våre forsøk har en relativ lik cytokin utskillelse profil som GBS er det interessant at man kan vurdere cytokin utskillelse induisert av VGS på samme måte med tanke på EOS.

5.2 Diskusjon av metodedel og begrensinger:

I forsøkene brukte vi en *ex vivo* fullblods sepsis modell for å kunne undersøke immunresponsen med fokus på cytokin utskillelse som respons på tre ulike bakterier i blod fra 9 bloddonorer. For å hindre koagulasjon av blodet må det brukes et antikoagulant. Som antikoagulant benyttet vi heparin. Heparin stimulerer kroppens eget antikoagulasjonssystem ved å danne et kompleks med antitrombin som inhiberer trombin og aktivert faktor X. Dermed hindrer heparin koagulasjon (50). Det var ønskelig å bruke heparin fremfor EDTA og citrat som i større grad binder Ca^{2+} fra blodet. Dersom man fjerner Ca^{2+} ionene fra blodet er ikke blodet like representativt som humant fullblod lenger, og derfor anså vi heparin som bedre antikoagulant for undersøkelse av cytokin utskillelse (51). Vi vurderte om vi kunne bruke et annet produkt som heter lepirudin. Lepirudin er en spesifikk trombinhemmer. Fordelen med lepirudin sammenlignet med heparin er at den ikke har noen innvirkning på komplement kaskaden (51). Siden vi ikke undersøkte aktivering av komplement, men hadde fokus på cytokiner ble det vurdert at heparin var en god nok antikoagulant selv om heparin har vist å ha en effekt på komplement kaskaden (51) Dette er en svakhet med oppgaven siden immunforsvarets enorme kompleksitet og påvirkning av komplement kaskaden trolig vil påvirke cytokin utskillelse i noe grad og at noen cytokiner som IL-8 blir påvirket av komplement (51).

Vi benyttet bakterier som ble inkubert i henholdsvis to timer og fire timer. Det var en signifikant høyere utskillelse av IL-6 og IL-8 etter fire timer for VGS sammenlignet med to timer inkubasjon. GBS og *S. haemolyticus* viser også en økt utskillelse av cytokiner etter fire timer. Dette samsvarer med andre studier der cytokinresponsen av de samme proinflammatoriske cytokinene har vist en høyere utskillelse etter fire timer sammenlignet med to timer (46). På den andre siden viste Granslo et al (52) bruk av navlestrengsblod fra nyfødte som ble utsatt for *S. epidermidis* biofilm fikk en signifikant høyere utskillelse av IL-8 enn hos voksne allerede ved 30 minutters inkubasjonstid.

Det har vært hevdet at det kan være en umoden cytokin respons hos nyfødte sammenlignet med voksne. Det er ikke klarlagt om denne umodenheten skyldes en redusert mengde med immunologiske celler som produserer proinflammatoriske cytokiner hos nyfødte (53) eller om det om det er en ubalanse mellom pro- og antiinflammatoriske cytokiner til enkelte bakterier (48). Dermed er det mye usikkerhet rundt cytokinresponsen hos nyfødte. Selv om enkelte

studier viste en rask økning av enkelte cytokiner hos nyfødte ved kort inkubasjonstid (52), vil det ved videre *ex vivo* undersøkelse av VGS bakterier være fornuftig med fire timers inkubasjonstid for å undersøke cytokinresponsen. Dette fordi flere studier har vist lavere cytokin utskillelse hos nyfødte (48, 53) og for å sikre oss at vi ikke kun får med den aller raskeste utskillelsen av cytokiner.

Det er en kun en begrenset periode på omtrent fire timer denne *ex vivo* blodmodellen klarer å opprettholde fysiologiske forhold. Dermed kan vi maksimalt ha fire timer inkubasjon. Andre studier har vist en økende cytokin respons over tid (54, 55).

På grunn av at vi hadde leveringsvansker av Luminex performance assay fra R&D-systems og begrenset med tid var vi nødt til å bestille de resterende Multiplex immunoassayene fra Bio-Rad. Å benytte to ulike multiplex assayer fra to ulike leverandører i samme studie gjør at svarene vi får blir mer usikre. For å kontrollere at resultatene i noen grad var like tok vi enkelte prøver som var blitt analysert av R&D-systems Luminex og analyserte de på nytt i Bio-Rads Bio-plex. Kontrollene var gjennomgående høyere ved bruk av Bioplex sammenlignet med Luminex. Det er anbefalt at man benytter seg av samme type immunoassay gjennom studien (56). Siden Bioplex generelt viste en høyere utskillelse av cytokiner og vi brukte alle svarene i samme statistikk vil dette påvirke svarene våre.

En annen svakhet ved bruk av en *ex vivo* blodmodell er at vi kun får informasjon om blodet sine immunologiske egenskaper. Immunforsvaret har et komplekst samarbeid mellom ulike organer, og blodet står ikke alene (57). Dermed mister vi i denne type modellen muligheten til å se samarbeidet mellom de ulike organene som bidrar i immunforsvaret under blant annet sepsis. Vi hadde heller ikke telling av leukocytter i vårt oppsett og vet derfor ikke antallet med leukocytter eller fordelingen av de ulike leukocytterne i blodet til de ulike donorene (52). Siden det i stor grad er leukocytter som står bak produksjonen av cytokiner kan en slik forskjell i leukocytter påvirke resultatene.

Vi brukte varmeinaktiverte bakterier for å undersøke cytokinresponsen. Det vil gi oss en god standardisert metode. En annen fordel med varmeinaktiverte bakterier er at man kan ha gjort alt klart og dermed tilsette samme mengde med bakterier hver gang. Imidlertid kan varmeinaktiverte bakterier føre til en endret immunrespons sammenlignet med å ha levende bakterier (58). I søsterstudien til denne, som ble kjørt parallelt oppsett med ble det brukt

levende *S. haemolyticus*. De levende bakteriene hadde en økt cytokinrespons, sammenlignet med den samme bakterien som var varmeinaktivert (personlig kommunikasjon). Ulemper med bruk av levende bakterier er at man ikke kan ha gjort bakteriene klare i forkant og at det er vanskeligere å standardisere antall bakterier. Dette er særlig problematisk dersom det er forsøk på for eksempel navlestrengsblod og forsøket må starte på kort varsel. Ved videre forsøk med VGS vil det være nyttig og interessant å se på bruken av levende bakterier.

Andre feilkilder til studien kan være pipetterings teknikk som har medført at vi har hatt ulikt antall med «beads» (kuler) ved analysen av cytokinene og fått ulike standardkurver. Siden standardkurvene ikke var optimale måtte vi redigere på dem, og dette vil føre til at resultatene endrer seg.

5.3 Diskusjon egne erfaringer fra arbeid i laboratorier

Som en siste del av formålet med denne oppgaven var det et ønske for meg å få erfaringer innenfor basalforskning. Som medisinerstudent er det generelt lite utdanning innenfor basalforskning, og dersom man ikke går forskerlinje eller har bestemt seg for å ta en doktorgrad innenfor basalforskning er det ikke mange læreplattformer for basalforskning på studiet. Derfor var denne oppgaven en god mulighet som masterstudent å få en liten smakebit på basalforskning.

Det å arbeide på laboratoriet har gitt meg en god innsikt i forskningens verden. Jeg har fått erfaringer med blant annet pipettering, håndtering av bakterier, håndtering av en rekke instrumenter og metodeutvikling av forsøk. Totalbildet av forskningen har gjort at jeg har en større forståelse om hva som eksempelvis ligger bak et prøvesvar, og alt arbeidet som ligger til grunne. Selv om det er en tydelig plan og velutviklet metode for forskningen man skal utføre, kan det oppstå flere utfordringer. Det kan være alt fra at bakteriene ikke vokser, at tellemaskinen av bakterier er ute av drift eller at analyseverktøyet ikke leveres. Lærdommen av dette er at ved forskning er det nødvendig å ha god tid fordi det kan oppstå ting som er utenfor ens egen kontroll. Tiden på laboratoriet har også vist meg engasjementet man kan få innenfor ett bestemt tema og ønske om å lære mer om dette eksakte temaet. Det har gitt mye glede i det at en plutselig kommer et steg lengre. Alt i alt har arbeidet med basalforskning vært en positiv opplevelse for meg.

Gjennom forsøkene har min medstudent og jeg lært en hel del om det å gjennomføre dette forsøket. Før forsøkene startet for fullt tørrtrente vi og øvde på akkurat det vi skulle gjøre. Selv med gode forberedelser ble håndtering og metode bedre og bedre etter hvert som forsøkene pågikk. Blant annet ble jeg flinkere til å pipettere ut plasma mot slutten av forsøkene, og fikk mindre forurensing av erythrocytter. Disse prøvene er antagelig minst påvirket av brukerfeil. Ettersom vi ikke fikk analysert alle donorene som først tiltenkt, burde vi startet å analysere de siste prøvene først for å få prøvene som var blitt håndtert best.

6 Konklusjon

I denne studien har vi vist at VGS medført en lavere utskillelse av TNF- α ved fire timer inkubasjon sammenlignet med GBS. Det er ingen forskjell i cytokin utskillelse mellom VGS og *S. haemolyticus* og VGS har derfor en lik cytokin profil som *S. haemolyticus*. Resultatene av min oppgave viser at blodmodell-metoden fungerte for VGS.

Videre forskning på VGS vil gi viktig informasjon om immunrespons og betydning av denne bakteriegruppen.

Referanser

1. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical microbiology reviews*. 1989;2(3):315-28.
2. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(4):613-30.
3. Doern CD, Burnham CA. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol*. 2010;48(11):3829-35.
4. Nakajima T, Nakanishi S, Mason C, Montgomery J, Leggett P, Matsuda M, et al. Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) isolated from the upper respiratory tract of patients in the community. *Ulster Med J*. 2013;82(3):164-8.
5. Basaranoglu ST, Ozsurekci Y, Aykac K, Aycan AE, Bicakcigil A, Altun B, et al. Streptococcus mitis/oralis Causing Blood Stream Infections in Pediatric Patients. *Jpn J Infect Dis*. 2019;72(1):1-6.
6. Mitchell J. Streptococcus mitis: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(2):89-98.
7. Asam D, Spellerberg B. Molecular pathogenicity of Streptococcus anginosus. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(4):145-55.
8. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499-515.
9. Dimitriou G, Fouzas S, Giormezis N, Giannakopoulos I, Tzifas S, Foka A, et al. Clinical and microbiological profile of persistent coagulase-negative staphylococcal bacteraemia in neonates. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(11):1684-90.
10. Takeuchi F, Watanabe S, Baba T, Yuzawa H, Ito T, Morimoto Y, et al. Whole-genome sequencing of staphylococcus haemolyticus uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol*. 2005;187(21):7292-308.
11. Wolden R, Pain M, Karlsson R, Karlsson A, Aarag Fredheim EG, Cavanagh JP. Identification of surface proteins in a clinical Staphylococcus haemolyticus isolate by bacterial surface shaving. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):80.
12. Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T, et al. Biofilm formation by Staphylococcus haemolyticus. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1172-80.
13. Heath PT, Balfour G, Weisner AM, Efstratiou A, Lamagni TL, Tighe H, et al. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *Lancet*. 2004;363(9405):292-4.
14. Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, et al. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;65(suppl_2):S100-s11.
15. Vornhagen J, Adams Waldorf KM, Rajagopal L. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. *Trends Microbiol*. 2017;25(11):919-31.
16. Jiang S, Wessels MR. BsaB, a novel adherence factor of group B Streptococcus. *Infect Immun*. 2014;82(3):1007-16.
17. Buscetta M, Papasergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, et al. FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes Streptococcus agalactiae-host cell interactions. *J Biol Chem*. 2014;289(30):21003-15.

18. Whidbey C, Harrell MI, Burnside K, Ngo L, Becraft AK, Iyer LM, et al. A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta. *J Exp Med*. 2013;210(6):1265-81.
19. Akgul Y, Word RA, Ensign LM, Yamaguchi Y, Lydon J, Hanes J, et al. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J Clin Invest*. 2014;124(12):5481-9.
20. Hayes K, O'Halloran F, Cotter L. A review of antibiotic resistance in Group B Streptococcus: the story so far. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46(3):253-69.
21. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*. 2015;282(1821):20143085.
22. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49.
23. Sprong T, Møller AS, Bjerre A, Wedege E, Kierulf P, van der Meer JW, et al. Complement activation and complement-dependent inflammation by *Neisseria meningitidis* are independent of lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2004;72(6):3344-9.
24. Reis ES, Mastellos DC, Hajishengallis G, Lambris JD. New insights into the immune functions of complement. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):503-16.
25. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest*. 2000;118(2):503-8.
26. Ter Horst R, Jaeger M, Smeekens SP, Oosting M, Swertz MA, Li Y, et al. Host and Environmental Factors Influencing Individual Human Cytokine Responses. *Cell*. 2016;167(4):1111-24.e13.
27. Melville JM, Moss TJM. The immune consequences of preterm birth. *Frontiers in neuroscience*. 2013;7:79-.
28. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*. 2019;25(1):13-26.
29. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014;10(9):1171-84.
30. Weinberger B, Laskin DL, Mariano TM, Sunil VR, DeCoste CJ, Heck DE, et al. Mechanisms underlying reduced responsiveness of neonatal neutrophils to distinct chemoattractants. *J Leukoc Biol*. 2001;70(6):969-76.
31. Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*. 2009;113(25):6419-27.
32. Walker JC, Smolders MA, Gemen EF, Antonius TA, Leuvenink J, de Vries E. Development of lymphocyte subpopulations in preterm infants. *Scand J Immunol*. 2011;73(1):53-8.
33. Kollmann TR, Kampmann B, Mazmanian SK, Marchant A, Levy O. Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny. *Immunity*. 2017;46(3):350-63.
34. Safdar A, Armstrong D. Infections in patients with hematologic neoplasms and hematopoietic stem cell transplantation: neutropenia, humoral, and splenic defects. *Clin Infect Dis*. 2011;53(8):798-806.
35. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay LS, Hyams C, et al. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun*. 2008;76(8):3761-70.
36. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(1):21-47.
37. Bedford Russell AR, Kumar R. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100(4):F350-4.

38. Johansson Gudjónsdóttir M, Elfvin A, Hentz E, Adlerberth I, Tessin I, Trollfors B. Changes in incidence and etiology of early-onset neonatal infections 1997–2017 – a retrospective cohort study in western Sweden. *BMC Pediatrics*. 2019;19(1):490.
39. Dretvik T, Solevåg AL, Finvåg A, Størdal EH, Størdal K, Klingenberg C. Active antibiotic discontinuation in suspected but not confirmed early-onset neonatal sepsis-A quality improvement initiative. *Acta Paediatr*. 2020;109(6):1125-30.
40. Velaphi SC, Westercamp M, Moleleki M, Pondo T, Dangor Z, Wolter N, et al. Surveillance for incidence and etiology of early-onset neonatal sepsis in Soweto, South Africa. *PLoS One*. 2019;14(4):e0214077.
41. Stoll BJ, Puopolo KM, Hansen NI, Sánchez PJ, Bell EF, Carlo WA, et al. Early-Onset Neonatal Sepsis 2015 to 2017, the Rise of *Escherichia coli*, and the Need for Novel Prevention Strategies. *JAMA Pediatr*. 2020;174(7):e200593.
42. Stoll BJ, Hansen NI, Sánchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817-26.
43. Paganini H, Staffolani V, Zubizarreta P, Casimir L, Lopardo H, Luppino V. Viridans streptococci bacteraemia in children with fever and neutropenia: a case-control study of predisposing factors. *Eur J Cancer*. 2003;39(9):1284-9.
44. Gassas A, Grant R, Richardson S, Dupuis LL, Doyle J, Allen U, et al. Predictors of viridans streptococcal shock syndrome in bacteremic children with cancer and stem-cell transplant recipients. *J Clin Oncol*. 2004;22(7):1222-7.
45. Luminex Assay Principle [nettdokument]. Minneapolis: rndsystems.com; 2022 [updated 2022]. Available from: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>.
46. Mohamed MA, Cunningham-Rundles S, Dean CR, Hammad TA, Nesin M. Levels of pro-inflammatory cytokines produced from cord blood in-vitro are pathogen dependent and increased in comparison to adult controls. *Cytokine*. 2007;39(3):171-7.
47. Hanage WP, Cohen J. Stimulation of cytokine release and adhesion molecule expression by products of Viridans streptococci. *J Infect Dis*. 2002;185(3):357-67.
48. Tatad AM, Nesin M, Peoples J, Cheung S, Lin H, Sison C, et al. Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. *Neonatology*. 2008;94(1):8-15.
49. Nakstad B, Sonnerud T, Solevåg AL. Early detection of neonatal group B streptococcus sepsis and the possible diagnostic utility of IL-6, IL-8, and CD11b in a human umbilical cord blood in vitro model. *Infect Drug Resist*. 2016;9:171-9.
50. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21(7):1372-92.
51. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, et al. Essential role of the C5a receptor in *E coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood*. 2002;100(5):1869-77.
52. Granslo HN, Klingenberg C, Fredheim EA, Acharya G, Mollnes TE, Flægstad T. *Staphylococcus epidermidis* biofilms induce lower complement activation in neonates as compared with adults. *Pediatr Res*. 2013;73(3):294-300.
53. Faust K, Demmert M, Bendiks M, Göpel W, Herting E, Härtel C. Intrapartum colonization with *Streptococcus pneumoniae*, early-onset sepsis and deficient specific neonatal immune responses. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285(3):599-604.
54. Yeh CY, Chen JY, Chia JS. Glucosyltransferases of viridans group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. *Infect Immun*. 2006;74(2):1273-83.

55. von Hunolstein C, Totolian A, Alfarone G, Mancuso G, Cusumano V, Teti G, et al. Soluble antigens from group B streptococci induce cytokine production in human blood cultures. *Infect Immun*. 1997;65(10):4017-21.
56. Moncunill G, Aponte JJ, Nhabomba AJ, Dobaño C. Performance of multiplex commercial kits to quantify cytokine and chemokine responses in culture supernatants from *Plasmodium falciparum* stimulations. *PLoS One*. 2013;8(1):e52587.
57. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):536-45.
58. Strunk T, Richmond P, Prosser A, Simmer K, Levy O, Burgner D, et al. Method of bacterial killing differentially affects the human innate immune response to *Staphylococcus epidermidis*. *Innate Immun*. 2011;17(6):508-16.
59. Fredheim EG, Granslo HN, Flægstad T, Figenschau Y, Rohde H, Sadovskaya I, et al. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63(2):269-80.

Tabell 1: Inndeling av viridans gruppe streptokokker (VGS) i fem grupper. Gruppene og bakteriene er hentet fra Facklam (2).

<i>S. salivarius</i> gruppen	<i>S. mitis</i> gruppen	<i>S. anginosus</i> gruppen	<i>S. sanguinis</i> gruppen	<i>S. mutans</i> gruppen
<i>S. salivarius</i> ¹	<i>S. mitis</i> ¹	<i>S. anginosus</i> ¹	<i>S. sanguinis</i> ¹	<i>S. mutans</i> ¹
<i>S. vestibularius</i> ¹	<i>S. oralis</i> ¹	<i>S. constellatus</i> ¹	<i>S. parasanguinis</i> ¹	<i>S. sorbinus</i> ^{1,3}
<i>S. intantarius</i> ¹	<i>S. cristatus</i> ¹	<i>S. intermedius</i> ¹	<i>S. gordonii</i> ¹	<i>S. cricetus</i> ^{1,3}
<i>S. thermophilus</i> ²	<i>S. infantis</i> ¹			<i>S. ratti</i> ^{1,3}
<i>S. alactolyticus</i> ⁴	<i>S. perois</i> ¹			<i>S. downei</i> ⁵
<i>S. hyointestinalis</i> ⁴	<i>S. orisratti</i> ³			<i>S. ferus</i> ³
				<i>S. macaccae</i> ⁵
				<i>S. hyovaginalis</i> ⁴

1: Opphav fra menneske, 2: opphav fra meieriprodukter, 3: opphav fra rotte, 4: opphav fra svin, 5: opphav fra ape

Tabell 2: Oversikt over blodmodellen. Radene merket med mørkere grått er prøver som var med i blodmodelloppsettet og ble kjørt i et parallelt forsøk, men som ikke blir vurdert i denne oppgaven.

		Tid (min)	Steg 1: Tilsette blod	Tid (min)	Steg 2	Tid 2t + x min	Steg 3	Tid 4t + x min	Steg 4
1	T0	0	300 µL	7,5	EDTA 14,5 µL				
2	<i>S. haemolyticus</i> varmeinaktivert 2 timer, 25-63	0,5	300 µL	8	60 µL SHV 25-63	2t + 8	EDTA 14,5 µL		
3	<i>S. haemolyticus</i> varmeinaktivert 4 timer, 25-63	1	300 µL	8,5	60 µL SHV 25-63			4t + 8,5	EDTA 14,5 µL
4	<i>S. haemolyticus</i> levende 2 timer, 25-63	1,5	300 µL	9	60 µL SHL 25-63	2t + 9	EDTA 14,5 µL		
5	<i>S. haemolyticus</i> levende 4 timer, 25-63	2	300 µL	9,5	60 µL SHL 25-63			4t + 9,5	EDTA 14,5 µL
6	<i>S. haemolyticus</i> varmeinaktivert 2 timer, 53-38	2,5	300 µL	10	60 µL SHV 53-38	2t + 10	EDTA 14,5 µL		
7	<i>S. haemolyticus</i> varmeinaktivert 4 timer, 53-38	3	300 µL	10,5	60 µL SHV 53-38			4t + 10,5	EDTA 14,5 µL
8	<i>S. haemolyticus</i> levende 2 timer, 53-38	3,5	300 µL	11	60 µL SHL 53-38	2t + 11	EDTA 14,5 µL		
9	<i>S. haemolyticus</i> levende 4 timer, 53-38	4	300 µL	11,5	60 µL SHL 53-38			4t + 11,5	EDTA 14,5 µL
10	GBS 2 timer	4,5	300 µL	12	60 µL GBS	2t + 12	EDTA 14,5 µL		
11	GBS 4 timer	5	300 µL	12,5	60 µL GBS			4t + 12,5	EDTA 14,5 µL
12	VGS 2 timer	5,5	300 µL	13	60 µL VGS	2t + 13	EDTA 14,5 µL		
13	VGS 4 timer	6	300 µL	13,5	60 µL VGS			4t + 13,5	EDTA 14,5 µL
14	Negativ kontroll 2 timer	6,5	300 µL	14	60 µL PBS	2t + 14	EDTA 14,5 µL		
15	Negativ kontroll 4 timer	7	300 µL	14,5	60 µL PBS			4t + 14,5	EDTA 14,5 µL

SHL = *S. haemolyticus* levende SHV = *S. haemolyticus* varmeinaktivert GBS = Gruppe B streptokokker
VGS = Viridans gruppe streptokokk (*S. mitis*)

Tabell 3: VGS sammenlignet med GBS og *S. haemolyticus* og sammenligning av to og fire timer inkubasjon for VGS. Uthevet skrift indikerer signifikant verdi, p<0,05.

* Kun analysert 8 donorer (n=8)

Cytokin	Inkubasjon i timer	Median cytokinkonsentrasjon (interkvartil bredde)				VGS versus GBS	VGS versus SH K-	VGS versus SH K+	VGS 2 timer versus VGS 4 timer
		VGS n=9	GBS n=9	SH K- n=9	SH K+ n=9				
IL-6	2	19 (13-49) *	14 (13-21) *	14 (9-21)	11 (8-13)	0,176	0,128	0,063	0,012
	4	76 (41-190)	167 (100-497)	55 (34-104)	69 (27-107)	0,110	0,173	0,594	
IL-8	2	397 (162-583) *	224 (76-437) *	159 (53-239)	201 (129-252)	0,263	0,123	0,050	0,025
	4	870 (405-1813)	1154 (467-2209)	483 (316-964)	815 (522-1060)	0,678	0,594	0,314	
TNF- α	2	211 (159-262) *	216 (42-485) *	114 (25-239)	184 (132-258)	0,575	0,069	0,889	0,735
	4	443 (187-702)	764 (374-2968)	184 (101-272)	317 (192-695)	0,028	0,123	0,594	

VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

Tabell 4: Negativ kontroll sammenlignet VGS, GBS og *S. haemolyticus*. Uthevet skrift indikerer signifikant verdi, $p < 0,05$.

* Kun analysert 8 donorer (n=8)

Cytokin	Inkubasjon i timer	Median cytokinkonsentrasjon (Interkvartil bredde)					VGS versus negativ kontroll	GBS versus negativ kontroll	SH K- versus negativ kontroll	SH K+ versus negativ kontroll
		Negativ kontroll	VGS	GBS	SH K-	SH K+				
IL-6	2	7 (4-12)	19 (13-49) *	14 (13-21) *	14 (9-21)	11 (8-13)	0,012	0,012	0,08	0,075
	4	18 (10-35)	76 (405-1813)	167 (99-497)	55 (34-104)	69 (27-107)	0,008	0,008	0,012	0,008
IL-8	2	97 (29-155)	397 (162-583) *	224 (76-427) *	159 (53-239)	201 (129-252)	0,017	0,012	0,015	0,008
	4	315 (156-1509)	870 (405-1813)	1154 (574-2209)	483 (316-964)	815 (522-1060)	0,374	0,086	0,110	0,594
TNF- α	2	106 (10-180)	211 (159-262) *	216 (42-485) *	114 (25-239)	184 (132-258)	0,012	0,012	0,208	0,038
	4	134 (15-327)	443 (187-702)	764 (426-2968)	184 (101-272)	317 (192-695)	0,110	0,008	0,678	0,173

VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

Tabell 5: Sammenligning av GBS og *S. haemolyticus* og sammenligning av to og fire timer inkubasjon for GBS og *S. haemolyticus*. Uthevet skrift indikerer signifikant verdi, p<0,05

* Kun analysert 8 donorer (n=8)

Cytokin	Inkubasjon i timer	Median cytokinkonsentrasjon (interkvartil bredde)			GBS versus SH K-	GBS versus SH K+	SH K- versus SH K+	GBS 2t versus GBS 4t	SH K- versus SH K- 4t	SH K+ 2t versus SH K+ 4t
		GBS n=9	SH K- n=9	SH K+ n=9						
IL-6	2	14 (13-21) *	14 (9-21)	11 (8-13)	0,612	0,017	0,050	0,012	0,008	0,008
	4	167 (100- 497)	55 (34- 104)	69 (27- 107)	0,008	0,008	0,767			
IL-8	2	224 (76- 437) *	159 (53- 239)	201 (129- 252)	0,208	0,484	0,441	0,012	0,008	0,008
	4	1154 (467- 2209)	483 (316- 964)	815 (522- 1060)	0,038	0,260	0,374			
TNF- α	2	216 (42- 485) *	114 (25- 239)	184 (132- 258)	0,012	0,401	0,515	0,012	0,066	0,028
	4	764 (374- 2968)	184 (101- 272)	317 (192- 695)	0,008	0,139	0,214			

VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

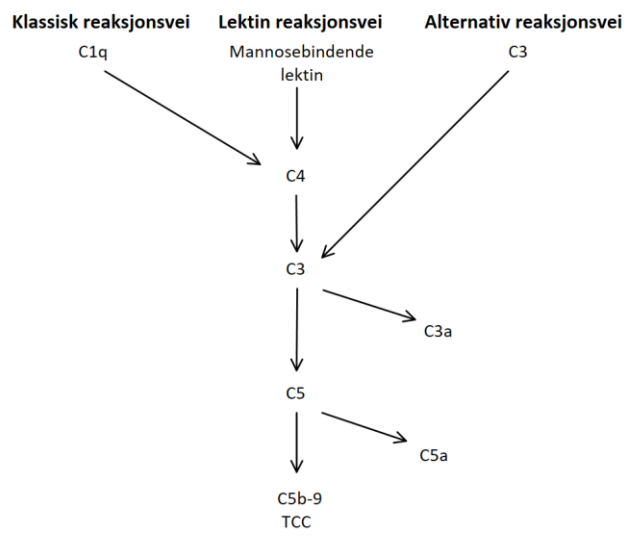
SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

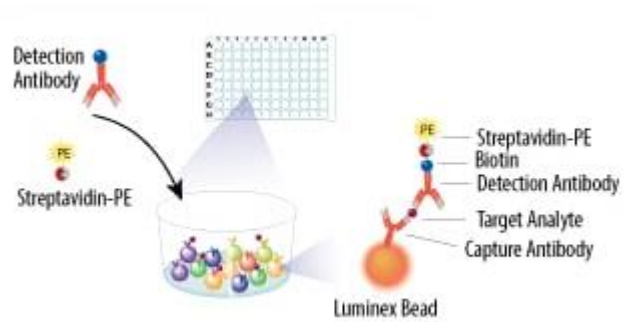
Tabell 6: Sammenligning ved bruk av Luminex og Bio-plex immunoassay. Har kun testet en donor mot hverandre for VGS 2t og GBS 4t

Bakterie og inkubasjon	Cytokin	Luminex	Bio-plex
VGS 2t	IL-6	24 pg/ml	24 pg/ml
	IL-8	526 pg/ml	613 pg/ml
	TNF- α	144 pg/ml	496 pg/ml
GBS 4t	IL-6	460 pg/ml	1378 pg/ml
	IL-8	1228 pg/ml	2845 pg/ml
	TNF- α	1045 pg/ml	8050 pg/ml

Figur 1: Oversikt over komplementsystemet. Modifisert fra Fredheim et al. (59).

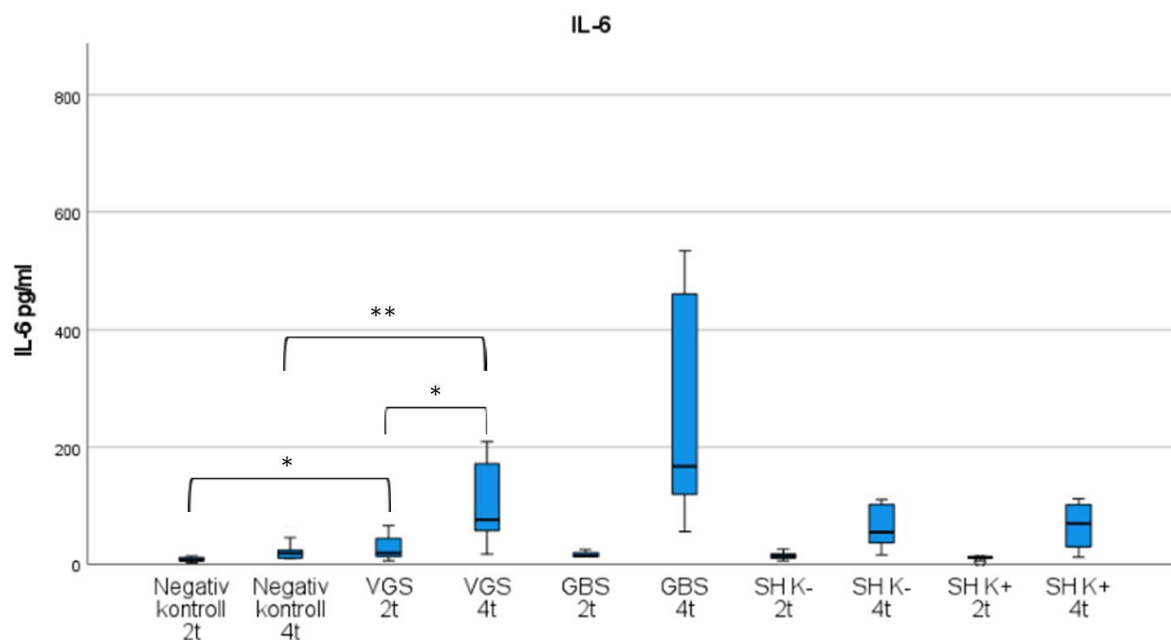


Figur 2: Virkemekanismen til multiplex immunoassay. Hentet fra R&D systems hjemmeside (45).



Figur 3: IL-6 konsentrasjon i blodet to og fire timer etter stimulering med tre ulike bakterier i en ex-vivo blodmodell.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



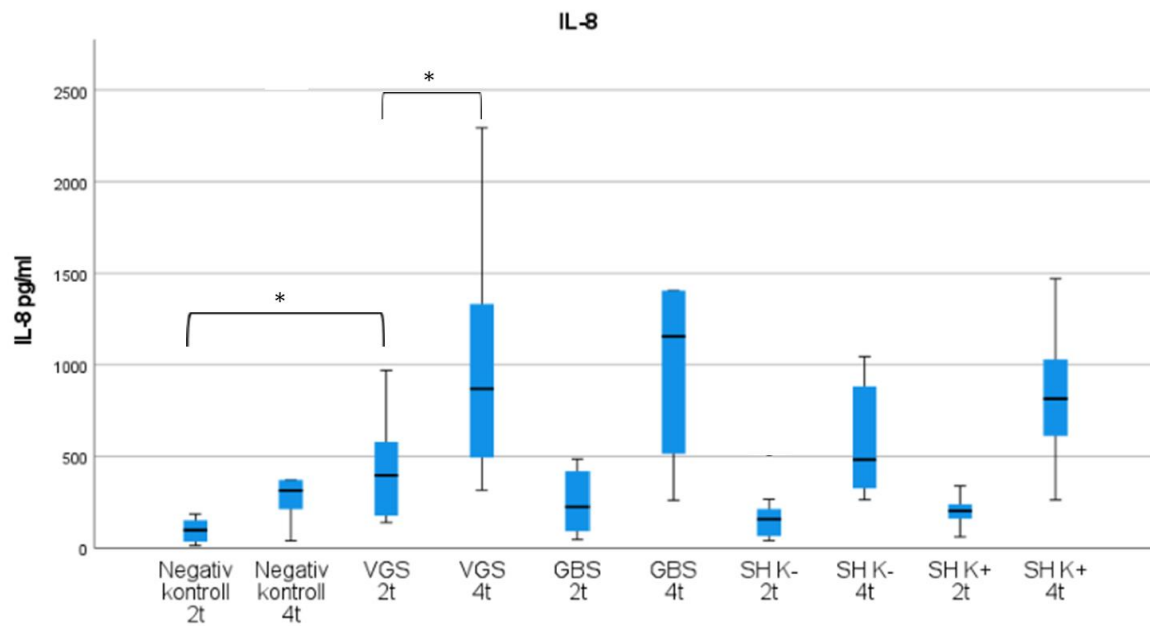
VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

Figur 4: IL-8 konsentrasjon i blodet to og fire timer etter stimulering med tre ulike bakterier i en ex-vivo blodmodell. * p<0,05.



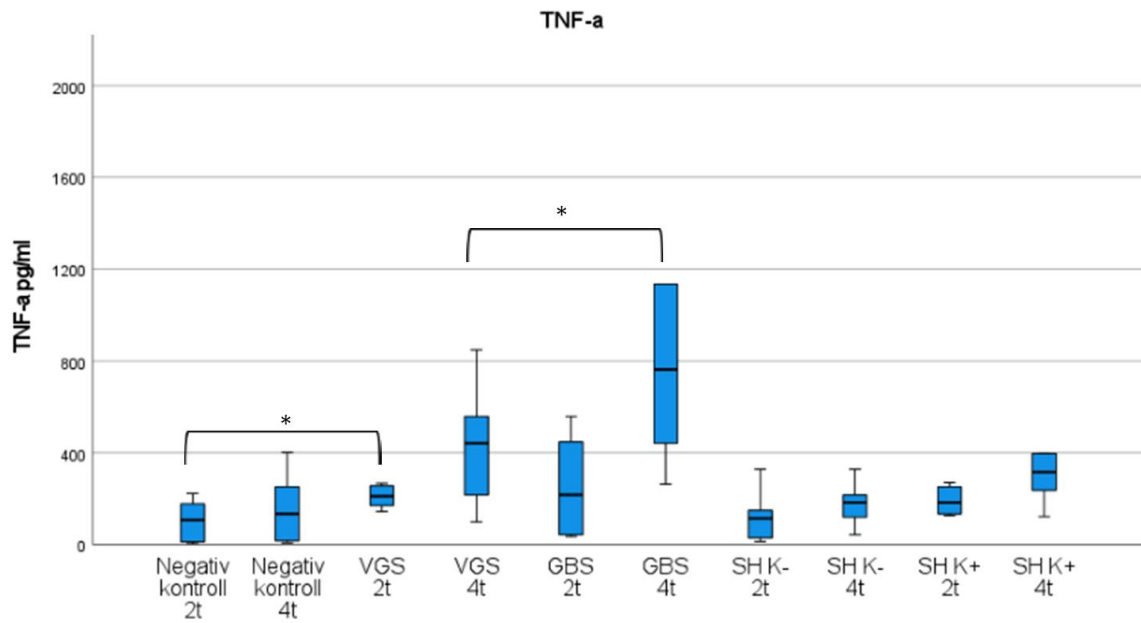
VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

Figur 5: TNF- α konsentrasjon i blodet to og fire timer etter stimulering med tre ulike bakterier i en ex-vivo blodmodell. * $p < 0,05$.



VGS = *S. mitis*

GBS = Gruppe B streptokokk

SH K- = *S. haemolyticus* 25-63, uten kapsel

SH K+ = *S. haemolyticus* 53-38, med kapsel

Vedlegg 1

Versjon 1.0



VIL DU DELTA I FORSKNINGSPROSJEKTET

Eksperimentelle bakterielle infeksjoner - studier i en blodmodell

FORMÅLET MED PROSJEKTET OG HVORFOR DU BLIR SPURT

Dette er et spørsmål til deg om å delta i et forskningsprosjekt for å undersøke hvordan immunforsvaret reagerer på ulike typer bakterier som er vanlige årsaker til alvorlige infeksjoner hos nyfødte og immunsvekkede barn. For å øke kunnskapsgrunnlaget på hvordan disse bakteriene gir sykdom og påvirker immunforsvaret, trenger vi studier der vi etterligner disse infeksjonene i en laboratoriemodell. Vi vil bruke en modell som etterligner situasjonen man har i blodet under en infeksjon og til denne modellen behøver vi blod fra friske, frivillige givere.

HVA INNEBÆRER PROSJEKTET FOR DEG?

Som deltaker i dette prosjektet tar vi en blodprøve av deg. Det vil stikkes en liten nål i blodåren din og det vil tappes ca. 30 mL blod. Dette er en liten mengde blod som er helt ufarlig å tappe ut.

Blodprøven vi har tatt av deg vil bli tilsatt ulike typer før vi analyserer blodet for ulike deler av det medfødte immunforsvaret (komplement og cytokiner). Du vil selv ikke utsettes for bakterier. Tidsbruken for deg vil være begrenset til tiden det tar å ta blodprøver.

Du kan eventuelt bli spurt om å tappe samme mengde blod ytterligere 2 ganger til i løpet av en 6 ukers periode. Det er naturligvis frivillig hver gang.

Frivillige voksne deltagere i dette prosjektet skal ikke ha noen kroniske sykdommer, ikke bruke noen faste medisiner, være fastende ved prøvetaking, ikke ha vært i hard fysisk aktivitet i forkant, og de skal ikke ha hatt feber eller infeksjonssykdommer siste 7 dager før blodprøvetaking.

MULIGE FORDELER OG ULEMPER

Det vil ikke være noen klare fordeler for deg å delta i denne studien utover at ditt blod vil kunne være med å bidra til at man ved vitenskapelige studier får økt kunnskap om hvordan infeksjoner påvirker immunforsvaret.

Utover et stikk i huden i forbindelse med blodprøven så er det ikke knyttet noe ubehag eller risiko til deltakelse i denne studien.

Vi vil ikke samle inn noen helseopplysninger om deg.

FRIVILLIG DELTAKELSE OG MULIGHET FOR Å TREKKE DITT SAMTYKKE

Det er frivillig å delta i prosjektet. Dersom du ønsker å delta, undertegner du samtykkeerklæringen på siste side. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke ditt samtykke. Det vil ikke ha noen negative

Versjon 1.0

konsekvenser for deg hvis du ikke vil delta eller senere velger å trekke deg. Dersom du trekker tilbake samtykket, vil det ikke forskes videre på ditt biologiske materiale. Du kan kreve innsyn i opplysningene som er lagret om deg, og opplysningene vil da utleveres innen 30 dager. Du kan også kreve at det biologiske materialet destrueres. Adgangen til å kreve destruksjon, sletting eller utlevering gjelder ikke dersom materialet eller opplysningene er anonymisert eller publisert. Denne adgangen kan også begrenses dersom opplysningene er inngått i utførte analyser, eller dersom materialet er bearbeidet og inngår i et annet biologisk produkt.

Dersom du senere ønsker å trekke deg eller har spørsmål til prosjektet, kan du kontakte prosjektleder (se kontaktinformasjon på siste side).

HVA SKJER MED OPPLYSNINGENE OM DEG?

Opplysningene som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet under formålet med prosjektet, og planlegges brukt innen utgangen av 2026. Eventuelle utvidelser i bruk og oppbevaringstid kan kun skje etter godkjenning fra regional etisk komite (REK) og andre relevante myndigheter. Du har rett til innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg, og rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene som er registrert. Du har også rett til å få innsyn i sikkerhetstiltakene ved behandling av opplysningene. Du kan klage på behandlingen av dine opplysninger til Datatilsynet og institusjonen sitt personvernombud.

Alle opplysningene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger (=kodete opplysninger). En kode knytter deg til din blodprøve gjennom en navneliste. Det er kun prosjektleder Claus Klingenberg som har tilgang til denne listen.

Opplysningene om deg vil bli oppbevart i fem år etter prosjektslutt av kontrollhensyn.

HVA SKJER MED PRØVER SOM BLIR TATT AV DEG?

Prøvene som tas av deg skal oppbevares i en forskningsbiobank tilknyttet prosjektet. Biobanken heter «Eksperimentelle bakterielle infeksjoner - studier i en blodmodell» og er lokalisert på Pediatrisk Forskningsgruppe Infeksjonslaboratoriet, UiT/UNN. Ansvarshavende for biobanken er Claus Klingenberg. Biobanken opphører ved prosjektslutt.

FORSIKRING

Blodprøven vil bli tatt av personell med helsefaglig utdanning og du vil være dekket av Pasientskadeloven.

OPPFØLGINGSPROSJEKT

I denne studien vil vi se på hvordan flere bakterier som er vanlige årsaker til infeksjoner hos immunsupprimerte barn og nyfødte påvirker det medfødte immunforsvaret til friske voksne. Vi velger å inkludere friske voksne givere i dette prosjektet da dette muliggjør inklusjon av flere deltakere og større volum blod. Vi vil med dette begynne å danne oss en forståelse av hvordan infeksjonene påvirker blodet og dens bestanddeler samt hvordan modellen kan brukes mest effektivt. I senere studier planlegger forskningsgruppen å gjøre tilsvarende studier med blod fra nyfødte og immunsupprimerte barn.

ØKONOMI

Du som deltaker vil ikke få noen økonomisk kompensasjon for din deltakelse.

Versjon 1.0

GODKJENNINGER

Prosjektet har vært vurdert av REK og anses ikke som framleggingspliktig, jf. Helseforskningsloven §2.

Universitetssykehuset Nord-Norge og prosjektleder Claus Klingenberg er ansvarlig for personvernet i prosjektet.

Vi behandler opplysningene basert på Lov om behandling av personopplysninger (Personopplysningsloven), artikkel 9 nr. 2 og 3.

KONTAKTOPPLYSNINGER

Dersom du har spørsmål til prosjektet eller ønsker å trekke deg fra deltakelse, kan du kontakte:

Claus Klingenberg, prosjektleder. Mail; claus.klingenberg@unn.no. Telefon 91563167.

Dersom du har spørsmål om personvernet i prosjektet, kan du kontakte personvernombudet ved UNN:

personvernombudet@unn.no

Versjon 1.0

JEG SAMTYKKER TIL Å DELTA I PROSJEKTET OG TIL AT MITT BIOLOGISKE MATERIALE
BRUKES SLIK DET ER BESKREVET

Sted og dato

Deltakers signatur

Deltakers navn i blokkbokstaver

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om

Sted og dato

Signatur

Rolle i prosjektet

Vedlegg 2



Region:	Saksbehandler:	Telefon:	Vår dato:	Vår referanse:
REK nord	Monika Rydland-Nymo	77620756	22.02.2022	413136

Claus Andreas Klingenberg

Prosjektsøknad: Eksperimentelle bakterielle infeksjoner - studier i en blodmodell

Søknadsnummer: 413136

Forskningsansvarlig institusjon: Universitetssykehuset Nord-Norge HF

Prosjektsøknad vurderes som utenfor helseforskningslovens virkeområde

Søkers beskrivelse

Immunsupprimerte barn og nyfødte er utsatt for alvorlige bakterielle infeksjoner (sepsis) med ulike bakterier.

Det er generelt lite forskning på immunrespons ved ulike bakterier som kan gi sepsis hos barn. Det er spesielt få studier som har sammenlignet ulike typer bakterier. Det er videre få studier på komplementsystemets betydning ved denne type infeksjoner.

I dette prosjektet vil vi benytte en etablert fullblodmodell til å studere ulike aspekter av immunrespons hos ulike bakterier.

Vi vil vi benyttet blod fra 20 voksne frivillige blodgivere, som vil kunne danne grunnlag for senere mer målrettede kliniske studier hos barn.

Prosjektet vil gi ny kunnskap om immunrespons inkl. komplement aktivering ved ulike bakterier som kan gi sepsis hos sårbare barn.

Vi viser til søknad mottatt 11.01.2022 for ovennevnte forskningsprosjekt. Søknaden ble behandlet av Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) nord i møtet 10.02.2022. Vurderingen er gjort med hjemmel i helseforskningsloven § 10.

REKs vurdering

Om prosjektet

Man vil innhente fullblod fra 20 voksne deltakere. Analyser av immunrespons vil delvis gjøres i Tromsø og dels i samarbeid med immunologisk fagmiljø i Bodø som har spesialkompetanse på komplementanalyser.

Design/metode

Studien er eksplorativ og man anser at 20 deltagere vil være nok til å vise forskjeller i

REK nord

Besøksadresse: MH-2, 12. etasje, UiT Norges arktiske universitet, Tromsø

Telefon: 77 64 61 40 | E-post: rek-nord@asp.uit.no

Web: <https://rekportalen.no>

immunrespons mellom ulike bakterier, og samtidig ta høyde for biologisk variasjon mellom deltagere.

Man vil benytte en ex vivo fullblodsmodell til å studere immunrespons, og har i dette prosjektet valgt å gjøre forsøkene med blod fra voksne da det gjør at man kan få flere deltagere og tilstrekkelig volum blod.

I senere studier planlegger forskningsgruppen å gjøre tilsvarende studier, men mer målrettede studier med blod fra nyfødte og immunsupprimerte barn.

Komiteen har vurdert om prosjektet faller innenfor helseforskningslovens virkeområde.

De prosjektene som skal framlegges for REK er prosjekt som dreier seg om «*medisinsk og helsefaglig forskning på mennesker, humant biologisk materiale eller helseopplysninger*», jf. helseforskningsloven § 2. «*Medisinsk og helsefaglig forskning*» er i § 4 a), definert som «*virksomhet som utføres med vitenskapelig metodikk for å skaffe til veie ny kunnskap om helse og sykdom*». Det er altså formålet med studien som avgjør om et prosjekt skal anses som framleggelsespliktig for REK eller ikke.

Den nasjonale forskningsetiske komite for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk publiserte høsten 2021 en veileder for helseforskningslovens saklige virkeområde. Der heter det

«For å vurdere om prosjektet gir ny kunnskap om helse og sykdom kan følgende momenter være til hjelp i vurderingen:

- Er formålet med studien ny kunnskap om helse og sykdom?
- Har prosjektet et klart klinisk fokus?
- Vil prosjektet kunne føre til forbedret diagnostikk?
- Gir prosjektet en utvidet forståelse om helsetilstanden eller sykdommen som kan forbedre behandlingen eller innholdet i et tilbud?»

Etter en helhetsvurdering er REK kommet til at prosjektet ikke reguleres av helseforskningsloven. På nåværende stadium vil forskningen ikke fremskaffe ny kunnskap om sykdom eller helse, selv om det er det langsiktige målet.

Prosjektet må forankres i egen institusjon.

Vedtak

Etter søknaden fremstår prosjektet ikke som et medisinsk og helsefaglig forskningsprosjekt som faller innenfor helseforskningsloven. Prosjektet er ikke framleggelsespliktig, jf. helseforskningsloven § 2.

Vi gjør oppmerksom på at det må foreligge et behandlingsgrunnlag etter personvernforordningen. Dette må forankres i egen institusjon.

Klageadgang

Du kan klage på REKs vedtak, jf. forvaltningsloven § 28 flg. Klagen sendes på eget skjema via REK portalen. Klagefristen er tre uker fra du mottar dette brevet. Dersom REK

opprettholder vedtaket, sender REK klagen videre til Den nasjonale forskningsetiske komité for medisin og helsefag (NEM) for endelig vurdering, jf. forskningsetikkloven § 10 og helseforskningsloven § 10.

Med vennlig hilsen

May Britt Rossvoll
sekretariatsleder

Kopi til:

Universitetssykehuset Nord-Norge HF

