



UiT Norges arktiske universitet

Det helsevitenskapelige fakultet

***Staphylococcus haemolyticus* – betydningen av kapsel og biofilmdannelse for immunrespons**

Elen Naomi Våga Lwin

Masteroppgave i medisin, MED-3950, våren 2022

Hovedveileder: Jorunn Pauline Cavanagh, IKM ved UiT

Biveiledere: Hildegunn Norbakken Granslo, IKM ved UiT | Claus Klingenberg, IKM ved UiT

Forord

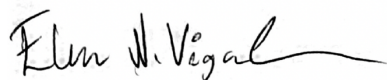
Denne masteroppgaven i medisin ble gjennomført i Pediatrisk forskningsgruppe, Institutt for Klinisk Medisin ved Universitetet i Tromsø. Forarbeidet til oppgaven ble gjort høsten 2020 og høsten 2021, mens selve laboratoriearbeidet og oppgaveskrivingen ble gjennomført våren 2022. Hensikten med oppgaven var å øke kunnskapen om virulensfaktorer hos *Staphylococcus haemolyticus*, samt metodeutvikling.

Gjennom de fire første studieårene fattet jeg interesse for infeksjonsmedisin, pediatri og mikrobiologi. Da tema for denne oppgaven skulle velges, var mitt drømmescenario en oppgave som kombinerte alle disse fagområdene. Det fant jeg i det jeg kontaktet Trond Flægstad, professor i barnesykdommer ved UiT, som raskt inviterte meg og min medstudent, Bjørn Martin Broback, til et møte med Pediatrisk forskningsgruppe. Der var jeg så heldig å komme i kontakt med mine veiledere som foreslo denne spennende oppgaven som inkluderte laboratoriearbeid.

Jeg ønsker å rette en hjertelig takk til min hovedveileder Jorunn Pauline Cavanagh, førsteamanuensis ved Pediatrisk forskningsgruppe, som med sin uvurderlige entusiasme, tålmodighet og kompetanse har veiledet meg hele veien fra første gang jeg satte min fot på laben til skriveprosessen. Det har vært et privilegium å ha deg som veileder!

Jeg vil også rette en stor takk til mine biveiledere Hildegunn Norbakken Granslo, førsteamanuensis ved IKM og spesialist i pediatri, og Claus Klingenberg, professor og spesialist i pediatri, for deres engasjement og oppfølging på skrivning, statistikk, tabeller og figurer. En stor takk til Ina Isabella Høiland, overingeniør ved Pediatrisk forskningsgruppe, for all praktisk veiledning på laben og ditt smittende gode humør. Trine Kalstad for din tid og ekspertise på cytokinanalyser. Trond Flægstad for ditt engasjement. Bjørn Martin Broback som med sin søsterstudie «Viridans gruppe streptokokker – inflammatorisk respons i en blodmodell» har vært den hyggeligste labpartneren jeg kunne ønsket meg.

Tromsø, 29.05.2022



Elen Naomi Våga Lwin

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag	6
2	Bakgrunn	7
2.1	Koagulase-negative stafylokokker	7
2.1.1	Klinisk relevans	7
2.1.2	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8
2.1.3	Virulensfaktorer hos <i>S. haemolyticus</i>	9
2.2	Det medfødte immunforsvaret	11
2.2.1	Komplementsystemet	12
2.2.2	Patogenreseptorer	13
2.2.3	Celler og signalstoffer	13
2.3	Problemstilling	14
3	Materiale og metode	15
3.1	Studiepopulasjon	15
3.2	Bakteriestammer og fremstilling av biofilm	15
3.2.1	Bakterieinokulat til <i>ex vivo</i> human fullblodmodell	15
3.3	<i>Ex vivo</i> human fullblodmodell	17
3.4	Undersøkelse av cytokiner	19
3.5	Undersøkelse av biofilmdannelse	20
3.6	Etikk	21
3.7	Statistikk	21
4	Resultater	22
4.1	Biofilmdannelse	22
4.2	Cytokinutskillelse som respons på biofilm	22
4.3	Cytokinutskillelse som respons på planktoniske versus varmeinaktiverte bakterier	23
5	Diskusjon	24

5.1	Egne funn	24
5.2	Metodologiske utfordringer.....	27
5.3	Forslag til videre optimalisering av metode.....	30
6	Konklusjon	31
	Referanser.....	32
	Tabeller.....	37
	Figurer	39
	Vedlegg	44
7	Vedtaksbrev REK.....	44
8	Infoskriv: Eksperimentelle bakterielle infeksjoner – studier i en blodmodell	47

Tabelliste

Tabell 1: Median konsentrasjon av de ulike cytokinene produsert som respons på ulike patogener. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. n = 9 for samtlige bakterier/vekstfase og negative kontroller.	37
Tabell 2: Resultater av Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test. Statistisk signifikans satt til $p < 0,05$, uthevet i tabell. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk.	37
Tabell 3: CFU ml ⁻¹ for planktoniske bakterier tilsatt i blodet til de ulike bloddonorene. Ingen data på KO- på dag 1 grunnet feil i fortynningsrekker. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon.....	38

Figurliste

Figur 1: Biofilmdannelse. Tegnet av Roy-Andre Lyså.	39
Figur 2: Komplementsystemet. Modifisert figur fra Fredheim og medarbeidere (25).	39
Figur 3: Prinsipp for Luminex®. Bilde hentet fra R&D Systems® (65).	40
Figur 4: Biofilmdannelse etter bakteriestamme og vekstforhold. OD – optical density. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. * – p < 0,05.....	40
Figur 5: Konsentrasjon av IL-6 for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.	41
Figur 6: Konsentrasjon av IL-8 for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.	41
Figur 7: Konsentrasjon av TNF- α for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.	42
Figur 8: Konsentrasjon av IL-6 for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – p < 0,05.....	42
Figur 9: Konsentrasjon av IL-8 for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – p < 0,05.....	43
Figur 10: Konsentrasjon av TNF- α for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – p < 0,05	43

1 Sammendrag

Bakgrunn

Staphylococcus haemolyticus er en del av hudens normalflora med stadig økende relevans som en opportunistisk patogen ved nosokomiale infeksjoner. Disse infeksjonene skjer oftest ved bruk av implantert medisinsk utstyr, og rammer spesielt nyfødte og immunkompromitterte barn. En betydelig utfordring med mikroben er dens multiresistens mot antibiotika som drives av utbredt antibiotikabruk på sykehus og dens enorme genetiske plastisitet. Til tross for økende klinisk relevans er det lite kunnskap om hva som gjør den sykdomsfremkallende. Biofilmdannelse og kapsel har blitt identifisert som virulensfaktorer, men det er få studier på dette. Vi ønsket å undersøke om biofilm induerte en annen immunrespons enn planktoniske bakterier, og om kapsel beskyttet bakterien mot immunforsvaret, samt metodeutvikling av fullblodmodellen for biofilmforsøk.

Materiale og metode

Fullblod fra voksne, friske donorer ($n = 9$) ble undersøkt i en *ex vivo* human fullblodmodell. To biofilmproduserende stammer av *S. haemolyticus* ble benyttet; én med kapseloperon (KO+) og én uten kapseloperon (KO-). Bakteriene ble tilført modellen både som planktoniske og varmeinaktiverte bakterier, og som bakterier i biofilm. Immunrespons ble målt ved analyse av cytokinene IL-6, IL-8 og TNF- α .

Resultater

Planktoniske bakterier induerte sterkere immunrespons enn varmeinaktiverte bakterier ($p < 0,05$). Planktoniske bakterier av KO+ induerte større utskillelse av TNF- α enn KO- ($p < 0,05$). Begge stammene hadde større biofilmproduksjon i slanger enn i plater, og KO+ produserte mer biofilm enn KO- ($p < 0,001$). Cytokinmålingene fra slanger med biofilm kunne ikke analyseres grunnet metodefeil, og dermed heller ikke sammenlignes med planktoniske bakterier.

Konklusjon

Planktoniske bakterier induerte sterkere immunrespons enn varmeinaktiverte bakterier. Videre studier bør fokusere på optimalisering av fullblodmodellen for biofilmforsøk, samt undersøke om kapsel er uttrykt under disse betingelsene.

2 Bakgrunn

Utviklingen og fremskrittene gjort innenfor medisinsk teknologi de siste tiårene har ført til endringer i hvordan livet er i dag. Infeksjoner og tilstander som tidligere ofte hadde dødelig utfall, kan med dagens teknologi behandles. Vi lever lengre, men med det følger flere individer som er eldre, multimorbide og immunkompromitterte. Sammen med vår endring i livsførsel, følger nye muligheter for andre organismer tett knyttet til oss mennesker; bakteriene. Den nye medisinske teknologien innebærer også utbredt bruk av medisinsk utstyr som settes inn i menneskekroppen og dermed bryter hudbarrieren. Sammen bidrar disse faktorene til en stadig økende forekomst av nosokomiale infeksjoner med koagulase-negative stafylokokker (KNS) (1).

2.1 Koagulase-negative stafylokokker

Stafylokokker er Gram-positive kokker i klaser, og deles inn i to hovedgrupper; koagulase-positive og koagulase-negative. Denne inndelingen baseres på tilstedeværelsen av enzymet koagulase som får fibrin til å levre seg i blodplasma. De koagulase-positive stafylokokkene utgjør en forholdsvis liten gruppe, der den klinisk viktigste arten er *Staphylococcus aureus*. Resten av stafylokokkene er koagulase-negative, der de klinisk viktigste artene er *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* og *Staphylococcus saprophyticus* (2). På grunn av denne inndelingen er KNS en stor og heterogen gruppe. Det er alt fra apatogene arter til potensielt patogene arter med lavt, middels eller høyt virulenspotensial i denne gruppen (1). I tillegg er potensialet for patogenitet ikke begrenset til kun artsnivå, men også til stammenivå (2;3).

KNS er en del av normalfloraen på hud og slimhinner hos mennesket. De koloniserer fortrinnsvis fuktige områder, typisk aksiller, inguinale og perineale områder og nesebor. Koloniseringen starter allerede de første dagene og ukene av livet, hvor *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* og *Staphylococcus warneri* er de mest prevalente artene. KNS er også de første og mest tallrike bakteriene til å kolonisere gastrointestinal-trakt under moderne, vestlige forhold (2).

2.1.1 Klinisk relevans

Tidligere har KNS vært ansett som en apatogen gruppe da de er en naturlig del av et friskt menneskes normalflora på hud og slimhinner. På grunn av både demografiske og medisinske

endringer utgjør KNS nå en av de viktigste nosokomiale patogenene (2;4). Med demografiske endringer menes flere sårbare pasienter for denne typen infeksjon; premature nyfødte og eldre, multimorbide, kronisk syke, som ofte også er immunkompromitterte. Denne endringen i pasientgruppene har ført til et større fokus på infeksjoner forårsaket av KNS (2).

De viktigste og mest prevalente artene klinisk sett er *S. epidermidis* og *S. haemolyticus*. De inngår begge i den klinisk definerte *S. epidermidis*-gruppen som også består av blant annet *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus capitis* og *S. warneri*. De fleste infeksjoner forårsaket av denne gruppen karakteriseres ved et subakutt eller kronisk forløp med ikke-spesifikk og mild klinikk. Infeksjoner som typisk forårsakes av denne gruppen er bakteriemi, sepsis, proteseendokarditt (på biologisk/mekanisk hjerteklaff), urinveisinfeksjon (UVI), infeksjon i leddproteser og sår-, bein- og leddinfeksjoner. I dag er KNS de mest prevalente patogenene som forårsaker fremmedlegeme-relaterte infeksjoner, og er ofte assosiert med infeksjon hos nyfødte, spesielt premature (2).

Risikofaktorer for KNS-infeksjoner som også bidrar til deres økende kliniske relevans er 1) umodent eller kompromittert immunsystem, 2) brudd på kroppens barrierer (hud og slimhinner), og 3) implantert medisinsk utstyr som utgjør en kunstig overflate som kan koloniseres av KNS. I dag er ofte alle tre faktorene tilstede samtidig, og sammen med økt antibiotikabruk fører dette til selektering og spredning av multiresistente KNS-isolater (1;4).

2.1.2 *Staphylococcus haemolyticus*

S. haemolyticus er en del av hudens normalflora (kommensal bakterie) som blir stadig viktigere som en opportunistisk patogen ved nosokomiale infeksjoner. Infeksjoner med denne mikroben skjer oftest ved bruk av implantert medisinsk utstyr, og rammer spesielt immunkompromitterte og premature nyfødte (2;3;5). *S. haemolyticus* koloniserer områder på kroppen som er rike på apokrine kjertler, som aksille, lyske og perineale områder (2). *S. haemolyticus* er oftere en del av hudfloraen hos nyfødte sammenlignet med voksne, hvor dette tilskrives sykehusopphold som også gjør mikroben mer resistent mot antibiotika (6). Den forårsaker hovedsakelig blodinfeksjon, sepsis, og fremmedlegeme-relaterte infeksjoner. Etter *S. epidermidis* er *S. haemolyticus* den mest prevalente KNS-arten i kliniske isolater (1;2;7;8).

En betydelig utfordring med *S. haemolyticus* er dens multiresistens mot antibiotika. Tidligere har det vært lite kunnskap om hva som skiller kommensale og klinisk relevante isolater. I 2019 fant Pain og medarbeidere et klart skille mellom kommensale og kliniske isolater der de

kliniske isolatene hadde spesifikke genetiske signaturer (8). De kliniske isolatene var i stor grad multiresistente, hadde tilegnet seg flere mobile genetiske elementer (MGE), hadde gunstige punktmutasjoner og rearrangering av overflate-relaterte gener (8). En studie fra 2005 fant hele 82 insersjonssekvenser (IS) i den første fullsekvenserte *S. haemolyticus*-stammen (JCSC1435) (9). Disse IS-kopiene kan fremme antibiotikaresistens ved at de fører til hyppig rearrangering av genomet slik at regulerende eller medierende gener for antibiotikaresistens aktiveres eller inaktiveres. Kombinasjonen av utbredt antibiotikabruk på sykehus og mikrobens enorme genetiske plastisitet, har dermed ført til utvikling av multiresistente stammer av *S. haemolyticus* (3;8;9).

2.1.3 Virulensfaktorer hos *S. haemolyticus*

Til tross for at *S. haemolyticus* får stadig større klinisk relevans, er det få studier og lite kunnskap om hva som gjør den sykdomsfremkallende. Dette står i kontrast til det store kunnskapsgrunnlaget på *S. epidermidis* og *S. aureus*. Sammenlignet med *S. aureus* har *S. haemolyticus* få virulensfaktorer. Produksjon av fenol-løselige moduliner, biofilmdannelse og hyppig genotypisk rearrangering grunnet høyt antall IS har blitt identifisert som viktige virulensfaktorer (5;7-10).

Da genomet til *S. haemolyticus* JCSC1435 ble fullsekvensert, identifiserte Takeuchi og medarbeidere en unik kromosomal region i stafylokokkgenomet kalt *oriC* environ. Den inneholder spesifikke, unike gener for *S. aureus*, *S. epidermidis* og *S. haemolyticus*, og de ulike artenes *oriC* environ er følgelig lite homologe med hverandre (9;11). Regionen er tenkt å være viktig for utvikling og differensiering av de ulike stafylokokkartene, men inneholder ikke kritiske gener for levedyktighet da majoriteten av regionen kan fjernes uten at bakterievekst affiseres (9). *oriC* environ består av integrerte kopier av «staphylococcal cassette chromosome» (SCC) i sin venstre del. SCC er en familie av MGE og fungerer som et apparat for transport av gener for eksempelvis antibiotikaresistens, men også transport av større elementer som transposoner og plasmider. Det er i sin høyre del at *oriC* environ inneholder MGE med gener for ulike virulensfaktorer, antibiotikaresistens og artsspesifikke gener (9;12;13). I denne oppgaven vil jeg sette søkelys på biofilmdannelse og kapsel som virulensfaktorer.

2.1.3.1 Biofilm

Kolonisering og biofilmdannelse anses som de viktigste virulensfaktorene hos KNS som forårsaker fremmedlegeme-relaterte infeksjoner (1;2;7). Biofilmer er adherente multicellulære bakterielle aggregater innkapslet i selvprodusert ekstracellulær matriks (14). Innholdet i denne matriksen varierer mellom bakterieartene, samt at det kan være både genotypisk og fenotypisk forskjellige arter tilstede i samme biofilm. Matriksen kan bestå av ekstracellulære polysakkarider, proteiner, lipider og ekstracellulært DNA. Disse bestanddelene holder biofilmen sammen ved intercellulær adhesjon og virker dermed som et «lim» (2). Hos kliniske isolater av *S. haemolyticus* fant Fredheim og medarbeidere at proteiner og ekstracellulært DNA er funksjonelt viktige for akkumulering av biofilm. De utgjør en større del av biofilmen enn hos *S. epidermidis*, der polysakkarid intercellulært adhesin (PIA) er en viktig bestanddel av biofilmen (14).

Biofilmen «skjuler» bakteriene fra immunforsvaret og antibiotika. Bakteriene i biofilm unngår dermed opsonisering og fagocytose av immunceller. Antibiotika virker dårligere både fordi det ikke kommer like godt til bakteriene inne i biofilmen, samt at en del bakterieceller i biofilmen ikke er metabolsk aktive. Mange typer antibiotika virker best på metabolsk aktive celler, for eksempel de som påvirker proteinsyntese (aminoglykosider, makrolider, m.fl.) og celleveggsyntese (penicilliner, cefalosporiner, vankomycin, m.fl.). Ved å nedregulere den metabolske aktiviteten i en biofilm kan det utvikles en persisterende infeksjon. Dette kombinert med et umodent eller kompromittert immunforsvar ser man en økt risiko for sepsis hos blant annet nyfødte (14).

Biofilmdannelse kan deles inn i 4 steg (figur 1). Først må bakterien raskt festes til en overflate, naturlig eller kunstig. Deretter må bakterien dele seg og akkumuleres i flerlagde celleaggregater. Denne prosessen krever intercellulær adhesjon. Tredje steg er at biofilmen vokser og modnes til et tykt, strukturert lag med kanaler som sørger for oksygen og næring til alle cellelagene. Til slutt kan enkeltceller eller celleklynger dissosiere fra biofilmen og disseminere via blodsirkulasjonen, for så å festes til, kolonisere og danne biofilm et annet sted i kroppen (2).

2.1.3.2 Bakteriell kapsel

Kapsel er den ytterste strukturen hos en rekke bakterier, både Gram-positive og Gram-negative. Den utgjør en gelatinøs masse omkring bakterien, der dens funksjon er å beskytte

bakterien fra å bli oppdaget av immunforsvaret ved infeksjon (15). Samtidig utgjør kapsel en mulig svakhet for patogenet ettersom verten kan produsere anti-kapsel antistoffer som opsoniserer patogenet, og dermed fasiliterer fagocytose og eliminering ved nøytrofile granulocytter (16). Bortsett fra *Bacillus anthracis*, agens for miltbrann, som produserer kapsel av poly- γ -glutamat (PGA), består alle andre kjente bakterielle kapsler av polysakkarider (capsular polysaccharide, CP, kapsel) (15). Hos *S. aureus* er kapsel og dens antifagocytotiske egenskaper godt beskrevet og dokumentert i litteraturen (16-18). De to klinisk viktigste kapselserotypene; serotype CP5 og CP8 er representert i >75 % av sykdomsrelaterede isolater (16;18). Det er i *S. aureus oriC* environs høyre del at genene for flere virulensfaktorer befinner seg; protein A (*spa*), koagulase (*coa*) og kapseloperonet (*cap5/8A-P*) (9).

Hos *S. haemolyticus* JCSC1435, er det funnet 57 åpne leserammer (open reading frames, ORFs) assosiert med virulens. Disse koder for de antatte virulensfaktorene; hemolysiner, adhesiner, sekretoriske antigener, serinproteaser, eksonukleaser og kapsel. I likhet med *S. aureus*, befinner det seg også et kapseloperon (*cap_{Sh}*) i *S. haemolyticus* JCSC1435 *oriC* environs høyre del. Dette består av 13 ORFs; *capA* til *capM*. De første syv genene (*capA-G*) er homologe til *S. aureus cap5/8A-G*. Men de siste seks genene (*capH-M*) er unike for *S. haemolyticus* JCSC1435 og koder sannsynligvis for flippaser, aminotransferaser, glykosyltransferaser og transkripsjonsregulatorer (9). Operon *cap_{Sh}* ble gjenfunnet i humane, kliniske isolater av Flahaut og medarbeidere i 2008, som i tillegg visualiserte kapselen ved elektronmikroskopi og bekreftet dens beskyttende effekt mot opsonisering og fagocytose ved humane nøytrofile granulocytter (19). I 2019 fant Pain og medarbeidere totalt fire kapseloperoner. Det allerede kjente operon *cap_{Sh}* hos *S. haemolyticus* JCSC1435 ble funnet i 17 kliniske isolater av 169 isolater. I tillegg ble det identifisert tre nye kapseloperoner i 52 av 169 isolater. Alle fire inneholdt samme *capA-G*, men *capH-K* var unikt for hvert av de tre nye kapseloperonene. To av disse tre inneholdt også *capL-P* som betyr at de er homologe med *S. aureus cap5/8*, men som *S. haemolyticus* JCSC1435 operon *cap_{Sh}* mangler. Disse tre nyoppdagede kapseloperonene har dermed en potensiell rolle for *S. haemolyticus*' virulens (8).

2.2 Det medfødte immunforsvaret

Immunsystemet er menneskekroppens eget forsvar mot patogener. Det er et todelt system med medfødt immunforsvar og ervervet, eller adaptivt, immunforsvar. Hud og slimhinner

representerer kroppens fysiske og kjemiske barrierer, og immunsystemets funksjon er å finne og destruere patogener når de bryter disse barrierene og trenger inn i kroppen. Det medfødte immunforsvaret virker raskest og er ikke-spesifikt, mens det adaptive er spesifikt og slår først inn når det medfødte immunforsvaret ikke evner å stoppe infeksjonen alene (20).

Det medfødte immunforsvaret er det første som responderer ved en infeksjon, både bakteriell og viral. Det er kroppens førstelinjeforsvar og består av fire hovedelementer: 1) patogenreseptorer som bindes ikke-kovalent til patogenets overflate; 2) proteiner, eksempelvis komplement, som binder kovalent til patogenets overflate og danner ligand for fagocytters reseptorer; 3) fagocytter som «sluker» og dreper patogener; og 4) cytotoksiske celler som dreper virusinfiserte celler (20).

2.2.1 Komplementsystemet

En av de første mekanismene som aktiveres når en patogen bryter kroppens barrierer, er komplementsystemet. Det er et kaskadesystem av løselige proteiner som ligger latent i blod, lymfe og ekstracellulær væske og produseres i leveren (20). Systemet aktiveres av ukjente antigeners tilstedeværelse og fører til en proteolytisk kaskade som ender med dannelse av nøytrofil-opsoninet C3b, de kjemotaktiske peptidene C3a og C5a og «terminal complement complex» (TCC) som bidrar til cellelyse (21).

Komplementsystemet kan aktiveres gjennom tre forskjellige signalveier: alternativ, mannosebindende lektin (MBL) og klassisk signalvei (figur 2). De aktiveres av ulike triggere, og helt uavhengig av hverandre. Ved aktivering av alternativ signalvei skjer en «spontan» aktivering av C3 nært bakteriens cellemembran, som fører til spalting av C3 til C3a og C3b. C3b binder kovalent til bakterieoverflaten og fungerer dermed som et opsonin. Ved aktivering av lektin-signalvei produseres MBL av leverceller som respons på interleukin-6 (IL-6) utskilt fra makrofager som har vært i kontakt med ekstracellulære bakterier. MBL sirkulerer i plasma der det gjenkjenner og binder mannose-molekyler på bakterieoverflaten. Denne bindingen fører til aktivering av komplementkaskaden. Den klassiske signalveien kan aktiveres gjennom flere mekanismer ved at den klassiske komplementfaktoren C1q binder 1) direkte til bakterielle overflatestrukturer, 2) til C-reaktivt protein (CRP) bundet til bakterieoverflaten, eller 3) til antistoffer bundet til antigen på bakterieoverflaten. Binding av C1q aktiverer kaskaden (20).

Ved en bakteriell infeksjon kan komplementsystemet bidra til bakteriedrap på tre måter. Først og fremst ved opsonisering med C3b som fører til mer effektiv fagocytose. Den andre måten er via C3a og C5a som fører til en inflammasjonsreaksjon med økt endotelpermeabilitet og tilstrømming av makrofager og nøytrofile granulocytter. Den siste måten er bakteriolyse ved perforasjon av bakteriens cellemembran som følge av dannelse av C9-polymerer som danner en ringformet pore i bakterieveggen, «terminal complement complex» (TCC) (20).

2.2.2 Patogenreseptorer

«Pattern Recognition Receptors» (PRR) er reseptorer uttrykt av forskjellige immunceller og epitelceller. De binder konserverte strukturer «Pathogen-Associated Molecular Patterns» (PAMPs) som uttrykkes på overflaten av mikroorganismer, men ikke mennesker. «Toll-like Receptors» (TLRs) er en gruppe PRR som binder ekstracellulære patogener. «NOD-like Receptors» (NLRs) er en gruppe PRR som binder intracellulære degraderingsprodukter fra fagocytterte patogener. Binding av disse reseptorene på makrofager fører til rekruttering av andre immunceller i det medfødte immunforsvaret til det infiserte vevet (20).

2.2.3 Celler og signalstoffer

De viktigste cellene i det medfødte immunforsvaret er makrofager, nøytrofile granulocytter og «Natural killer»-celler (NK-celler). Makrofager og nøytrofile granulocytter er fagocytter som omslutter, eller «sluker», patogenene og destruerer dem. Makrofager er modne monocytter som har gått fra blodsirkulasjonen og ut i vevet. De befinner seg til enhver tid ute i vevet, har lang levetid og er den første immuncellen som oppdager infeksjon og initierer videre immunrespons. Makrofagens funksjon som fagocytt effektiviseres ved opsonisering: den kan binde komplement bundet til bakterier med komplementreseptorer, blant annet «complement receptor 1» (CR1), CR3 og CR4 (20). Nøytrofile granulocytter har kort levetid og sirkulerer i blodet inntil de får signal fra makrofager om å gå inn i det infiserte vevet. Deres tilstedeværelse i vevet er det første som skjer i en inflammatorisk respons, og deres eneste funksjon er fagocytose av patogener. NK-celler rekrutteres til det infiserte vevet som del av inflammatorisk respons og utskiller selv cytokiner som forsterker makrofagens respons på infeksjon (20).

Cytokiner er små, løselige proteiner som brukes til kommunikasjon mellom celler. Når makrofagene har oppdaget infeksjon i vevet aktiveres de og utskiller flere cytokiner for å rekruttere andre celler til det infiserte vevet. De viktigste cytokinene i denne fasen av

infeksjonen er de proinflammatoriske cytokinene: IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8 og tumor nekrose faktor- α (TNF- α). IL-1 β og TNF- α øker endotelpermeabilitet slik at effektorceller og væske med ulike substanser kommer til det infiserte vevet. IL-6 øker fett- og muskelcellers metabolisme slik at temperaturen øker i det infiserte området. IL-8 (eller «C-X-C Motif Chemokine ligand 8», CXCL8) er et kjemokin som tiltrekker nøytrofile granulocytter fra sirkulasjonen til infeksjonsfokus. IL-12 rekrutterer og aktiverer NK-celler (20).

2.3 Problemstilling

Selve oppgaven er gjennomført i en fullblodmodell først etablert av Mollnes og medarbeidere (22). I denne oppgaven har vi benyttet modellen, men modifisert den til den spesifikke problemstillingen.

Målsetningene for denne oppgaven var:

1. Å undersøke om *S. haemolyticus* i biofilm gir en annen immunrespons sammenlignet med *S. haemolyticus* i planktonisk vekst.
2. Å undersøke om kapsel beskytter mot immunaktivering med endret cytokinnivå i fullblod som indirekte mål på dette.

Hypotesen var at biofilm og kapsel skjuler overflate-assosierte faktorer på bakteriene som gjør at kroppens immunceller verken oppdager eller eliminerer bakteriene. På denne måten beskytter biofilm og kapsel bakteriene, og initierer en lavere grad av immunrespons enn bakterier uten disse beskyttelsesmekanismene, altså bakterier i planktonisk vekst og bakterier uten kapsel.

I oppgaven har vi også forsøkt å standardisere fullblodmodellen ved å undersøke om varmeinaktiverte bakterier gir samme immunrespons som planktoniske bakterier. Dersom det er store forskjeller innad i gruppen med planktoniske bakterier, men ikke i gruppen med varmeinaktiverte bakterier, indikerer dette at de varmeinaktiverte bakteriene er mer stabile og bedre egnet som standard fremfor planktoniske bakterier.

En siste målsetning for denne oppgaven var at jeg personlig ønsket å tilegne meg erfaring med immunologiske og mikrobiologiske laboratorieeksperimenter, slik at jeg senere i yrkeskarrieren kan ha en større forståelse av slik viktig basalforskning.

3 Materiale og metode

3.1 Studiepopulasjon

Vi samlet prøver med fullblod fra ti friske, voksne donorer. Vi fikk imidlertid kun kjørt cytokinanalyser på ni av ti donorer. Kjønnfordelingen var fem menn og fire kvinner, med gjennomsnittsalder på 34 år og median på 30 år. Donorene var fastende, hadde ingen kroniske sykdommer, brukte ingen faste medisiner, hadde ikke hatt infeksjonssykdom eller feber siste 7 dager og hadde ikke vært i uttalt fysisk aktivitet samme morgen som de møtte til blodprøvetaking. Donorene var frivillige, rekruttert fra det lokale universitetsmiljøet. De ga sitt informerte samtykke skriftlig før blodprøvetaking.

3.2 Bakteriestammer og fremstilling av biofilm

Det ble brukt to bakteriestammer av *S. haemolyticus* som begge er kliniske isolater fra blodkulturer tatt av pasienter fra Universitetssykehuset Nord-Norge, Tromsø, og lagret i stammebanken til Pediatrisk forskningsgruppe ved Universitetet i Tromsø.

- Stamme 25-63 ble valgt fordi den har evne til biofilmdannelse, men mangler kapseloperon (KO-).
- Stamme 53-38 ble valgt fordi den har evne til biofilmdannelse, og et kapseloperon (KO+).

3.2.1 Bakterieinokulat til *ex vivo* human fullblodmodell

3.2.1.1 Planktoniske bakterier

I forsøkene med planktoniske bakterier ble det brukt en endelig konsentrasjon på $\sim 10^7$ «colony forming units» (CFU) mL⁻¹, beregnet fra 0,5 McFarland-løsning (Biosan DEN-1 McFarland densitometer, Riga, Latvia). Stamme 25-63 og 53-38 ble spredt ut på blodagarskåler og dyrket over natten ved 37 °C. Fra disse ble det laget 0,5 McFarland-løsning av hver av stammene, som så ble fortynnet 1:10 med sterilt fosfat-bufret saltvann («phosphate-buffered saline»; PBS, uten Ca²⁺ og Mg²⁺, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland). Dette inokulatet ble brukt til blodmodellen (rør). For å verifisere antall bakterier, ble det laget fortynningsrekker fra 10⁻¹ til 10⁻⁶ der inokulatet ble fortynnet med fysiologisk saltvann (NaCl 0,9 %, UNN Tromsø, Norge), som så ble spredt ut på trypsin-soya agarskåler («tryptic soy

agar»; TSA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), og dyrket over natten ved 37 °C. CFU mL⁻¹ ble så beregnet retrospektivt av forsøkene.

3.2.1.2 Varmeinaktiverede bakterier

For dyrkning, varmeinaktivering og telling av de varmeinaktiverede bakteriene til forsøkene, ble det benyttet metode beskrevet av Brekke og medarbeidere med modifikasjoner (23). Modifikasjoner ble gjort for vekstmedium (trypsin-soyabuljong («tryptic soy broth»; TSB) istedenfor LB-medium) og fortynningsvæske (PBS istedenfor NaCl). Varighet og temperatur på varmeinaktivering ble endret fra 60 til 90 minutter, 60 til 61°C, samt at pelleten ble fordelt i 2 rør istedenfor 1 rør før vaskingen. Dette ble gjort for å sikre tilstrekkelig varmeinaktivering ettersom *S. haemolyticus* dannet en stor bakteriepellet. Oppsummert ble stamme 25-63 og 53-38 hentet opp fra -70 °C, spredt på blodagarskåler og dyrket over natten ved 37 °C. Neste dag ble bakteriekolonier overført til TSB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland), og inkubert over natten ved 37 °C med RPM 200 («rounds per minute»; RPM) i risteinkubator (Benchmark Incu-shaker 10LR, NJ, USA). Bakteriene ble så overført til sterile rør, sentrifugert én gang (Beckman Coulter Avanti J-26 XP centrifuge, CA, USA. 3220 x g, 10 min ved 4 °C), fordelt i to 50 mL rør (VWR® Centrifuge Tube, PA, USA), deretter vasket én gang (3220 x g, 10 min ved 4 °C) med 50 mL PBS, for så å samle begge pelletene for hver av stammene og resuspendere i 18 mL PBS. Hver stamme ble så fordelt i 10 Nunc-rør (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) med 1,8 mL i hver. Disse rørene ble varmeinaktivert ved 61 °C i 90 minutter. Etter varmeinaktivering ble rørene fryst ned til -70 °C. Som kontroll ble det laget dyrkning fra hvert varmeinaktivert rør på blodagarskål som ble inkubert over natten ved 37 °C. Rør med kolonier ble ansett som ikke-varmeinaktiverte og ble kastet. For klargjøring til bruk ble det for hver av stammene opptint et av rørene med varmeinaktiverte bakterier, som så ble overført til et 50 mL rør (VWR® Centrifuge Tube, PA, USA) og vasket seks ganger med 50 mL iskald PBS som beskrevet ovenfor. Etter vaskingen ble pelleten resuspendert i 50 mL PBS.

Telling av bakterier ble gjort ved at bakterier fra sistnevnte suspensjon ble fortynnet 1:500 med PBS, der 2450 µL så ble overført til et rør laget for flowcytometri (5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube w/Cell-Strainer Cap, Corning Science, Tamaulipas, Mexico). Til dette røret ble det tilsatt 50 µL CountBright® (Life Technologies Corporation, OR, USA).

CountBright® er en kalibrert suspensjon av mikrosfærer, eller «kuler», som er fluorescerende

over et bredt spekter av bølgelengder for eksitasjon og emisjon, og har en kjent konsentrasjon av disse mikrosfærene. Det tilsettes et spesifikt volum av CountBright® til et spesifikt volum med prøve. Dermed er ratioen mellom prøvevolum og mikrosfærevolum kjent. Det analyserte prøvevolumet kan kalkuleres fra antall mikrosfærehendelser (eksitasjoner og emisjoner), og kan dermed brukes til å bestemme cellekonsentrasjon (24). Bakteriene ble talt ved flowcytometri (BD LSRFortessa™ Cell Analyzer, BD Biosciences, NJ, USA), og konsentrasjonen av stamme 25-63 og 53-38 ble kalkulert etter formel i instruksjonsmanual for CountBright®. Det ble telt $3,55 \times 10^8$ bakterier/mL PBS for stamme 25-63, og $3,36 \times 10^8$ bakterier/mL PBS for stamme 53-38. Disse ble justert til $0,7 \times 10^9$ bakterier/mL PBS og oppbevart ved 4 °C inntil forsøkene ble igangsatt. Prøvene var holdbare ved denne temperaturen for opptil fire måneder.

3.2.1.3 Bakterier i biofilm

Biofilmen ble etablert i en plastikkslange (3-veiskran med 30 cm forlengelsesslange av di-2-etylheksylftalat, DEHP, Mediplast AB, Malmö, Sverige) hovedsakelig etter metoder beskrevet av Fredheim (25) og Granslo (14). Modifikasjoner fra disse metodene er endring av leie, fortynningsgrad og at slangene ikke ble fryst ned. Kort oppsummert innebærer dette at det ble laget 0,5 McFarland-løsning av bakteriekolonier dyrket over natten ved 37 °C på blodagarskåler. Av denne løsningen ble det laget fortynning 1:10 med TSB med 1 % glukose som vekstmedium. Fortynningen ble så overført til slanger med 3-veiskran. Disse ble lukket ende til ende, og dannet dermed en lukket sløyfe. Slangene ble plassert i flatt, statisk leie i inkubator ved 37 °C i 24 timer. Deretter tømtes slangene og ble vasket forsiktig to ganger med sterilt PBS uten Ca^{2+} og Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland). Inkubering av slangene for biofilmdannelse i 24 timer i statisk leie ble valgt på bakgrunn av at det ble gjort pilotforsøk med dyrkning av biofilm i slanger i både 24 og 48 timers biofilm i slanger, både roterende og i statisk leie, uten nevneverdig forskjell i mengde biofilm som ble dannet (ikke vist i figur).

3.3 *Ex vivo* human fullblodmodell

Fullblod fra friske, voksne donorer ble samlet i 5 sterile vakuumbører av polyetylentereftalat (PET) med 18 IU heparin per mL blod (6 mL, Vacuette® NH Sodium Heparin, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Østerrike). Heparin ble valgt som antikoagulant som andrevalg til lepirudin (Refludan®, Hoechst) ettersom lepirudin er gått ut av produksjon og laboratoriet

hadde svært begrensede mengder. Heparin ble valgt på bakgrunn av at den er en naturlig forekommende antikoagulant i kroppen, der den danner et kompleks med antitrombin III som inhiberer trombin og aktivert faktor X, og hindrer dermed koagulasjon. Den virker momentant *in vivo/in vitro*. Heparin ble valgt fremfor EDTA og citrat siden disse fjerner Ca^{2+} og Mg^{2+} , og endrer dermed på sammensetningen av fullblod slik at blodet ikke lengre er reelt representativt for humant fullblod. Blodprøvene ble tatt umiddelbart før hvert forsøk og oppbevart ved 37 °C inntil inokulatet ble tilsatt. Hvert oppsett ble gjennomført med blod fra ti donorer, og initiert innen 15 min etter takning for å unngå ikke-spesifikk aktivering av det medfødte immunforsvaret.

Metode for igangsetting av immunrespons tidligere beskrevet av Fredheim ble modifisert (25). For forsøket med planktoniske bakterier, ble ferskt humant fullblod stimulert parallelt med stamme 25-63 og stamme 53-38. Begge stammene ble tilsatt både som planktoniske og varmeinaktiverede bakterier i totalt åtte paralleller (rør), der immunresponsen ble stoppet ved tilsetting av EDTA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) etter to og fire timer. Kontrollene til forsøket i rør var sterile rør kun tilsatt blod som ble inkubert med PBS, deretter tilsatt EDTA etter endt inkubasjonstid på 2 eller 4 timer. Biofilm i slanger ble fremstilt som tidligere beskrevet med stammene 25-63 og 53-38 i forkant av hvert forsøk med fullblodmodellen. Med andre ord, ble det ikke tilsatt planktoniske bakterier i blodet som sirkulerte i slangene. Kontrollene til forsøket med slanger med biofilm var slanger inkubert med kun TSB med 1 % glukose i 24 timer i flatt, statisk leie. Alle slangene ble tømt for deres innhold, enten vekstmedium + bakterier eller kun vekstmedium, og deretter skylt med PBS to ganger før blod ble overført til slangene ved bruk av steril 10 mL sprøyte av polypropylen (Omnifix® Luer Solo, B. Braun, Melsungen, Tyskland) og steril kanyle (Sterican®, 21G x 3 1/8", B. Braun, Melsungen, Tyskland). Slangene ble så inkubert på langsom rotasjon med RPM 5 på 37 °C i to eller fire timer. Ved endt inkubasjonstid ble blodet i slangene overført til polypropylenrør (5 mL, Nunc cryotubes, Nalge Nunc International, NY, USA) og satt på is. Innen 10 minutter ble alle rørene (biofilm, planktoniske og varmeinaktiverede) sentrifugert ved 3000 x g i 20 minutter ved 4 °C. Minimum 75 µL plasma ble så pipettert over i eppendorf-rør (2 mL, DNA LoBind Tube, Eppendorf SE, Hamburg, Tyskland) og fryst ned til -70 °C. Fra disse prøvene ble det gjort cytokinanalyse.

3.4 Undersøkelse av cytokiner

Cytokinrespons ble målt i plasmaprøvene for begge stammene av *S. haemolyticus*, både planktoniske og varmeinaktiverte bakterier etter to og fire timer, og bakterier i biofilm etter to og fire timer, samt kontroller; rør uten tilsatte bakterier, og slanger uten biofilm og tilsatte bakterier.

For å analysere nivået av cytokinene IL-6, IL-8 og TNF- α ble «Luminex® Performance Assay; Human Cytokine Premixed Kit A» (R&D Systems®, MN, USA) benyttet for de første prøvene (3 donorer), mens de resterende prøvene (6 donorer) ble analysert ved hjelp av «Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 8-plex Assay #M50000007A» (Bio-Rad® Laboratories GmbH, Feldkirchen, Tyskland). Grunnen til bytte av leverandør var leveranseproblemer hos førstnevnte produsent. Begge analysene fungerer etter samme prinsipp. Første forsøk med Luminex® ble gjort i henhold til produsentens vedlagte protokoll med følgende modifikasjon: tillaging av mikropartikkel-cocktail ble modifisert for å sikre tilstrekkelig mengde mikropartikkel-løsning til alle prøvene. Volumet av «micropartical diluent» ble økt fra 4,5 mL til 4,8 mL, som ble tilsatt i 1000 μ L (standardmengde) «micropartical cocktail».

Luminex® og Bio-Plex Pro™ er begge kulebaserte immunanalyser («bead-based immunoassay») som måler flere analytter i én og samme prøve (26). Prinsippet for denne typen immunanalyse er at magnetiske mikrosfærer, eller «kuler», er innvendig farget med røde og infrarøde fluorofores av ulike intensiteter som merkes med et bestemt tall, eller kuleregion, som muliggjør differensiering mellom kulene (figur 3). Et kulesett med samme kuleregion dekkes på forhånd med analytt-spesifikke antistoffer som brukes for å «fange» analytten av interesse, der ulike kuler dekket med ulike analytt-spesifikke antistoffer kan blandes i samme analyse. Testmaterialet tilsettes i en løsning med disse fargekodede kulene med analytt-spesifikke antistoffer, som så «fanger» analyttene av interesse. Deretter merkes de «fangede» analyttene av et biotinyleret analytt-spesifikt antistoff som binder til et passende epitope på selve analytten (26;27). Det dannes dermed en slags antistoff-antigen «sandwich» (samme prinsipp som ved «enzyme-linked immunosorbent assay»; ELISA). Nederst er fargekodede kuler dekket med «fangst»-antistoffer som binder til analytten (antigenet). Øverst er analytten bundet av biotinylerede «merke»-antistoffer. Etter å ha vasket bort ubundet testmaterial, tilsettes streptavidin-konjugert phycoerythrin (PE) som binder til de biotinylerede antistoffene. Kulene leses så av på et instrument med dobbel laser (Bio-Plex™ 200 System,

Bio-Rad Laboratories, CA, USA) med Luminex® påvisningssystem (Luminex® xMAP™ Technology, R&D Systems®, MN, USA). Én laser klassifiserer kuleregion med dens korresponderende spesifikke analytt. Den andre laseren måler intensiteten av PE-fluorescens som er direkte proporsjonal med mengden analytt bundet til aktuelle kuleregion (26).

Verdier utenfor referanseområdet («out of range»; OOR) ble i rådataen kun angitt som OOR over (>) eller under (<). I våre resultater var det totalt 46 prøver som var OOR>, og én prøve OOR<. For å kunne bruke disse dataene til grafisk fremstilling og statistikk ble OOR< satt til et tilfeldig tall under laveste målte verdi for aktuelle cytokin, og OOR> satt til et tilfeldig tall over høyeste målte verdi for aktuelle cytokin. Verdiene for OOR< og OOR> ble som følger: IL-6 (0,3 , $2,8 \times 10^6$), IL-8 (0,4 , $1,25 \times 10^7$), TNF- α (3,5 , $1,48 \times 10^{11}$). Grunnen til at disse verdiene ikke ble satt til laveste og høyeste standardverdi var fordi det ble målt verdier langt høyere enn høyeste standardverdi (S1), og lavere enn laveste standardverdi (S8), slik at dataene ville blitt feilaktige om OOR-prøver hadde blitt byttet ut med disse. S1-verdi pg/mL for Bio-Plex: IL-6 – 5823 pg/mL, IL-8 – 15 080 pg/mL, TNF- α – 62 382 pg/mL.

3.5 Undersøkelse av biofilmdannelse

For å undersøke *S. haemolyticus*' evne til biofilmdannelse i slangene ble den etablerte metoden semikvantitativ bestemmelse av biofilmdannelse beskrevet av Christensen og medarbeidere både gjort som tidligere beskrevet (for mikrotiterplate) og modifisert (for slanger) (28). I den modifiserte prosedyren ble 24 timers biofilm fremstilt i slanger som tidligere beskrevet for begge stammene. Etter å ha skylt to ganger med sterilt, romtemperert PBS, ble slangene fiksert ved 55 °C i 1 time. De ble så farget med 0,4 % krystallfiolett i 5 minutter, deretter vasket med springvann til slangene ikke ga fra seg farge lengre. Videre ble de tilsatt 70/30 etanol/acetone-løsning i 5 minutter for å løse opp krystallfiolett som var bundet til biofilmen. Denne væsken med oppløst krystallfiolett ble så overført til 2 mL eppendorf-rør (DNA LoBind Tube, Eppendorf SE, Hamburg, Tyskland). Det ble pipettert 200 μ L i 6 brønner av hver prøve, eller til eppendorf-røret var tomt. Optisk tetthet («optical density»; OD) ble målt ved ELISA plateleser (CLARIOstar® Plus Microplate Reader, BMG Labtech, Ortenberg, Tyskland) på 570 nm, enkel bølgelengde.

3.6 Etikk

Prosjektet har vært vurdert av Regionale komiteer for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (REK) og anses ikke som framleggingspliktig, jf. Helseforskningsloven § 2. Se vedlegg for vedtaksbrev og infoskriv til bloddonorere.

3.7 Statistikk

Det ble benyttet uavhengig ikke-parametrisk Mann-Whitney U test for å undersøke om det var forskjell i biofilmdannelse. Testen ble benyttet siden dette var forsøk uten blod, dermed ble prøvene regnet som uavhengige av hverandre. Vi gjorde sammenligning;

- Mellom slanger og mikrotiterplate innenfor samme stamme.
- Mellom de to stammene i både slanger og mikrotiterplate.

Vi utførte også parallelle forsøk med sammenligning;

- Mellom blod tilsatt planktoniske bakterier av KO- og KO+ etter 2 og 4 timer.
- Mellom blod tilsatt varmeinaktiverte bakterier av KO- og KO+ etter 2 og 4 timer.
- Mellom blod tilsatt planktoniske og varmeinaktiverte bakterier innbyrdes for begge stammene etter 2 og 4 timer.

Cytokinnivå av IL-6, IL-8 og TNF- α i fullblod ble analysert. De immunologiske responsene avhenger av individuelle immunologiske karakteristika hos hver enkelt bloddonor, dermed vil en uavhengig test ikke være riktig å bruke. Det ble derfor benyttet avhengig ikke-parametrisk Wilcoxon Signed-Rank test for å undersøke om det var forskjeller i immunrespons mellom gruppene nevnt ovenfor. Alle tester var to-halet («two-tailed») og statistisk signifikans ble satt til $p < 0,05$. Alle statistiske analyser ble gjort ved bruk av IBM SPSS Statistics programvare, versjon 28.0 (IBM North America, NY, USA).

4 Resultater

4.1 Biofilmdannelse

For KO- var gjennomsnittlig OD i mikrotiterplate $1,69 \pm 0,19$, og i slange brukt til *ex vivo* human fullblodmodell $2,83 \pm 0,22$ (figur 4).

For KO+ var gjennomsnittlig OD i mikrotiterplate $2,13 \pm 0,14$, og i slange brukt til *ex vivo* human fullblodmodell $3,07 \pm 0,08$ (figur 4).

Både KO- og KO+ hadde større grad av biofilmdannelse i slanger sammenlignet med i mikrotiterplate, p -verdi $< 0,001$. KO+ produserte biofilm i større grad enn KO-, både i mikrotiterplate og i slanger, p -verdi $< 0,001$. Det var mer variasjon i grad av biofilmdannelse mellom forsøkene med *ex vivo* human fullblodmodell for KO- sammenlignet med KO+.

4.2 Cytokinutskillelse som respons på biofilm

Det var generelt høy immunaktivering i biofilmprøvene, men også i kontrollene uten biofilm etter 2 og 4 timer (spesielt høy utskillelse av IL-6 og IL-8). Etter de to første cytokinanalysene observerte vi særlig høy aktivering på 4 timers prøvene, og det ble derfor besluttet å ikke analysere resterende 4 timers biofilmprøver.

For IL-6 var det én prøve av kontrollene uten biofilm ved 4 timer som var over referanseområdet (OOR>).

For IL-8 var det totalt nitten prøver over referanseområdet (OOR>); hvorav åtte prøver av KO- 2 timer, tre prøver av KO- 4 timer, to prøver av kontroll uten biofilm 4 timer, fem prøver av KO+ 2 timer, og én prøve av KO+ 4 timer.

For TNF- α var det særlig høy cytokinutskillelse som respons på KO- etter både 2 og 4 timer. For TNF- α var det totalt tretten prøver over referanseområdet (OOR>); hvorav fire prøver av KO- 2 timer, to prøver av KO- 4 timer, og syv prøver av KO+ 2 timer.

Under feilsøking for årsaker til den generelt høye immunaktiveringen, fant vi at det ikke ble tilsatt EDTA til biofilmprøvene etter endt inkubasjonstid for å stoppe immunresponsen. På bakgrunn av at disse prøvene ikke ble behandlet likt som de andre prøvene (planktoniske og varmeinaktiverede bakterier) siden det ikke ble tilsatt EDTA, de fleste verdiene var OOR>.

samt at også kontrollene uten biofilm var høye – besluttet vi å ikke stole på disse dataene og inkluderte de ikke videre i de statistiske analysene. Kun konsentrasjonen av IL-6, IL-8 og TNF- α i prøvene fra slanger både med og uten biofilm er fremstilt i henholdsvis figur 5, 6 og 7.

For å undersøke grad av overensstemmelse mellom de to kitene utførte vi kontrollprøver der vi gjentok prøver i kit fra Bio-Rad® som vi allerede hadde kjørt i første cytokinanalyse med kit fra R&D Systems®. Generelt var alle cytokinmålingene høyere med Bio-Rad® sammenlignet med R&D Systems® (ikke vist i figur). Dermed har prøver på både planktoniske og varmeinaktiverede bakterier, samt bakterier i biofilm av KO- fra tre donorer vesentlig lavere tall.

4.3 Cytokinutskillelse som respons på planktoniske versus varmeinaktiverede bakterier

I våre analyser ble det funnet en forskjell i cytokinaktivering for alle målte cytokiner (IL-6, IL-8 og TNF- α) med p -verdi 0,01 mellom planktoniske og varmeinaktiverede bakterier innbyrdes for begge stammene (KO- og KO+), for begge tidspunkt (2 og 4 timer) (tabell 2). De planktoniske bakteriene induserer større cytokinutskillelse sammenlignet med varmeinaktiverede bakterier med lik inkubasjonstid.

Det ble også funnet en forskjell i utskillelse av TNF- α etter 4 timer mellom planktoniske bakterier av KO- og KO+, $p < 0,05$ (tabell 2). Planktoniske bakterier av KO+ induserer større utskillelse av TNF- α etter 4 timer enn planktoniske bakterier av KO-. For de øvrige cytokinene ble det ikke funnet forskjell. Se tabell 1 for median konsentrasjon av de ulike cytokinene produsert som respons på planktoniske og varmeinaktiverede bakterier av KO- og KO+.

For IL-6 var det én prøve av planktonisk KO+ etter 4 timer som var over referanseområdet (OOR>). For IL-8 var det totalt syv prøver over referanseområdet (OOR>); hvorav to prøver av planktonisk KO- etter 4 timer, og fem prøver av planktonisk KO+ etter 4 timer. For TNF- α var det totalt fem prøver over referanseområdet (OOR>); samtlige på planktonisk KO+ 4 timer. Det var én prøve under referanseområdet (OOR<); negativ kontroll 2 timer.

Tilført mengde planktoniske bakterier til hvert oppsett ble kontrollert ved å beregne CFU ml⁻¹ retrospektivt av hvert forsøk (tabell 3). Konsentrasjonen av IL-6, IL-8 og TNF- α i prøvene med planktoniske og varmeinaktiverte bakterier er fremstilt i henholdsvis figur 8, 9 og 10.

5 Diskusjon

5.1 Egne funn

I fullblodmodellen fant vi at de planktoniske bakteriene induserte større cytokinutskillelse sammenlignet med varmeinaktiverte bakterier med lik inkubasjonstid. To mulige forklaringer på dette er; 1) at det er forskjell i bakteriekonsentrasjon mellom planktoniske og varmeinaktiverte bakterier, eller 2) at planktoniske bakterier aktiverer immunforsvaret i større grad enn varmeinaktiverte bakterier. For planktoniske og varmeinaktiverte bakterier var bakteriekonsentrasjonen i fullblodmodellen henholdsvis $\sim 10^7$ CFU ml⁻¹ og $7,0 \times 10^8$ bakterier/mL PBS, som er en relativt liten forskjell i inflammasjonsstudier. Av tabell 3 ser vi at det var lite variasjon mellom bakterier tilført blodet til de ulike donorene. For de varmeinaktiverte bakteriene ble det tatt opp et visst volum fra samme beholder med justert bakteriekonsentrasjon for hvert forsøk, slik at det var lik bakteriekonsentrasjon for hvert oppsett. Det er derfor lite sannsynlig at det er forskjell i bakteriekonsentrasjon som er årsak til forskjellen vi ser mellom planktoniske og varmeinaktiverte bakterier.

Det var lite variasjon mellom tallene for alle målte cytokiner hos de ulike donorene for både planktoniske og varmeinaktiverte bakterier av begge stammer inkubert i 2 timer. Det var dog stor variasjon i tallene for planktoniske bakterier inkubert i 4 timer, som man ikke så hos varmeinaktiverte bakterier med samme inkubasjonstid. Hypotesen i problemstillingen var at dersom det var store forskjeller innad i gruppen med planktoniske bakterier, men ikke i gruppen med varmeinaktiverte bakterier, indikerte dette at de varmeinaktiverte bakteriene er mer stabile og bedre egnet som standard fremfor planktoniske bakterier. Basert på dette ville man derfor tenke at de varmeinaktiverte bakteriene er mer gunstige å bruke enn de planktoniske. Men siden det er lite variasjon både innad i gruppen med varmeinaktiverte bakterier og på tvers av inkubasjonstider, fremstår det som at varmeinaktiverte bakterier i liten grad aktiverer immunforsvaret i det hele tatt. For *S. aureus* har flere studier funnet at svekkede planktoniske bakterier i vaksine induserer en sterkere immunrespons enn varmeinaktiverte bakterier ved måling av antistoff (IgG) og cytokiner (blant annet IL-12, TNF- α og IL-6), der varmeinaktiverte bakterier også viser redusert evne til å indusere

immunrespons (29;30). Det samme har blitt funnet for en bakterie av en annen bakterieslekt, *Mycoplasma bovis* (31). Varmeinaktiverte bakterier klarte ikke å inducere cellulær respons ved måling av blant annet TNF- α , IL-1 β , IL-6 eller IL-8, sammenlignet med kraftig utskillelse ved stimulering med planktoniske bakterier (31). Cruciani og medarbeidere foreslo at denne endringen i immunogenisitet hos varmeinaktiverte bakterier kunne relateres til omfattende endringer av PAMPs og andre strukturer under varmeinaktivering (30). Varmeinaktiverte bakteriers nytte i inflammasjonsstudier fremstår dermed begrenset sammenlignet med planktoniske bakterier. Sett sammen med våre funn der planktoniske bakterier inducerer sterk immunaktivering både etter 2 og 4 timer, fremstår planktoniske bakterier som mer gunstige å bruke videre i fullblodmodellen. De planktoniske bakteriene er intakte og kan produsere immunreaktive stoffer i blodet, eksempelvis fenol-løselige moduler hos *S. haemolyticus* som er sterkt proinflammatoriske og fremmer kjemotaksis av nøytrofile granulocytter (10). Dersom man i videre studier benytter inkubasjonstid på 2 timer vil det være fordelaktig å benytte planktoniske bakteriene siden de også simulerer en «ekte» infeksjonssituasjon.

Et annet funn i dette forsøket var at planktoniske bakterier av KO+ induserte større utskillelse av TNF- α etter 4 timer enn planktoniske bakterier av KO-. Ifølge vår hypotese, vil kapsel beskytte mot fagocytose, og dermed utskillelse av cytokiner. Hos *S. aureus* har man funnet at kapseluttrykk *in vitro* er avhengig av en rekke miljøbetingelser (32-36), og dermed er kapseluttrykk svært varierende og vekstfaseavhengig *in vitro* (33;36-38). *In vivo* uttrykker *S. aureus* kapsel i større grad, men også der er uttrykket sterkt miljøavhengig (36;39-42). For *S. haemolyticus* verifiserte Flahaut kapseluttrykk hos JCSC1435 *in vitro* med TSB med 1 % glukose som vekstmedium (19). I vårt forsøk har vi ikke kontrollert om bakteriestammen med kapseloperon (KO+) faktisk uttrykker kapsel under betingelsene i dette forsøket. Vårt funn må tolkes med forsiktighet, og for videre studier bør kapseluttrykket verifiseres under betingelsene i *ex vivo* fullblodmodellen.

I dette forsøket produserte KO+ biofilm i større grad enn KO-, både i mikrotiterplate og i slanger. Flere studier på *S. aureus* har vist at CP5 og CP8 modulerer bakteriens adheranse til endoteloverflater *in vitro*. Det har blitt funnet et inverst forhold mellom kapselproduksjon og bakteriell adheranse, der bakteriens adheranse til endotelceller er maksimal når kapselproduksjonen er minimal (37;40;43-45). En foreslått forklaring er at bindingssetet på *S. aureus*' adhesin for endotelceller maskeres av kapsel (40;46;47). Til tross for dette, har

dyrestudier vist at kapsel kan fremme bakteriell kolonisering og overlevelse på slimhinneoverflater *in vivo* (39;40;48). For *S. haemolyticus* observerte Flahaut at bakteriestammen uten kapsel viste større evne til biofilmdannelse enn bakteriestammen med kapsel, og foreslo en lignende forklaringsmodell; kapsel kan delvis maskere eller inhibere overflatefaktorer, eksempelvis adhesiner, som er kritiske for biofilmdannelse (19). Våre resultater står i kontrast til funnene gjort av Flahaut og *in vitro*-studiene på *S. aureus*, da vi ville forventet lavere grad av biofilmdannelse hos stammen med kapselproduksjon i mikrotiterplate. Samtidig er det usikkert om KO+ faktisk uttrykte kapsel i dette forsøket, som tidligere nevnt. Under tillagingen av biofilmslangene, tilsettes bakteriene til en plastikkslange i en suspensjon med vekstmedium, uten blod tilstede. Denne situasjonen simulerer implantering av medisinsk utstyr i menneskekroppen, der *S. haemolyticus* er kjent for å være agens for fremmedlegeme-relatert infeksjon (2). Forholdene er her tilrettelagt for biofilmdannelse. Det som gjenstår å finne ut er om *S. haemolyticus* kommer i en enten-eller-situasjon der den må velge mellom kapsel eller biofilmdannelse. For *S. aureus* ser det ut til at dette er tilfelle (37;40;43-45), og Flahaut fant i sin studie at kapseluttrykk og biofilmproduksjon var inverst korrelert (19). Likevel er det behov for flere studier for å bekrefte om dette gjelder for *S. haemolyticus* også.

Vi har i dette forsøket brukt en eksperimentell modell med blod fra voksne, friske individer, men ikke testet den målgruppen vi vet at *S. haemolyticus* gir infeksjon hos. Basert på tidligere studier på blod fra nyfødte, ville vi forventet en lavere grad av immunrespons (14). Vårt forsøk har forhåpentligvis bidratt til å etablere og optimalisere blodmodellen for denne typen studier. Videre plan for Pediatrisk forskningsgruppe ved UiT er å undersøke blod fra nyfødte/immunsupprimerte barn i den samme modellen for å finne ut hva som driver patogenesen.

5.2 Metodologiske utfordringer

For å undersøke immunrespons i fullblod målt ved nivå av cytokinene IL-6, IL-8 og TNF- α , har vi benyttet *ex vivo* human fullblodmodell i denne oppgaven. En av fordelene med en slik modell er at den muliggjør detaljert analyse av komplement- og leukocytaktivering, samt utskillelse av cytokiner i blod fra ulike bloddonorer, og etter ulike stimuli (14). Sammenlignet med *in vitro* modeller som undersøker deler av blodet, eksempelvis enkelte cellelinjer, serum og plasma, får vi ved bruk av *ex vivo* fullblodmodellen undersøkt flere bestanddeler av blodet og immunforsvaret, hvordan de interagerer med hverandre og dermed danne en mer nyansert og riktig oppfatning av hva som skjer under den inflammatoriske responsen. Samtidig er det flere begrensninger ved denne modellen og dette forsøket som må belyses.

Ulike deler av det medfødte og adaptive immunforsvaret kommuniserer og interagerer både med hverandre og øvrige kroppsvev *in vivo*. Særlig interaksjonen mellom blod og endotel er en viktig del av den inflammatoriske responsen under utvikling av sepsis (49). Ved å tappe fullblod og analysere det *ex vivo*, tas det ut av vertens system. Dette medfører at informasjon og forståelse for spillet mellom blod og ulike kroppsvev går tapt (14). *In vivo* modeller vil derfor være mest egnet for å danne et så komplett og korrekt bilde på inflammatorisk respons som mulig.

Under dette forsøket måtte vi bytte leverandør av kit for cytokinanalyse på grunn av leveranseproblemer hos R&D Systems®. Som tidligere nevnt, ble det byttet til Bio-Plex Pro™ fra Bio-Rad® Laboratories. En studie fra 2013 fant at cytokinanalyse-kit basert på Luminex®-prinsippet (figur 3) med magnetiske kuler hadde best ytelse med tanke på antall prøver innenfor konsentrasjonsrekkevidden og etterprøvnbarhet, sammenlignet med flowcytometri-baserte kit og Luminex®-kit med kuler av polystyren (50). Begge kitene vi har benyttet har magnetiske kuler og virker etter Luminex®-prinsippet, noe som vi tenker bidrar til å minske de uunngåelige forskjellene som oppstår ved bytte. Etter «Invitrogen™ Human Cytokine Magnetic 30-Plex Panel» kom «Bio-Rad® Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Plex Assay» ut som best på helhetlig ytelse i den samme studien. Likevel er et slikt bytte ugunstig for resultatene og burde vært unngått ettersom de ulike kitene er forskjellige på etterprøvnbarhet, og har ulik konsentrasjonsrekkevidde for presis påvisning av de ulike cytokinene (50). Dette bytte av leverandør har hatt en direkte påvirkning på dataene våre, og dermed på resultatene våre, og de må tolkes med forsiktighet.

Tillaging av standardkurver er en viktig begrensning i denne oppgaven. Standardkurver har en direkte påvirkning på datasettet og resultatene. Det ble laget ny standardkurve for hver cytokinanalyse under dette forsøket (ikke vist i figur). De ble vurdert som tilstrekkelige av kompetent personale, men de kunne vært ytterligere optimalisert. Nøyaktige standardkurver krever høy kompetanse på laboratoriumsteknikker som pipettering. Gode ferdigheter på laboratoriumsteknikker er essensielt for videre arbeid med fullblodmodellen, og bør etterstrebes.

For både planktoniske og varmeinaktiverte bakterier var bakteriekonsentrasjonen høy i fullblodmodellen ($\sim 10^7$ CFU ml⁻¹ og $7,0 \times 10^8$ bakterier/mL PBS, respektivt). Ved en virkelig sepsis vil man ikke se så høye konsentrasjoner så tidlig i forløpet, den kraftige bakterievekst inntreffer først 12-24 timer etter at bakterien har kommet inn i blodbanen (51). Derfor anses disse konsentrasjonene som tilstrekkelige for å indusere immunrespons for analyse. Det var stor variasjon i tallene for planktoniske bakterier inkubert i 4 timer med flere prøver OOR>, som man ikke så hos varmeinaktiverte bakterier med samme inkubasjonstid. Store forskjeller innad i gruppen hos både planktoniske og varmeinaktiverte bakterier, kan tilsa at det er faktorer hos bloddonoren som forårsaker dem. Oppsettet fungerer dermed som en kontroll for biologiske forskjeller (verts faktorer) mellom bloddonorene. Dette ser vi imidlertid ikke i våre data, og det er sannsynligvis ikke vertsfaktorer som er årsak til dette. En annen forklaring kan være at fullblodmodellen har en begrensning der den kun kan opprettholde fysiologiske forhold i maximum 4 timer (25). Planktoniske bakterier er fortsatt metabolsk aktive, i motsetning til varmeinaktiverte bakterier og på denne måten kan planktoniske bakterier ha ført til reduksjon av tiden blodmodellen er under fysiologiske forhold, og dermed ha ført til økt immunaktivering.

For prøvene fra slangene, både med og uten biofilm, var det en generell høy immunaktivering, uavhengig av tilstedeværelse av bakterier i biofilm. Vi observerte at de negative kontrollene (slanger kun tilsatt vekstmedium) hadde høye nivåer av cytokiner, der mange prøver hadde verdier OOR>. Det kan være flere årsaker til dette. Som tidligere nevnt, ble det ikke tilsatt EDTA i prøvene fra slangene ved endt inkubasjonstid. Dette er en vesentlig forskjell fra de øvrige prøvene i rør (planktoniske og varmeinaktiverte bakterier) og fra Granslo sin metode (14) som er utgangspunktet for denne oppgaven. Dermed har immunresponsen fortsatt under sentrifugering og frem til plasma ble fryst ned. Dette er med stor sannsynlighet en viktig årsak til den generelt høye immunaktiveringen vi ser, også hos

kontrollene. Enkelte bloddonorer kan ha hatt en helt særegen variant av blodparametrene som gjør det vanskelig å skulle sammenligne deres resultater mot de øvrige bloddonorenes. En annen begrensning er at vi ikke gjorde differensialtelling av leukocytter for hvert av oppsettene med blodmodellen. Dermed kan det ikke utelukkes at kvantitative forskjeller i leukocyt-tellingene kan ha påvirket immunresponsen (14).

I en tilsvarende studie av Granslo og medarbeidere, ble det ikke observert samme grad av bakgrunnsaktivering (14). Metode for fremstilling av biofilm i den studien og dette forsøket var tilnærmet identisk. Som tidligere nevnt var modifikasjoner som følgende; endring av leie (statisk istedenfor roterende), fortynningsgrad (1:10 istedenfor 1:100) og at slangene ikke ble fryst ned i dette forsøket. En annen forskjell var at Granslo benyttet lepirudin som antikoagulant, mens heparin ble benyttet i dette forsøket. Dette kan ha utgjort en betydelig forskjell i bakgrunnsaktiveringen. Etter nærmere undersøkelse av hvordan slangene ble håndtert i deres studie sammenlignet med dette forsøket, fremkommer ingen tydelige forskjeller som skulle tilsi graden av bakgrunnsaktivering som observeres.

Når blod tappes på plastrør, aktiverer plastoverflaten komplement og koagulasjonsfaktorer som fører til aktivering av immunceller og trombocytter. Denne immunaktiveringen initiert av fremmede overflater kalles bioinkompatibilitet, eller omvendt biokompatibilitet (52;53). Slik aktivering av immunceller som monocytter og granulocytter *in vitro*, gjør at de sensibiliseres før de brukes i en inflammasjonsmodell, og kan dermed gi misvisende resultater (54). For å unngå slik aktivering har ulike antikoagulanter blitt forsøkt brukt. I dette forsøket ble heparin benyttet som antikoagulant ved blodprøvetaking. En studie fra 2008 viste at plastikk-indusert komplementaktivering ble fullstendig unngått ved overføring av blod – antikoagulert med lepirudin – til heparindekkede rør, sammenlignet med overføring til ikke-heparindekkede rør (23). Til tross for at det ble brukt en annen antikoagulant i studien nevnt ovenfor, kan det tenkes at heparinet vil beskytte mot bioinkompatibilitet også når den brukes som antikoagulant, og ikke kun som belegg på plastoverflaten. Blodet i biofilmslangene ble imidlertid utsatt for flere ulike materialer etter det ble antikoagulert med heparin; DEHP i slangene og polypropylen i nunc-rørene. Granslo benyttet de samme slangene i sin studie, dog med en annen bakterie (*S. epidermidis*), men så ikke samme bakgrunnsaktivering (14). Det er derfor lite sannsynlig at materialet i slangene er del av forklaringen. Flere *in vivo* studier på polypropylens biokompatibilitet har vist at polypropylen induserer svakest inflammatorisk respons sammenlignet med andre polymermaterialer (55-57). Bakgrunnsaktiveringen observert i dette forsøket kommer derfor sannsynligvis ikke av bioinkompatibilitet.

Valget av heparin som antikoagulant er også en begrensning og mulig feilkilde. Flere studier viser at heparin påvirker komplementaktivering når den brukes som antikoagulant, der den i lave konsentrasjoner øker komplementaktivering, mens høye konsentrasjoner hemmer komplementaktivering (22;58;59). I 2002 fant Mollnes og medarbeidere at en heparinkonsentrasjon på 0,2 IU/mL og 2 IU/mL økte komplementaktivering, mens 20 IU/ml hemmet komplementaktivering (22). Det er også funnet at heparin binder til flere plasmaproteiner og har en ugunstig effekt på leukocytter og trombocytter (22;60-62). I den samme studien av Mollnes ble heparin frarådet brukt som antikoagulant i inflammasjonsstudier som benytter fullblodmodellen, mens lepirudin ble anbefalt som antikoagulant (22). Lepirudin er en rekombinant hirudin-analog, og er en spesifikk trombinhemmer (63). Den påvirker ikke koagulasjonskaskaden oppstrøms for trombindannelsestrinnet, og den påvirker ikke komplementaktivering (22). Det ville ha vært fordelaktig å bruke lepirudin fremfor heparin som antikoagulant i dette forsøket for å følge protokollen nøyaktig. Som tidligere nevnt var lepirudin førstevalg under planleggingen av forsøket, men grunnet produksjonsslutt kunne den ikke benyttes. Likevel er det kun for analyser av komplementavhengig cytokinfrigjøring at lepirudin er anbefalt. Det er gjort flere studier som viser at det er et komplekst samspill mellom komplementaktivering og cytokinfrigjøring, der noen cytokiner er komplementavhengige, mens andre er ikke-komplementavhengige (22;23;64). Foreløpig har et par studier vist at IL-8 er delvis komplementavhengig, mens IL-6 og TNF- α er ikke-komplementavhengige (22;64). For cytokiner som ikke er avhengige av komplement, vil ikke valg av antikoagulasjon ha like stor betydning. Oppsummert fremstår det fortsatt usikkert hva bakgrunnsaktiveringen skyldes. Den modifiserte fullblodmodellen som benytter slanger istedet for rør, behøver optimaliseringsarbeid for å oppnå mer reproducerbare resultater.

5.3 Forslag til videre optimalisering av metode

Basert på erfaringer gjort under arbeidet med denne oppgaven har vi flere forslag til videre optimalisering av fullblodmodellen for biofilmforsøk.

- Det bør tilsettes EDTA ved endt inkubasjonstid for å stoppe videre immunaktivering.
- Høyere fortynningsgrad av biofilmprøvene til cytokinanalysene kan forsøkes, siden det var svært mange prøver OOR>. En fortynningsgrad på minimum 1:10 kan være gunstig å benytte.

- Det kan være nyttig å sette opp *S. epidermidis* til sammenligning i biofilmslanger siden den er kjent fra tidligere med samme type forsøk (14). Dette for å kontrollere for bakgrunnsaktivering observert her.
- Tillaging av reelle kontrollslanger uten preformert biofilm i TSB med 1 % glukose, men som kun er tilsatt blod tilført planktoniske bakterier, for å kontrollere for bakgrunnsaktivering og for å gjøre en direkte sammenligning mellom planktoniske bakterier og bakterier i biofilm.

6 Konklusjon

I denne oppgaven har vi sett at planktoniske bakterier induserer sterkere immunaktivering enn varmeinaktiverede bakterier, vi observerte ingen forskjell i immunaktivering hos bakterier med og uten kapseloperon. Fullblodmodellen er ikke funksjonell i sin nåværende form for biofilmforsøk, slik at det gjenstår å se om *S. haemolyticus* i biofilm gir en annen immunrespons enn planktoniske bakterier. Videre studier bør fokusere på optimalisering av metoden, samt undersøke om kapsel er uttrykt under disse betingelsene.

Referanser

1. Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? *Clin Microbiol Infect* 2019;25(9):1071-80.
2. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(4):870-926.
3. Czekaj T, Ciszewski M, Szewczyk EM. *Staphylococcus haemolyticus* – an emerging threat in the twilight of the antibiotics age. *Microbiology* 2015;161(11):2061-8.
4. Nguyen TH, Park MD, Otto M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7(90).
5. Cavanagh JP, Hjerde E, Holden MTG, Kahlke T, Klingenberg C, Flægstad T, et al. Whole-genome sequencing reveals clonal expansion of multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* in European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(11):2920-7.
6. Hira V, Kornelisse RF, Sluijter M, Kamerbeek A, Goessens WHF, de Groot R, et al. Colonization dynamics of antibiotic-resistant coagulase-negative Staphylococci in neonates. *J Clin Microbiol* 2013;51(2):595-7.
7. Fredheim EGA, 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.
8. Pain M, Hjerde E, Klingenberg C, Cavanagh JP. Comparative Genomic Analysis of *Staphylococcus haemolyticus* Reveals Key to Hospital Adaptation and Pathogenicity. *Front Microbiol* 2019;10:2096.
9. 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.
10. Da F, Joo H-S, Cheung GYC, Villaruz AE, Rohde H, Luo X, et al. Phenol-Soluble Modulins of *Staphylococcus haemolyticus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:206.
11. Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, et al. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. *J Infect Chemother* 2014;20(10):593-601.
12. Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, et al. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(26):9786-91.
13. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(5):1323-36.
14. 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.
15. Wen Z, Zhang J-R. Chapter 3 - Bacterial Capsules. I: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, red. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2015. s. 33-53. Tilgjengelig fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971692000032>
16. Mohamed N, Timofeyeva Y, Jamrozny D, Rojas E, Hao L, Silmon de Monerri NC, et al. Molecular epidemiology and expression of capsular polysaccharides in

- Staphylococcus aureus clinical isolates in the United States. PLoS One 2019;14(1):e0208356.
17. Herbert S, Newell SW, Lee C, Wieland KP, Dassy B, Fournier JM, et al. Regulation of Staphylococcus aureus type 5 and type 8 capsular polysaccharides by CO(2). J Bacteriol 2001;183(15):4609-13.
 18. Kuipers A, Stapels DAC, Weerwind LT, Ko YP, Ruyken M, Lee JC, et al. The Staphylococcus aureus polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. Microbiology 2016;162(7):1185-94.
 19. Flahaut S, Vinogradov E, Kelley KA, Brennan S, Hiramatsu K, Lee JC. Structural and biological characterization of a capsular polysaccharide produced by Staphylococcus haemolyticus. J Bacteriol 2008;190(5):1649-57.
 20. Parham P. The Immune System. 4th utg. New York: Garland Science; 2015.
 21. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol 2014;12(1):49-62.
 22. 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.
 23. Brekke OL, Christiansen D, Fure H, Pharo A, Fung M, Riesenfeld J, et al. Combined inhibition of complement and CD14 abolish E. coli-induced cytokine-, chemokine- and growth factor-synthesis in human whole blood. Mol Immunol 2008;45(14):3804-13.
 24. Flow Cytometry Cell Counting Beads: CountBright and CountBright Plus Absolute Counting Beads [nettdokument]. MA, USA: thermofisher.com [oppdatert 2022; lest 19. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-calibration/flow-cytometer-cell-counting-beads.html>
 25. Fredheim EGA, 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.
 26. Luminex Assay Principle [nettdokument]. MN, USA: rndsystems.com [oppdatert 2022; lest 18. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.rndsystems.com/resources/technical/luminex-assay-principle>
 27. Luminex™ bead-based immunoassays drive immunoassays towards higher-content biomarker discovery [nettdokument]. MA, USA: thermofisher.com [oppdatert 2016; lest 18. april 2022]. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/luminex-bead-based-immunoassays-drive-immunoassays-towards-higher-content-biomarker-discovery/>
 28. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985;22(6):996-1006.
 29. Côté-Gravel J, Brouillette E, Malouin F. Vaccination with a live-attenuated small-colony variant improves the humoral and cell-mediated responses against Staphylococcus aureus. PLoS One 2019;14(12):e0227109.
 30. Cruciani M, Sandini S, Etna MP, Giacomini E, Camilli R, Severa M, et al. Differential Responses of Human Dendritic Cells to Live or Inactivated Staphylococcus aureus: Impact on Cytokine Production and T Helper Expansion. Front Immunol 2019;10:2622.

31. Zbinden C, Pilo P, Frey J, Bruckmaier RM, Wellnitz O. The immune response of bovine mammary epithelial cells to live or heat-inactivated *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* 2015;179(3-4):336-40.
32. Dassy B, Stringfellow WT, Lieb M, Fournier JM. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. *J Gen Microbiol* 1991;137(5):1155-62.
33. Poutrel B, Gilbert FB, Lebrun M. Effects of culture conditions on production of type 5 capsular polysaccharide by human and bovine *Staphylococcus aureus* strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2(2):166-71.
34. Stringfellow WT, Dassy B, Lieb M, Fournier JM. *Staphylococcus aureus* growth and type 5 capsular polysaccharide production in synthetic media. *Appl Environ Microbiol* 1991;57(2):618-21.
35. Sutra L, Rainard P, Poutrel B. Phagocytosis of mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* and expression of type 5 capsular polysaccharide are influenced by growth in the presence of milk. *J Clin Microbiol* 1990;28(10):2253-8.
36. Keinhörster D, George SE, Weidenmaier C, Wolz C. Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *Int J Med Microbiol* 2019;309(6):151333.
37. Pöhlmann-Dietze P, Ulrich M, Kiser KB, Döring G, Lee JC, Fournier JM, et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* to endothelial cells: influence of capsular polysaccharide, global regulator agr, and bacterial growth phase. *Infect Immun* 2000;68(9):4865-71.
38. George SE, Nguyen T, Geiger T, Weidenmaier C, Lee JC, Liese J, et al. Phenotypic heterogeneity and temporal expression of the capsular polysaccharide in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2015;98(6):1073-88.
39. Lee JC, Takeda S, Livolsi PJ, Paoletti LC. Effects of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1993;61(5):1853-8.
40. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(1):218-34.
41. Arbeit RD, Dunn RM. Expression of capsular polysaccharide during experimental focal infection with *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1987;156(6):947-52.
42. Arbeit RD, Nelles MJ. Capsular polysaccharide antigenemia in rats with experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1987;155(2):242-6.
43. Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infect Immun* 1993;61(2):478-85.
44. St Geme JW, 3rd, Falkow S. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect Immun* 1991;59(4):1325-33.
45. Stephens DS, Spellman PA, Swartley JS. Effect of the (alpha 2-->8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* 1993;167(2):475-9.
46. Kuypers JM, Proctor RA. Reduced adherence to traumatized rat heart valves by a low-fibronectin-binding mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 1989;57(8):2306-12.
47. Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, François P, et al. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 1995;63(12):4738-43.

48. Kiser KB, Cantey-Kiser JM, Lee JC. Development and characterization of a *Staphylococcus aureus* nasal colonization model in mice. *Infect Immun* 1999;67(10):5001-6.
49. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008;83(3):536-45.
50. 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.
51. Øvstebø R, Brandtzaeg P, Brusletto B, Haug KB, Lande K, Høiby EA, et al. Use of robotized DNA isolation and real-time PCR to quantify and identify close correlation between levels of *Neisseria meningitidis* DNA and lipopolysaccharides in plasma and cerebrospinal fluid from patients with systemic meningococcal disease. *J Clin Microbiol* 2004;42(7):2980-7.
52. Ekdahl KN, Lambris JD, Elwing H, Ricklin D, Nilsson PH, Teramura Y, et al. Innate immunity activation on biomaterial surfaces: a mechanistic model and coping strategies. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(12):1042-50.
53. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol* 2007;44(1-3):82-94.
54. Lappgård KT, Fung M, Bergseth G, Riesenfeld J, Lambris JD, Videm V, et al. Effect of complement inhibition and heparin coating on artificial surface-induced leukocyte and platelet activation. *Ann Thorac Surg* 2004;77(3):932-41.
55. Kelly M, Macdougall K, Olabisi O, McGuire N. In vivo response to polypropylene following implantation in animal models: a review of biocompatibility. *Int Urogynecol J* 2017;28(2):171-80.
56. Orenstein SB, Saberski ER, Kreutzer DL, Novitsky YW. Comparative analysis of histopathologic effects of synthetic meshes based on material, weight, and pore size in mice. *J Surg Res* 2012;176(2):423-9.
57. Usher FC, Allen JE, Jr., Crosthwait RW, Cogan JE. Polypropylene monofilament. A new, biologically inert suture for closing contaminated wounds. *JAMA* 1962;179:780-2.
58. Keil LB, Jimenez E, Guma M, Reyes MD, Liguori C, DeBari VA. Biphasic response of complement to heparin: fluid-phase generation of neoantigens in human serum and in a reconstituted alternative pathway amplification cycle. *Am J Hematol* 1995;50(4):254-62.
59. Logue GL. Effect of heparin on complement activation and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red cells. *Blood* 1977;50(2):239-47.
60. Engstad CS, Gutteberg TJ, Osterud B. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thromb Haemost* 1997;77(4):690-6.
61. Videm V. Heparin in clinical doses 'primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. *Scand J Immunol* 1996;43(4):385-90.
62. Wahba A, Rothe G, Lodes H, Barlage S, Schmitz G, Birnbaum DE. Effects of extracorporeal circulation and heparin on the phenotype of platelet surface antigens following heart surgery. *Thromb Res* 2000;97(6):379-86.
63. Chang JY. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *FEBS Lett* 1983;164(2):307-13.
64. Lappgård KT, Christiansen D, Pharo A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Lindstad J, et al. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(37):15861-6.

65. R&D Systems® Immunoassays and Luminex® Instruments Video [video]. MN, USA: youtube.com; 2016. Tilgjengelig fra:
<https://www.youtube.com/watch?v=xUhUPeLyTEs&t=2s>

Tabeller

Tabell 1: Median konsentrasjon av de ulike cytokinene produsert som respons på ulike patogener. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. n = 9 for samtlige bakterier/vekstfase og negative kontroller.

Median konsentrasjon av de ulike cytokinene produsert som respons på ulike patogener						
Cytokin	Tid	Median cytokinkonsentrasjon (25-75 kvartil)				
		KO- VI	KO+ VI	KO- P	KO+ P	Neg. kontroll
IL-6	2	14 (9-22)	11 (6-13)	55 (35-74)	51 (27-94)	8 (6-12)
	4	55 (34-87)	62 (28-107)	13 022 (1 782-297 915)	5 957 (1 746-46 089)	18 (10-35)
IL-8	2	159 (53-271)	201 (130-252)	574 (305-1 740)	610 (476-1 378)	97 (30-155)
	4	483 (337-913)	788 (522-954)	20 240 (6 649-6 342 572)	1,25 × 10 ⁷ (17 927-1,25 × 10 ⁷)	315 (156-1 510)
TNF-a	2	114 (25-271)	184 (130-258)	1 730 (672-2 837)	1 267 (848-2 902)	106 (10-180)
	4	175 (102-273)	317 (193-598)	48 238 (9 631-306 094)	1,48 × 10 ¹¹ (13 569-1,48 × 10 ¹¹)	142 (16-324)

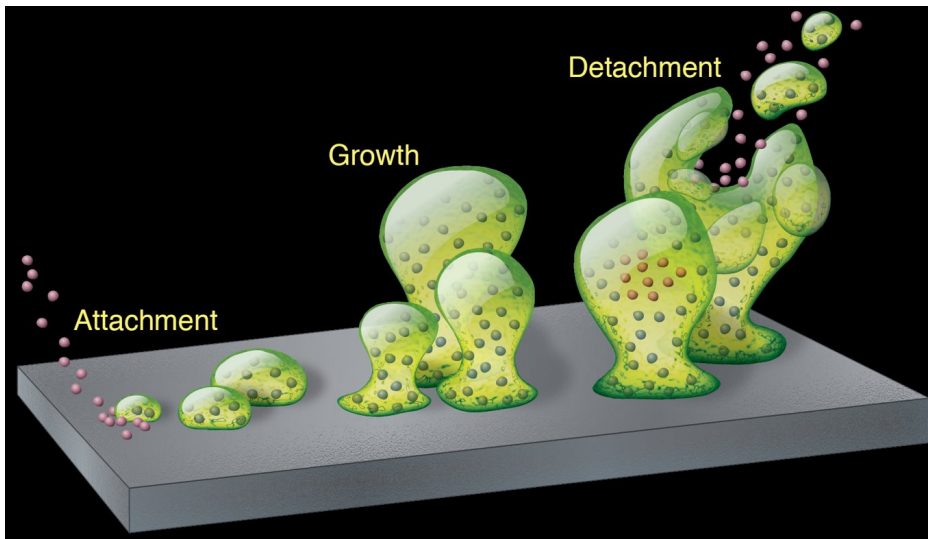
Tabell 2: Resultater av Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test. Statistisk signifikans satt til p < 0,05, uthevet i tabell. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk.

Resultater av Related-Samples Wilcoxon Signed Rank Test					
Cytokin	Tid	p-verdi			
		KO- VI / KO+ VI	KO- P / KO+ P	KO- VI / KO- P	KO+ VI / KO+ P
IL-6	2	0,07	0,77	0,01	0,01
	4	0,26	0,77	0,01	0,01
IL-8	2	0,64	0,26	0,01	0,01
	4	0,31	0,21	0,01	0,01
TNF-a	2	0,58	0,37	0,01	0,01
	4	0,19	0,04	0,01	0,01

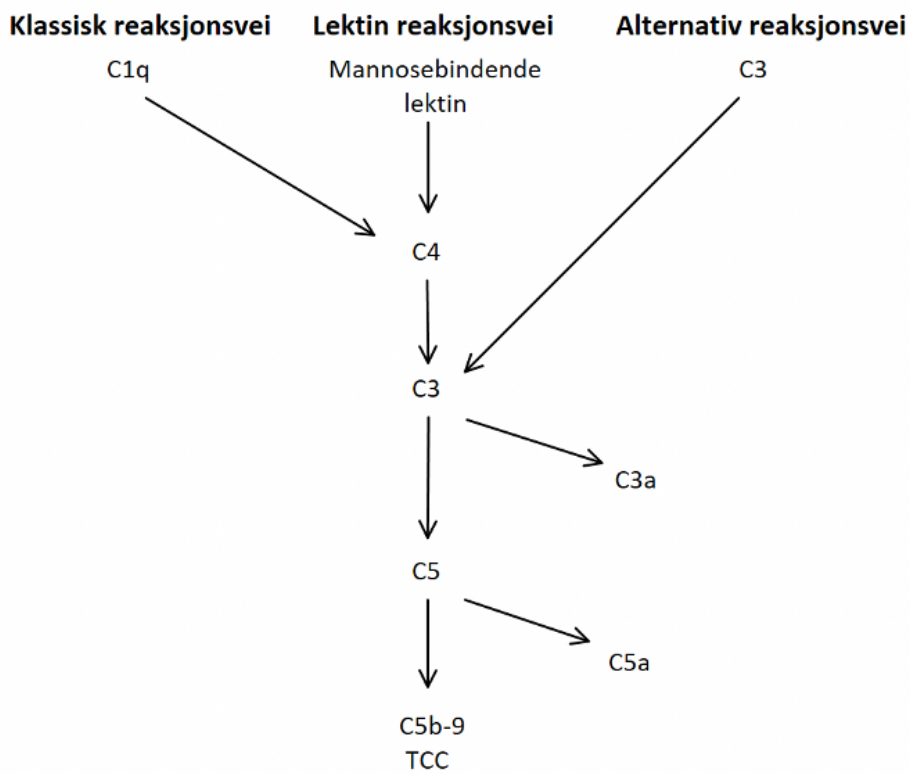
Tabell 3: CFU mL⁻¹ for planktoniske bakterier tilsatt i blodet til de ulike bloddonorene. Ingen data på KO- på dag 1 grunnet feil i fortynningsrekker. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon.

CFU mL ⁻¹ for bakterier tilsatt i blodet til de ulike bloddonorene			
Dag	Donor	Bakteriestamme	CFU mL ⁻¹
1	1+2	KO-	Ingen data
		KO+	$1,22 \times 10^8$
2	3+4	KO-	$1,45 \times 10^7$
		KO+	$1,87 \times 10^7$
3	5+6	KO-	$0,39 \times 10^7$
		KO+	$1,11 \times 10^7$
4	7+8	KO-	$2,12 \times 10^7$
		KO+	$1,39 \times 10^7$
5	9+10	KO-	$1,44 \times 10^7$
		KO+	$1,54 \times 10^7$

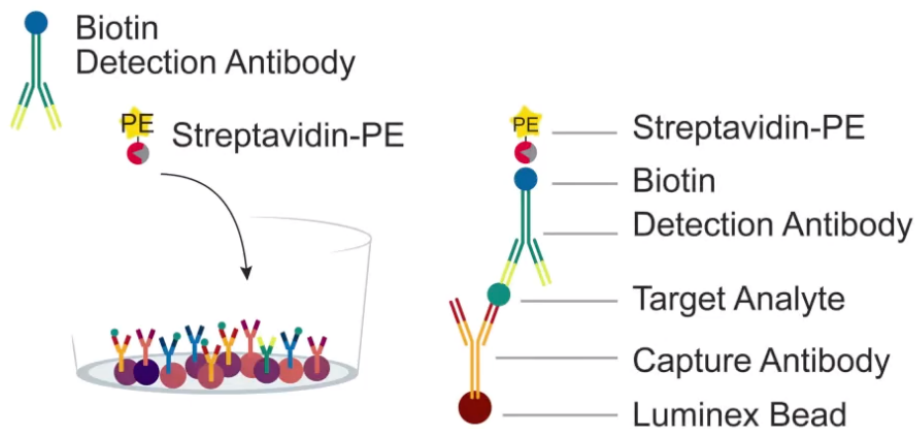
Figurer



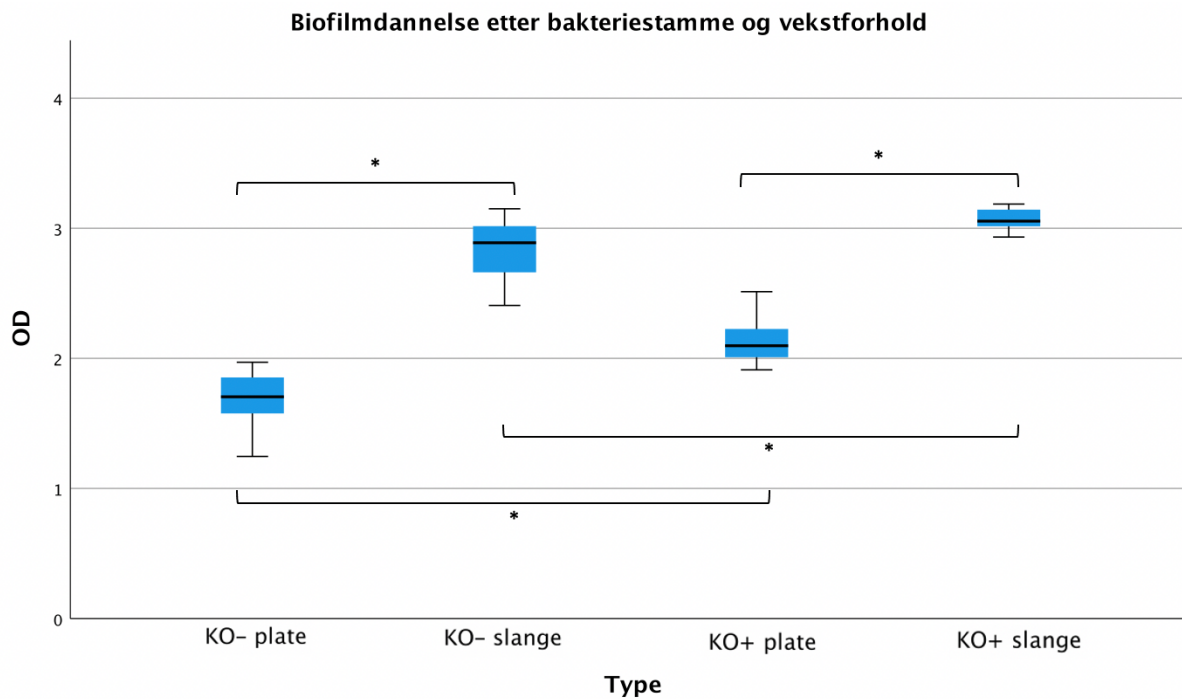
Figur 1: Biofilmdannelse. Tegnet av Roy-Andre Lyså.



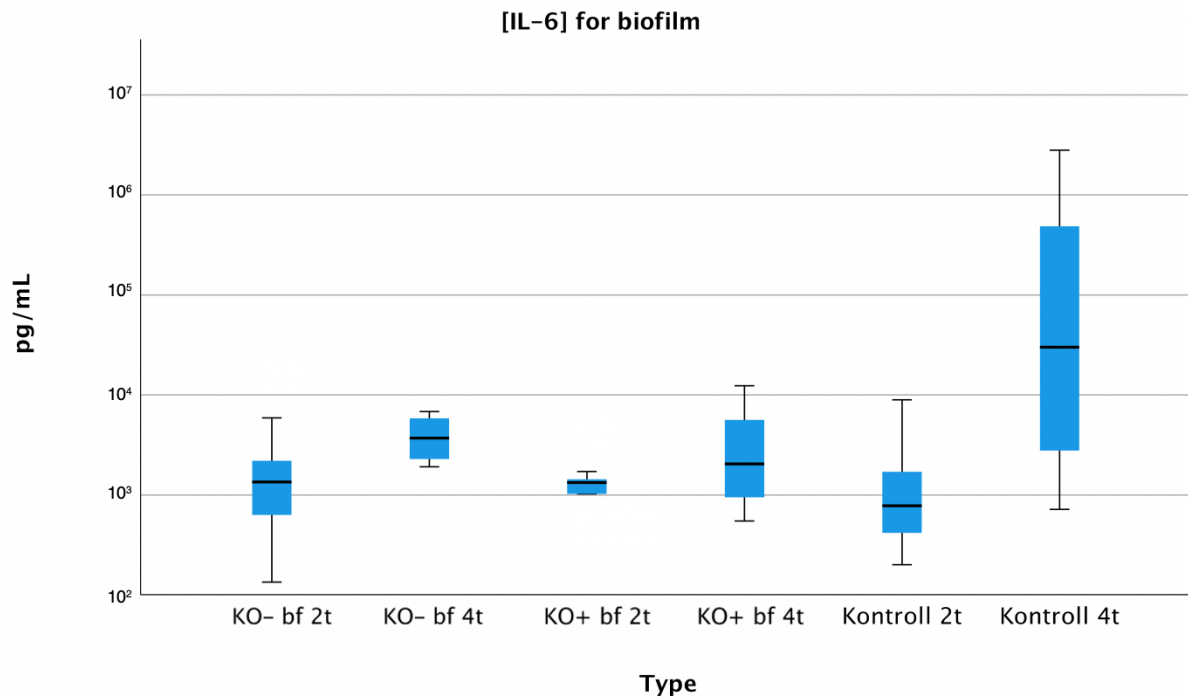
Figur 2: Komplementsystemet. Modifisert figur fra Fredheim og medarbeidere (25).



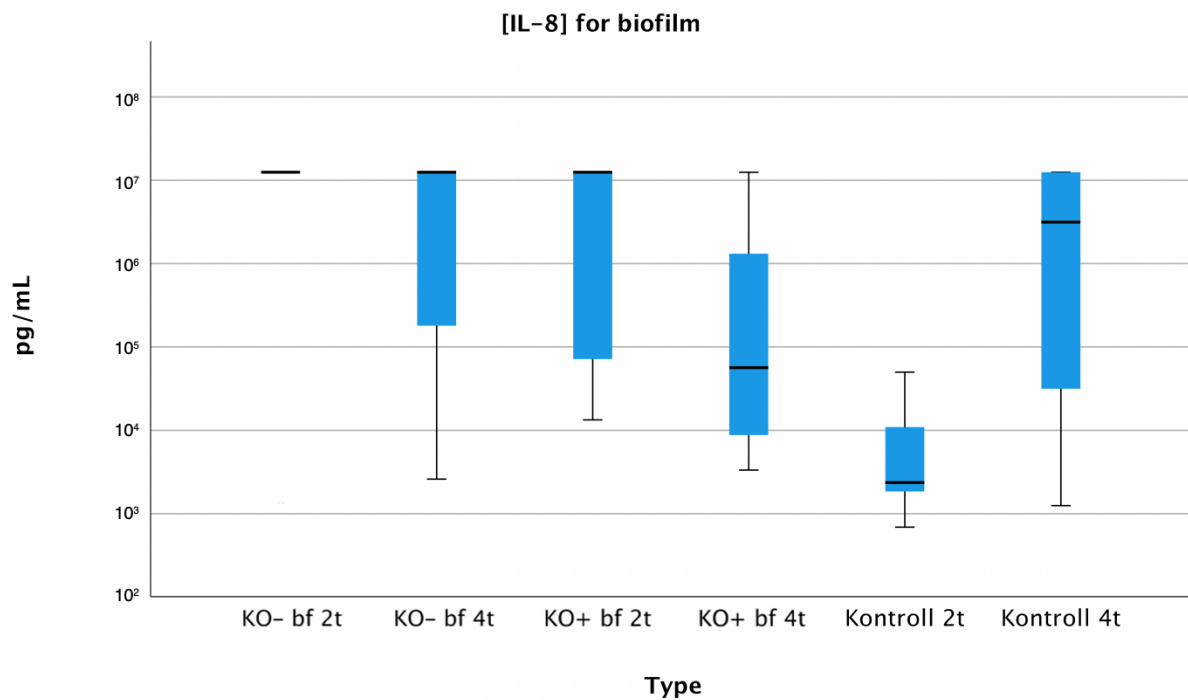
Figur 3: Prinsipp for Luminex®. Bilde hentet fra R&D Systems® (65).



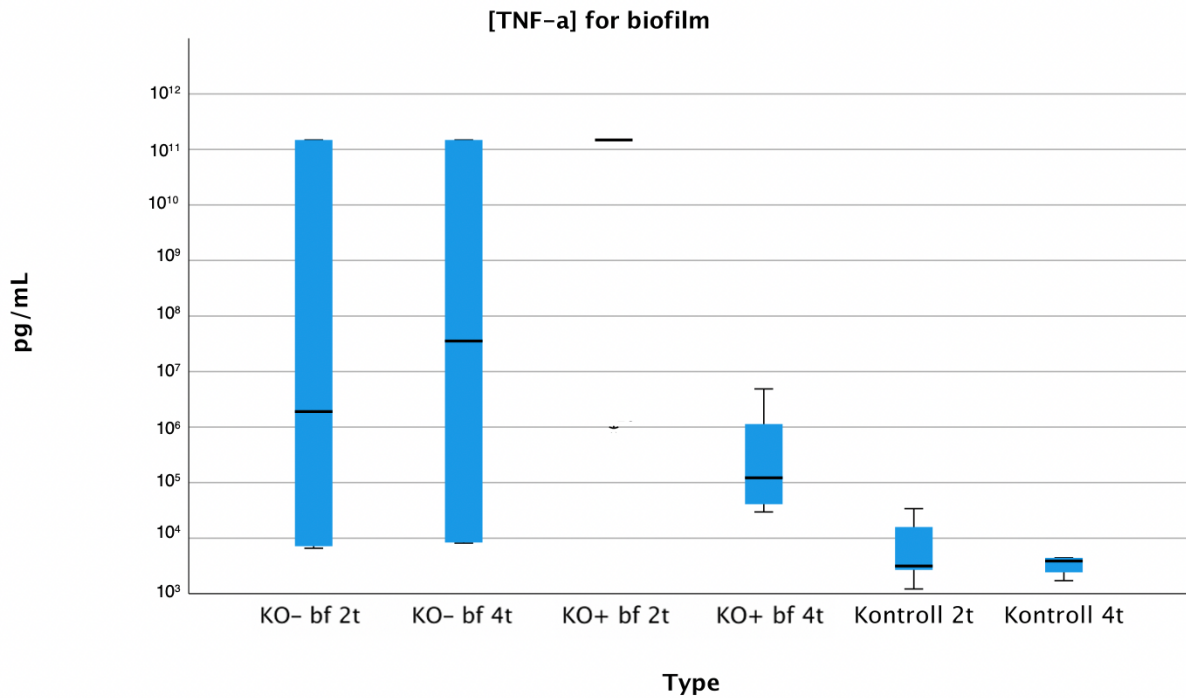
Figur 4: Biofilmdannelse etter bakteriestamme og vekstforhold. OD – optical density. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. * – $p < 0,05$



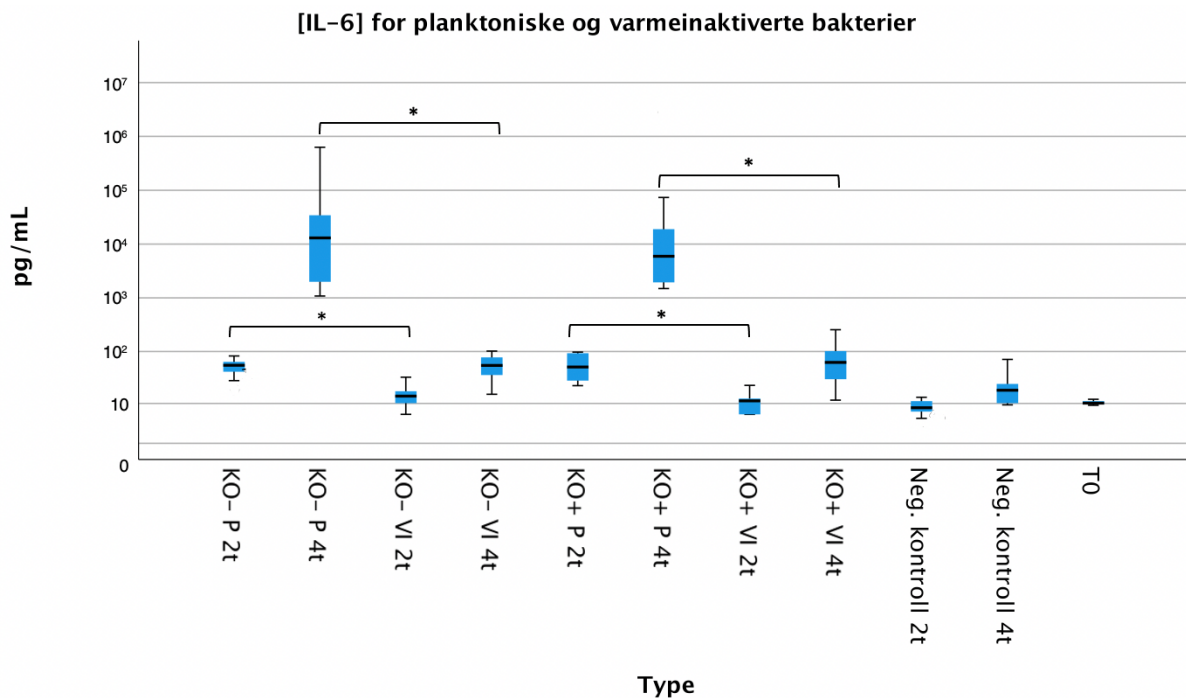
Figur 5: Konsentrasjon av IL-6 for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.



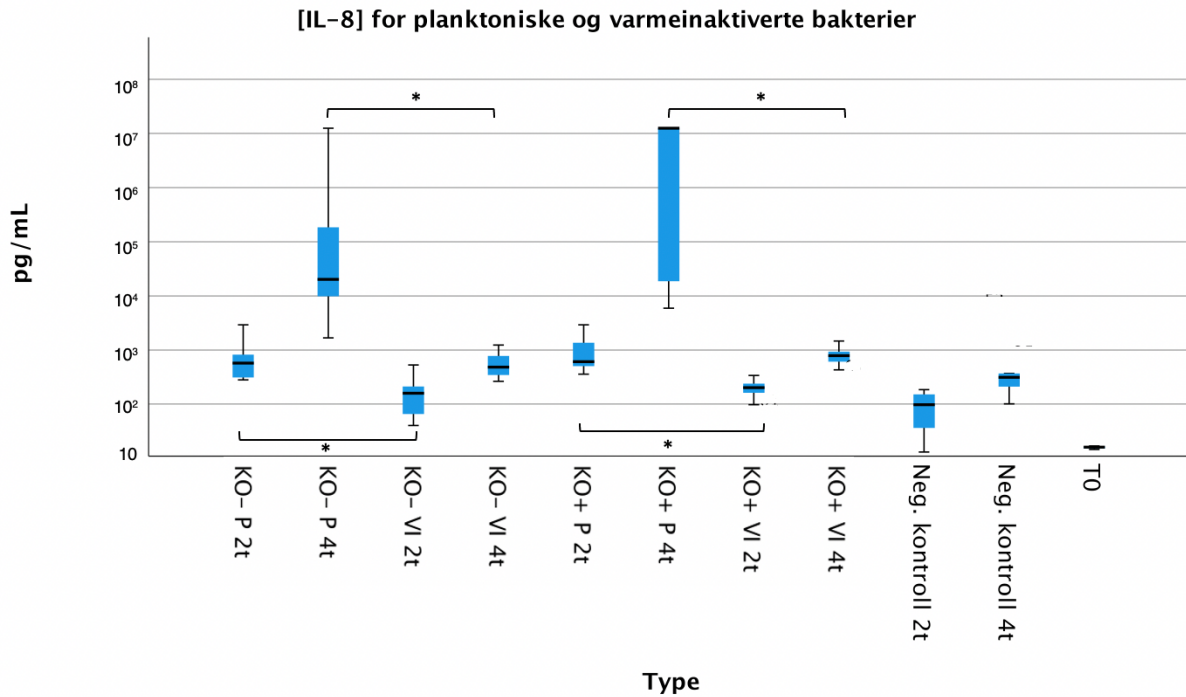
Figur 6: Konsentrasjon av IL-8 for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.



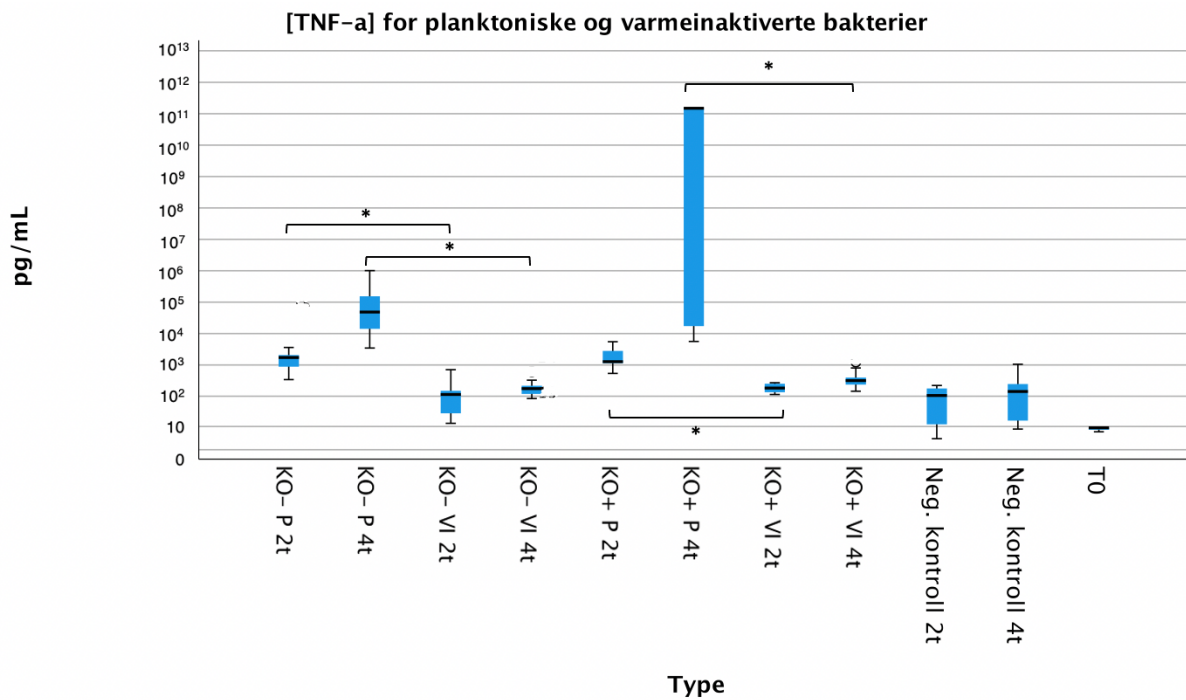
Figur 7: Konsentrasjon av TNF- α for biofilmprøver. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. bf – biofilm.



Figur 8: Konsentrasjon av IL-6 for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – $p < 0,05$



Figur 9: Konsentrasjon av IL-8 for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – $p < 0,05$



Figur 10: Konsentrasjon av TNF- α for planktoniske og varmeinaktiverte bakterier. KO- – stamme 25-63 uten kapseloperon. KO+ – stamme 53-38 med kapseloperon. VI – varmeinaktivert. P – planktonisk. T0 – blod kun tilsatt EDTA, ingen bakterier. * – $p < 0,05$

Vedlegg

7 Vedtaksbrev REK



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

Immunosupprimerte 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 måltrettede 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

8 Infoskriv: Eksperimentelle bakterielle infeksjoner – studier i en blodmodell

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

