

**Nasal og subcutan pneumokokk helcellevaksine  
i kombinasjon med influensavaksine:**

**Immunrespons og beskyttelse mot  
pneumokokksykdom**



Av

**Margareth Kvalsvik Jensen**

Hovedfagsoppgave ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet  
Universitetet i Oslo

Høsten 2006

# INNHold

<b>FORKORTELSER</b>	<b>4</b>
<b>SAMMENDRAG</b>	<b>5</b>
<b>1. INNLEDNING</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Pneumokokker</b>	<b>7</b>
Pneumokokkbakterien og sykdom den forårsaker	7
Smittemåte	9
Symptom og forløp	9
Behandling	10
Forebyggende tiltak	10
<b>1.2 Influensa</b>	<b>12</b>
Influsnaviruset og sykdom det forårsaker	12
Smittemåte	14
Symptom og forløp	15
Behandling	15
Forebyggende tiltak	15
<b>1.3 Immunforsvaret</b>	<b>17</b>
Slimhinnens immunforsvar	17
Produksjon av sekretoriske antistoffer	19
Funksjon av sekretoriske antistoffer	20
Systemisk antistoffrespons	21
Immunologisk hukommelse	22
Slimhinnevaksiner	22
Slimhinneadjuvans	23
<b>1.4 Dyreforsøk</b>	<b>25</b>
Dyr som redskap i medisinsk forskning	25
Er dyreforsøk nødvendig?	25
Hvorfor velge mus?	25
<b>2. FORSØKET</b>	<b>26</b>
<b>2.1 Bakgrunn for, og hensikt med forsøket</b>	<b>26</b>
<b>2.2 Forsøksoppsett</b>	<b>28</b>
Forforsøk	28
Hovedforsøk	28
<b>2.3 Prøver og tidsramme</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Analyser</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIALER OG METODER</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Forsøksdyr</b>	<b>32</b>
Musene	32
Oppstalling av musene	32
Håndtering av musene	33
Merking av musene	33
Observasjon av musene etter smitte	33

<b>3.2 Vaksinedoseringer</b>	<b>34</b>
PnH-vaksine	34
Kombinasjonsvaksine PnH + INV	35
Kontrollgrupper	35
<b>3.3 Tillaging av vaksiner</b>	<b>36</b>
PnH og kombinasjonsvaksine PnH + INV	36
<b>3.4 Immunisering</b>	<b>37</b>
Intranasal immunisering	37
Subcutan immunisering	37
<b>3.5 Prøvetaking og preparering av prøvene</b>	<b>39</b>
Salivaprøver	39
Preparering av salivaprøver	40
Blodprøver	41
Preparering av blodprøver	41
Tomtapping og avlivning	42
<b>3.6 Smitte av mus</b>	<b>43</b>
Tillaging av bakterieløsning	43
Smitte av musene med pneumokokker	45
Intra peritoneal smitte av musene	45
Intra nasal smitte av musene	46
<b>3.7 Prøvetaking etter smitte for bakterietelling</b>	<b>47</b>
Blodprøver etter smitte	47
Neseskylling etter smitte	49
Bakterietelling og utregning av CFU/mL prøve	51
<b>3.8 Analyse av prøvemateriale</b>	<b>52</b>
Prinsipp for indirekte ELISA	52
Tillaging og definering standarder	53
Generelt oppsett av ELISA-plate	55
ELISA-metode benyttet for bestemmelse av INV-antistoffkonsentrasjon	56
ELISA-metode benyttet for bestemmelse av PnH-antistoffkonsentrasjon	61
<b>3.9 Statistiske metoder og grafisk fremstilling</b>	<b>64</b>
<b>4. RESULTATER</b>	<b>65</b>
<b>4.1 Beskyttelse mot pneumokokk sykdom</b>	<b>65</b>
Bakterier i blod etter smitte	65
Musenes tilstand etter smitte	67
Bakterier i neseskyll etter smitte	69
<b>4.2 Immunrespons mot helcelle pneumokokker</b>	<b>70</b>
IgG antistoff i blod rettet mot pneumokokker	70
IgA antistoff i saliva rettet mot pneumokokker	71
<b>4.3 Immunrespons mot Influensa</b>	<b>72</b>
IgG antistoff i blod rettet mot influensa	72
IgA antistoff i saliva rettet mot influensa	73
<b>5. DISKUSJON</b>	<b>74</b>
<b>6. KONKLUSJON</b>	<b>79</b>
<b>REFERANSER</b>	<b>80</b>

**FORKORTELSER**

APC	Antigenpresenterende celle
BSA	”Bovine serum albumin”
CD8+	Cytotoksiske T-celler
CD4+	T-hjelpeceller
CFU	”Colony forming units”
CRP	C-reaktivt protein
CT	Cholera toxin
DC	Dendritiske celler
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FDC	Follikulære dendritiske celler
Fhi	Folkehelseinstituttet
H	Hemagglutinin
HEV	High endothelial venules
hhv.	Henholdsvis
HLA II	Human leukocyte antigen klasse 2
Ig	Immunoglobulin
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
Imm.	Immunisert
i.n	Intranasalt
INV	Inaktivert influensavirus
i.p.	Intraperitonealt
ISCOM's	Immune-stimulating complexes
LAF	Laminar Airflow benk
LT	Heat-labile toxin
MALT	Mucosa associated lymphoid issue
M-celler	Microfold/membrane cells
N	Neuraminidase
NK	Natural killer
OD	Optical density
OPD	Orto-phenyl-diamin
PBP	Penicillinbindende proteiner
PBS	Fosfatbufret saltvann
pIgR	Polymer Immunoglobulin Receptor
PNC	Pneumokokk C polysakkarid nøytraliserende
PnC	Pneumokokk proteinkonjugert kapselpolysakkarid
PnH	Pneumokokk helcelle
PRP	Penicillin resistente pneumokokker
rpm	Rotations per minute
s.c	Subcutan
sIg	Sekretorisk Immunoglobulin
SR	Senkningsreaksjon

## SAMMENDRAG

Dagens vaksiner har et forbedringspotensial. Administrasjonsmåte, effekt og tid for beskyttelse, er blant områder det jobbes med å forbedre. Ved Folkehelseinstituttet har det lenge vært forsket på slimhinnevaksiner, og denne hovedfagsoppgaven er en videreføring av dette arbeidet.

De fleste av dagens slimhinnevaksiner består av levende, svekkede mikrober. Det ble tidlig klart at levende vaksiner kan innebære en risiko for å gi sykdom, spesielt i mennesker med svekket immunforsvar. Ved Folkehelseinstituttet er det vist at en enkel formulering med drepte helcelle pneumokokker, gitt i form av nasedråper, beskytter mot pneumokokkinfeksjon i mus.

Denne oppgaven fokuserer nettopp på pneumokokker. Effekt av inaktivert pneumokokk helcellevaksine gitt ved injeksjon eller nasedråper, ble undersøkt i forhold til immunrespons, og beskyttelse mot sykdom etter ulike administrasjonsmåter for smitte med pneumokokker. I tillegg ble det sett på om vaksine mot influensa kunne virke som adjuvans, eller forsterker, for pneumokokkvaksine når de ble gitt sammen. Bakgrunn for dette er kliniske observasjoner som viser at pasienter som har fått begge vaksinene er bedre beskyttet mot pneumokokksykdom enn de som har fått pneumokokkvaksine alene.

Det overordnede målet for oppgaven var å bidra til at slimhinnevaksine mot pneumokokksykdom i mennesker skal bli en realitet.

Vaksinene ble gitt til forsøksdyr (mus), to ganger med syv ukers mellomrom. Effekten ble målt med ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) som systemiske antistoffer (IgG i blod) og som antistoffer lokalt på slimhinnene (IgA i spytt). Dyrene ble deretter smittet med en pneumokokkstamme som gir sykdom hos mus. Denne ble administrert intraperitonealt (i bukhule) eller nasalt (på nes slimhinne).

Vaksinene ble gitt både subcutant og intranasalt for sammenligning. I forsøket ble inaktivert pneumokokk helcellevaksine (PnH) benyttet alene, og i kombinasjon med inaktivert influensavaksine (INV). Forsøket viste at musene fikk god IgG immunrespons i blod, både

mot PnH og INV, etter s.c. immunisering. S.c. immunisering gav også god beskyttelse mot pneumokokksykdom etter smitte. I.n. immunisering gav dårlig IgG respons i blod mot både PnH og INV. Beskyttelse mot pneumokokksykdom etter i.n., men ikke i.p. smitte ble her oppnådd. Signifikant nivå av IgA i salivaprøvene, kunne ikke vises hos noen av gruppene.

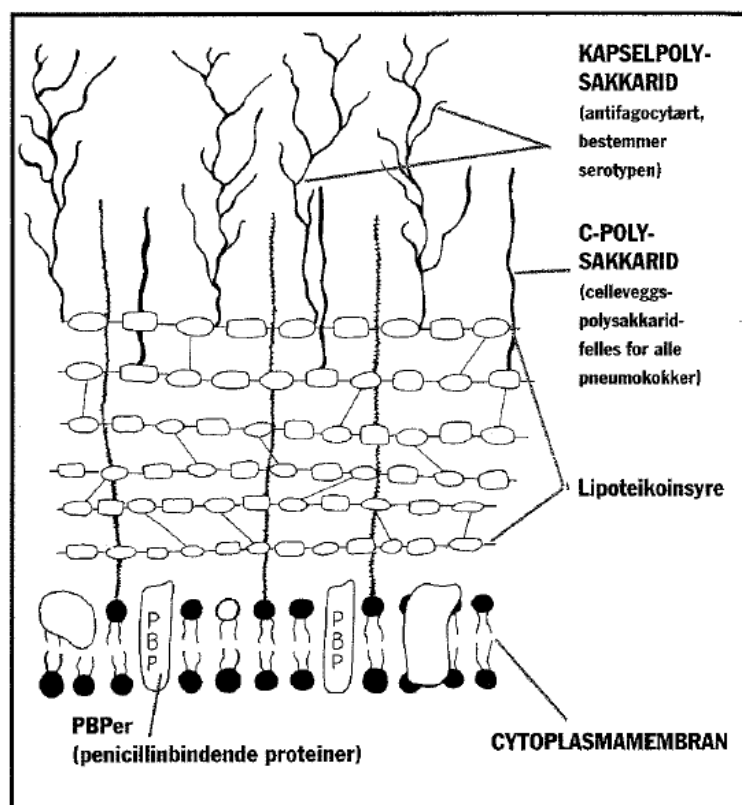
Det kunne ikke vises til signifikant påvirkning i immunrespons ved samtidig administrasjon av influensa vaksine, men det er sterke tendenser til at INV i kombinasjon med PnH i den i.n. vaksinen forsterker beskyttelse mot sykdom etter i.n. smitte. Dette kan være en svært interessant observasjon å se nærmere på i senere forsøk, da slimhinnene er den naturlige inngangsporten for pneumokokker som gir sykdom hos menneske.

# 1. INNLEDNING

## 1.1. PNEUMOKOKKER

### 1.1.1. Pneumokokkbakterien og sykdom den forårsaker

Pneumokokkbakterien (*Streptococcus pneumoniae*) er en Gram-positiv bakterie med polysakkaridkapsel. Denne kapselen er viktig for bakteriens evne til å forårsake sykdom hos mennesker da kapselen beskytter mot fagocytose når spesifikke antistoffer mot den ikke er tilstede. Bakterien er klassifisert i ulike serotyper basert på antigenene forskjeller i polysakkaridkapselen. Det finnes over 90 serotyper av pneumokokker. Noen av serotypene er hyppigere årsak til sykdom enn andre, og det er forskjell på hvilke serotyper som dominerer blant barn og hvilke som dominerer blant voksne og eldre. I tillegg ser man geografiske variasjoner fra land til land og variasjon over tid (Pedersen et al. 2004, Hausdorff et al. 2005)



**Figur 1:** Skjematisk tegning av celleveggen hos en pneumokokk. Lange polysakkaridmolekyler (vaksineantigen) utenfor peptidoglykanlaget utgjør kapselen som er antifagocytær. De penicillinbindende proteinene (PBP) er transpeptidaser som bygger opp peptidoglykanet. De er målmolekyler for penicillin (og andre  $\beta$ -laktamer) og endres ved økt penicillinresistens. (Høiby et al. 1998)

Som enkelte andre sykdomsfremkallende bakterier, kan pneumokokker bæres i hals og tonsiller, uten å gi sykdom, og hører derfor til menneskets normalflora. Bæring av pneumokokker i halsen er påvist hos 5-60% av friske personer og ses spesielt hos barn. I Norge er det i en studie blant barnehagebarn påvist at 45% av barna var bærere av pneumokokker. (Pedersen et al. 2004) Pneumokokkene gir, under normale omstendigheter, ikke sykdom eller bærerskap hos dyr. Mennesket er i praksis eneste reservoar og smittekilde. (Bergsaker et al. 2004)

Sykdom forårsaket av pneumokokkbakterien kan ha alle grader av alvorlighet, fra mild sykdom til livstruende tilstander. De hyppig forekommende, lokaliserte, overflatiske (på slimhinnene) infeksjonene, bihulebetennelse (sinusitt) og mellomørebetennelse (otitis media) er som regel ufarlige, men kan være plagsomme (tabell 1). De er svært vanlige, særlig hos barn. En regner med at 30-50% av bakterielle sinusitter og otitter skyldes pneumokokker. (Block 1997, Eskola et al. 2001)

Pneumokokkbakterien forårsaker også lungebetennelse (pneumoni), som kan være meget alvorlig. Pneumoni er også å regne som en invasiv bakteriesykdom idet infeksjonsprosessen foregår i et indre, normalt sterilt organ. Antibiotika brukt mot følsomme bakterier, stopper videre utvikling mot systemisk, mer alvorlig sykdom. Dersom antibiotikaresistens får utvikle seg, kan man få alvorlig forløp av pneumonier slik en så i den førantibiotiske tid. (Tilgham 1937)

Særlig alvorlige blir pneumokokkinfeksjonene når bakteriene invaderer blodbanen og infeksjonen blir systemisk. Det fører til det vi på norsk kaller ekte blodforgiftning (bakteriemi = bakterier i blodet og sepsis = bakterier i blodet + alvorlig organpåvirkning). Noen ganger fører spredning av pneumokokker via blodet også til purulent hjernehinnebetennelse (meningitt) som er svært alvorlig. Bakteriemi/sepsis og meningitt er de viktigste formene for systemisk pneumokokksykdom (tabell 1). Pneumokokker er av de aller hyppigste årsakene til både bakteriemi/sepsis og bakteriell hjerne-hinnebetennelse. (Bergsaker et al. 2004)

Systemisk pneumokokksykdom (bakteriemi, sepsis og meningitt) rammer særlig små barn og eldre. Men personer i alle aldre kan rammes, særlig dersom de har en grunnsykdom som gir nedsatt forsvar mot infeksjoner med kapselkledd bakterier. Pneumokokkene gir langt oftere bakteriemi/sepsis uten meningitt enn med meningitt, og systemisk pneumokokksykdom er



den vanligst meldte årsaken til bakteriemi i Norge. Personer som har fjernet milten, eller har dårlig miltfunksjon, er særlig utsatt for alvorlige pneumokokk-infeksjoner ved at de rammes hyppigere, får rask utvikling av sepsis og har mer alvorlig prognose enn ellers sammenlignbare individer. Dødeligheten av systemisk pneumokokksykdom hos disse pasienter er 75%, mot 17% ellers. (Bergsaker et al. 2004)

**Tabell 1.** Sykdom forårsaket av *Streptococcus pneumoniae* (Bergsaker et al. 2004)

Mindre alvorlige, lokaliserte sykdomsformer (hyppige)	Alvorlige sykdomstilstander (der bakteriene går inn i vev og evt. invaderer blodbanen)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mellomørebetennelse (otitis media)</li> <li>• Bihulebetennelse (sinusitt)</li> <li>• Øyekatarr (konjunktivitt)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lungebetennelse (pneumoni, vanlig)</li> <li>• Ekte blodforgiftning (sepsis, relativt vanlig)</li> <li>• Hjernehinnebetennelse (purulent meningitt, relativt sjelden)</li> <li>• Bløtdelsinfeksjoner, leddinfeksjon, abscesser, osteomyelitter og lignende (sjeldne)</li> </ul>

### 1.1.2. Smittemåte

Nærdråpesmitte er vanlig måte for smitte overføring. Smitte forekommer relativt hyppig, men bare en liten andel av nysmittetilfellene fører vanligvis til klinisk sykdom. Både bærere og klinisk syke kan være kilde. Samtidig øvre luftveisinfeksjon med hosting og nysing, også av andre årsaker, øker smitterisikoen ved nærkontakt. Indirekte smitte med tilsølte leker o.l. er mulig. (Fhi 2006)

### 1.1.3. Symptom og forløp

Pneumonisyntomer kommer klassisk som plutselige feberstigninger, sting i brystet ved inspirasjon, hoste, dyspné (åndenød), takypné (rask pust) og ekspektorat. Ekspektoratet er typisk purulent eller purulent med lys plommesyttetøyfarge. Men ofte er starten mye mer

gradvis og symptomer og funn mindre karakteristiske, særlig hos eldre. Pneumoni er en hovedårsak til systemisk sykdom. Pneumoni med bakteriemi har alvorligere prognose enn uten bakteriemi. Ved meningitt/septikemi ses oftest mindre raskt forløp enn ved septikemisk meningokokksykdom. Feber, nedsatt allmenntilstand, forvirring, kramper evt. koma kan ses særlig hos barn og eldre. Petekkier (karakteristiske blødninger i huden) er ikke vanlig, unntatt i hyperakutte tilfeller, særlig dersom milddysfunksjon foreligger. En del tester som signaliserer alvorlig sykdom som SR og CRP-måling bruker tid på å slå ut. Slike tester kan derfor være negativ i tidlig stadium, selv ved alvorlig sykdom. Letalitet ved systemisk pneumokokksykdom er ca. 17%, hos miltløse ca 75%. Pneumokokkmeningitt har mye høyere letalitet (~30%) og høy forekomst av komplikasjoner. (Fhi 2006)

#### **1.1.4. Behandling**

Ved luftveisinfeksjoner i Norge, også pneumonier, er penicillin førstevalgspreparat. Ved mistenkt systemisk sykdom kreves sykehusinnleggelse og parenteral antibiotikabehandling. Bare sykdom forårsaket av penicillinresistente pneumokokker (PRP) med nedsatt følsomhet for penicillin er en allmennfarlig smittsom sykdom i smittevernloven. (Fhi 2006)

#### **1.1.5. Forebyggende tiltak**

Det finnes to typer vaksine på det norske markedet:

Polysakkaridvaksine har vært tilgjengelig siden 1984. Én dose er nok, og gir ca. 70% beskyttelse mot systemisk sykdom, mens effekten mot pneumoni er usikker. Vaksinen inneholder 23 av de mest aktuelle serotyper. Dette dekker også godt serotypene som gir systemisk sykdom i Norge. Vaksinen utrydder ikke bærertilstand. Barn under 2 år responderer ikke på vaksinen. Revaksinasjon av eldre og andre risikogrupper unntatt miltløse anbefales etter 10 år og det er ikke nødvendig å måle antistoffnivået i serum før revaksinasjon for denne gruppen. For miltløse og personer med nedsatt immunforsvar anbefales revaksinasjon etter 3-5 år. (Aaberge 2005)

Konjugatvaksine har vært tilgjengelig siden 2001. Denne vaksinen er godkjent for barn i alderen 2-24 måneder. Vaksinen består av pneumokokk-polysakkarider fra syv ulike serogrupper som er konjugert til et bærerprotein og adsorbert på aluminiumfosfat. Disse syv antigenene dekker ca. 70% av systemiske stammer isolert fra barn under 2 år i Norge. (Pedersen et al. 2004) Vaksinen gir ca. 95% beskyttelse mot systemisk sykdom som skyldes de bakterietypene som inngår i vaksinen. Beskyttelsen mot pneumoni og otitis media er langt dårligere (20% mot klinisk pneumoni med positiv røntgenfunn og ca. 7% reduksjon av klinisk otitis media). (Black et al. 2000, Black et al. 2002) Anbefalt vaksinasjonsregime er avhengig av barnets alder. Det må gis tre doser til barn i første leveår og to doser til barn mellom 1 og 2 år. Over to års alder er sykdommen mye sjeldnere, og en større andel av tilfellene forårsakes av serotyper som ikke inngår i vaksinen. I Norge tilbys konjugatvaksinen gjennom det ordinære barnevaksinasjonsprogrammet fra juli 2006. Det er da valgt et tre-dose regime med to doser i første leveår, og en boosterdose ved ett års alder. (Bergsaker et al. 2004)

Enkelte risikoutsatte grupper anbefales spesielt vaksinasjon (tabell 2).

**Tabell 2.** *Risikoutsatte grupper som anbefales vaksinasjon mot pneumokokksykdom. (Fhi 2006)*

- personer som har fjernet milten eller har nedsatt miltfunksjon (fra 2 måneders alder)
- personer over 65 år
- personer med nedsatt infeksjonsforsvar som følge av f.eks. HIV-infeksjon og Hodgkins sykdom
- personer med kroniske hjerte/kar- eller lungesykdommer
- personer som har hatt pneumokokkpneumoni eller annen alvorlig pneumokokkinfeksjon.
- personer med cerebrospinalvæskelekkasje

Hos voksne er målgruppen for pneumokokk- og influensavaksinasjon i stor del den samme. Det anbefales derfor at de to vaksinene tilbys samtidig til dem som ikke har fått pneumokokkvaksine tidligere. (Fhi 2006)

## 1.2. INFLUENZA

### 1.2.1. Inflensaviruset og sykdom det forårsaker

Influensa er en svært smittsom virusinfeksjon forårsaket av influensavirus. Man kan skille mellom 3 typer influensa.

- Sesonginfluensa som kommer hver vinter. Den skyldes et virus som er bare litt forskjellig fra tidligere års virus sånn at mange av oss vil være delvis immune. Derfor blir ikke så mange smittet, og sykdommen er ikke så alvorlig.
- Pandemisk influensa er betegnelsen på en influensasykdom som skyldes et helt nytt virus som ingen er immune mot. Dette viruset vil spre seg raskt gjennom hele verden og vil kanskje gi mer alvorlig sykdom.
- Fugleinfluensa er en sykdom blant fugler. Av og til ”tar fugleviruset feil” og smitter et menneske som kan få ”menneskelig fugleinfluensa”, men mennesker er ikke særlig mottakelige for dette viruset.

To typer av viruset, Influenza type A og B, gir årlige utbrudd eller epidemier av varierende styrke hos mennesker. Ved større epidemier kan opptil 10-20% av befolkningen bli rammet. Særlig risikoutsatte grupper har økt risiko for komplikasjon og død etter influensa.

Anslagsvis dør mer enn 1000 personer, i all hovedsak eldre, i Norge i løpet av en gjennomsnittlig influensasesong som følge av influensa. Influenza forekommer som årlige epidemier på den nordlige halvkule i tidsrommet fra november til april, på den sørlige halvkule fra mai-oktober. I tropiske strøk kan sesongmønsteret variere og er gjerne mindre utpreget. (Fhi 2006)

Type A-virus ble første gang påvist i 1933, type B i 1940. Vaksine ble utviklet på slutten av 1940-tallet. (Fhi 2006)

Type A-virus kan subtypes og klassifiseres basert på kombinasjonen av H-antigen (16 subtyper) og N-antigen (9 subtyper). Subtyper som for tiden sirkulerer blant mennesker har kombinasjon H1 og H3 med N1 og N2, f.eks. H1N1 eller H3N2. De øvrige subtypene fins i et stort antall kombinasjoner hos varmblodige dyr, primært hos fugl. Siden to subtyper av influensa A i tillegg til influensa B forårsaker epidemier, inneholder også influensavaksinen de tre forskjellige virusene. (Fhi 2006)

Virusene endrer seg hele tiden, og med få års mellomrom oppstår nye varianter som er tilstrekkelig annerledes til at immunitet mot tidligere varianter ikke beskytter. Vintre med nye influensavarianter får derfor gjerne større influensautbrudd enn ellers. Verdens helseorganisasjon (WHO) overvåker utviklingen av influensa gjennom et nettverk med nasjonale influensasentre i 85 land, og revurderer sammensetningen av influensavaksinen to ganger i året for å sikre at vaksinen inneholder de mest aktuelle variantene av de tre virusene. (Fhi 2006)

Nye virus bringes til de enkelte landene med smittede personer hver sesong, og når sesongens utbrudd er overstått er også influensavirus borte fra landet helt til nye importerte virus starter å utbre seg neste høst. Virusene opptrer derfor ikke som geografisk distinkte varianter, i samme sesong opptrer liknende virus over hele verden.

En rekke andre akutte infeksjoner med luftveissymptomer kalles feilaktig for influensa. (Fhi 2006)

Influensapandemier er ekstra store epidemier med global spredning av et ”nytt” virus (ny subtype) som få eller ingen kan forventes å ha immunitet mot. I vår del av verden regnes pandemisk influensa som en av de mest sannsynlige årsaker til akutte krisetilstander. Pandemier opptrer med noen tiårs mellomrom. Ikke bare blir det flere syke, men en større andel får også alvorligere sykdom eller dør. Mange av disse er utenfor de tradisjonelle risikogruppene. De nye virusene stammer fra influensa A-virus hos fugl, der det fins et mye større mangfold av influensavirus enn hos mennesker. Det nye viruset fortrenger det gamle A-viruset, og i løpet av noen få år etablerer det seg som vanlig sesongmessig influensa. (Fhi 2006)

Bare type A er kjent som årsak til pandemier. Influensa B-virus opptrer bare hos mennesker, og det fins dermed ikke noe naturlig reservoar for B-pandemistammer. Tilsammen ca. 18 pandemier har inntruffet siden den første klart beskrevne pandemi i 1580. Største kjente pandemi var "Spanskesyken" i 1918-19 (forårsaket av subtype H1N1) som på verdensbasis forårsaket 25-40 millioner dødsfall. I Norge regner man med at epidemien forårsaket ca. 15 000 dødsfall. Siste større pandemier var "Asiasyken" i 1957 (H2N2), "Hong Kong-syken" i 1968 (H3N2), mens ”russerinfluensaen” i 1977 (H1N1) ikke forårsaket særlig økt morbiditet eller mortalitet og av mange ikke betraktes som en pandemi. (Fhi 2006)

Det viktigste naturlige reservoaret for influensavirus er i forskjellige fugleslag, først og fremst hos vannlevende fugl slik som andefugl, vadefugl og sjøfugl. Hos disse forløper infeksjon som regel uten alvorlige symptomer. Dersom slike virus krysser artsbarrieren til andre fugleslag kan alvorligere sykdom oppstå. Høsepest eller høypatogen aviær influensa er en smittsom virussykdom hos høsefugl og kan føre til en dødelighet i fjørreflokken på opp til 100%. Disse høyvirulente virusene finnes normalt ikke i naturen, men utvikler seg når influensavirus av subtype H5 eller H7 får sirkulere i høsefuglbestander over lengre tid. Fugleinfluensa er aldri påvist i Norden, men det har de senere år vært utbrudd av sykdommen i bl.a. flere land i Asia, i Nederland, Italia, Canada og USA. (Fhi 2006)

Aviære influensavirus smitter lett fra fugl til fugl, men vanskelig til mennesker. Menneskers slimhinner er lite mottakelig for slike virus. En sjelden gang kan likevel mennesker bli smittet gjennom direkte eller indirekte kontakt med infiserte fuglers avføring eller luftveisekret. Et menneske som er smittet med et fugleinfluensavirus vil bare helt unntaksvis smitte videre. Selv om få eller ingen mennesker har immunitet mot fugleinfluensavirus, vil et slikt virus i seg selv vanskelig kunne forårsake store epidemier blant mennesker, fordi smittsomheten blant mennesker er så lav. Men influensavirus er foranderlige, og formeringen av influensavirus i cellene er ikke nøyaktig. Dersom et menneske smittes av både vanlig influensa og fugleinfluensavirus samtidig, kan celler i kroppen som er infisert med begge slags virus, produsere forskjellige kryssninger mellom de to virusene (reassortering). Da kan man teoretisk få et nytt virus med overflaten til fugleinfluensaviruset og smitteegenskapene til et humant influensavirus. Et slikt virus vil kunne ha et mye større pandemisk potensial enn det opprinnelige viruset. (Fhi 2006)

De viktigste tiltakene for å hindre spredning til mennesker er å få utbruddene i fuglebestander under kontroll. Det skjer ved å drepe alle fuglene på gårder og markeder der det er syke fugler og hindre kontakter mellom gårder. Vaksinasjon kan brukes som et supplerende virkemiddel. (Fhi 2006)

### **1.2.2. Smittemåte**

Nærdråpe- og kontaktsmitte. Luftsmitte forekommer også. Lav smittedose. Vanligvis smitteførende fra tiden omkring symptomdebut og 3-5 dager framover. Barn og personer

med svekket immunforsvar kan være smitteførende lenger. Gjennomgått infeksjon gir vanligvis mange års immunitet mot den samme influensastammen og delvis kryssimmunitet mot liknende stammer. (Fhi 2006)

### **1.2.3. Symptomer og forløp**

Feber, muskelsmerter, hodepine, tørrhoste og slapphet. Mageplager er sjeldne, men kan opptre spesielt hos barn. Varighet 7-10 dager. Komplikasjoner er vanligvis bakterielle infeksjoner (pneumoni, sinusitt). Mange infeksjoner er asymptomatiske. (Fhi 2006)

### **1.2.4. Behandling**

Symptomer kan reduseres med febernedsettende og smertestillende medikamenter som for eksempel paracetamol. Evt. antibiotika ved komplikasjoner.

Behandling med zanamivir (Relenza®) som inhalasjonspulver til voksne og barn over 12 år eller oseltamivir (Tamiflu®) som kapsler eller mikstur til voksne og barn over 1 år kan være indisert ved symptomer på influensa når sykdommen sirkulerer i nærmiljøet. Det er kun vist effekt av behandlingen hvis den blir igangsatt innen 2 døgn etter symptomdebut. Varigheten av sykdommen kan da forkortes med 1-2,5 dager. (Fhi 2006)

### **1.2.5. Forebyggende tiltak**

Det viktigste tiltaket for å forebygge influensa er vaksinasjon. For utsatte deler av befolkningen er vaksiner et effektivt virkemiddel for å begrense sykelighet og dødelighet, men for at vaksinen skal "treffe" i forhold til de virusvarianter som til enhver tid sirkulerer, må influensavaksinens sammensetning revurderes for hver sesong. Informasjonen som WHO innhenter gjennom sitt overvåkingsnettverk danner beslutningsgrunnlaget for anbefalinger om sammensetningen av neste sesongs influensavaksiner. Denne prosessen gjennomføres to ganger årlig, i februar for vaksinen for den nordlige halvkule og i september for den sørlige. Årlig gjentatt vaksinerings er derfor nødvendig for å gi en tilfredsstillende beskyttelse. Man regner med at bare ca. 30% av risikogrupperne årlig får influensavaksiner. Norge har dårligere

vaksinasjonsdekning enn de fleste andre land både i Norden og i resten av Europa. WHO's målsetting er en vaksinasjonsdekning på minst 50% for den eldre delen av befolkningen innen 2006, og 75% innen 2010. (Fhi 2006)

Influensavaksine bør gis i september-november, og full beskyttelse oppnås etter to uker. Vaksinen gir vanligvis 70-80% beskyttelse, men noe lavere hos eldre. Hos eldre reduserer vaksinen insidensen av komplikasjoner med 50-60% og dødeligheten med 70-80%. (Fhi 2006)

Det er under influensasesongen også viktig med god håndhygiene og å unngå hosting og nysing på andre. Syke bør holde seg borte fra arbeid, skole og barnehage. Oseltamivir (Tamiflu®) er indisert for forebygging av influensa etter smitteeksponering hos voksne og ungdom over 13 år som har vært i kontakt med et klinisk diagnostisert influensatilfelle når influensa er påvist i omgivelsene. Antivirale midler brukt som profylakse er ingen erstatning for influensavaksine. (Fhi 2006)

**Tabell 3.** Risikoutsatte grupper som årlig bør vaksineres mot influensa. (Fhi 2006)

- voksne og barn med alvorlige luftveissykdommer, spesielt de som har nedsatt lungekapasitet
- voksne og barn med kronisk hjerte-/ karsykdommer, spesielt de med alvorlig hjertesvikt, lavt minuttvolum eller pulmonal hypertensjon
- voksne og barn med sykdommer som gir nedsatt infeksjonsresistens, f.eks. HIV-smittede
- voksne og barn med kronisk nyresvikt
- voksne og barn med diabetes
- beboere på alders- og sykehjem
- personer over 65 år

Hos voksne er målgruppen for pneumokokk- og influensavaksinasjon i stor del den samme. Det anbefales derfor at de to vaksinene tilbys samtidig til dem som ikke har fått pneumokokkvaksine tidligere. (Fhi 2006)



### 1.3. IMMUNFORSVARET

Kroppens hud og slimhinner danner barrierer som utgjør første forsvarsverk i medfødt (non-adaptiv) immunitet. I tillegg har vi proteiner i sekreter og i plasma som beskytter oss mot bakterier og virus. En rekke plasmaproteiner inngår i komplementsystemet, en kaskade som er spesielt viktig i den tidlige fasen av infeksjoner. Bakterier aktiverer komplementfaktorer, og det dannes komplementfaktorfragmenter: Opsoniner (C3b) binder reseptorer på fagocytter, anafylatoksiner (C5a, C3a) aktiverer mastceller, kjemotaksiner (C5a) rekrutterer leukocytter til inflammasjonen. Det dannes også terminalt komplementkompleks (C5b-C9) som lasserer bakterier. (Munthe 2006) For bakterier med polysakkaridkapsel, som *Streptococcus pneumoniae*, er opsoniner og fagocytose menneskers viktigste forsvarsmekanisme (Parham 2005)

Leukocytter inndeles i lymfocytter (T-celler, B-celler, NK-celler (naturlige drepeceller)), monocytter, dendritiske celler og granulocytter. Ervervet (adaptivt) infeksjonsforsvar, som utvikles som en følge av kontakt med mikroorganismer, er avhengig av lymfocyttesponser og har tre kjennetegn: spesifisitet, hukommelse og toleranse. En spesifikk reaksjon betegnes ved at lymfocytter reagerer med ett antigen (og ikke et annet ubeslektet antigen). Immunologisk hukommelse innebærer at lymfocytter som er spesifikke for et antigen, gjennomgår celledeling for å bli langlivede hukommelsesceller. Toleranse krever at lymfocytter ikke reagerer på kroppens egne celler og proteiner. (Munthe 2006)

#### 1.3.1. Slimhinnens immunforsvar

Slimhinnene dekker om lag 400 m<sup>2</sup> på innsiden av fordøyelseskanalen, luftveiene, urinveiene og genitaltraktus. Slimhinnene er i direkte kontakt med omverdenen og utgjør en inngangsport for de fleste patogene mikrober. (Salyers & Whitt 2002) Mer enn 90% av alle infeksjoner involverer slimhinnen ved mikrobiell kolonisering eller passasje inn i kroppen. (Brandtzaeg 2003) Slimhinner og mucosaassosiert lymfoid vev (MALT) er derfor meget viktig i vårt forsvar mot patogener.

For å hindre infeksjon, danner slimhinnene en fysisk og kjemisk barriere mot invaderende slimhinnepatogener. Denne barrieren består av et lag epitelceller og spesialiserte celler som

gobletceller, M-celler og cilierte celler. Gobletcellene produserer mucus som er et slimlag bestående av glykoproteiner. Mucus smører slimhinnene og fester seg til skadelige partikler og mikroorganismer, som deretter kan virvles opp av cilierte celler og svelges eller spyttes ut. Mucus inneholder også lysozym som kan ødelegge bakterienes cellevegg, og laktoferrin som hindrer bakteriell vekst ved å binde opp jern. (Salyers & Whitt 2002)

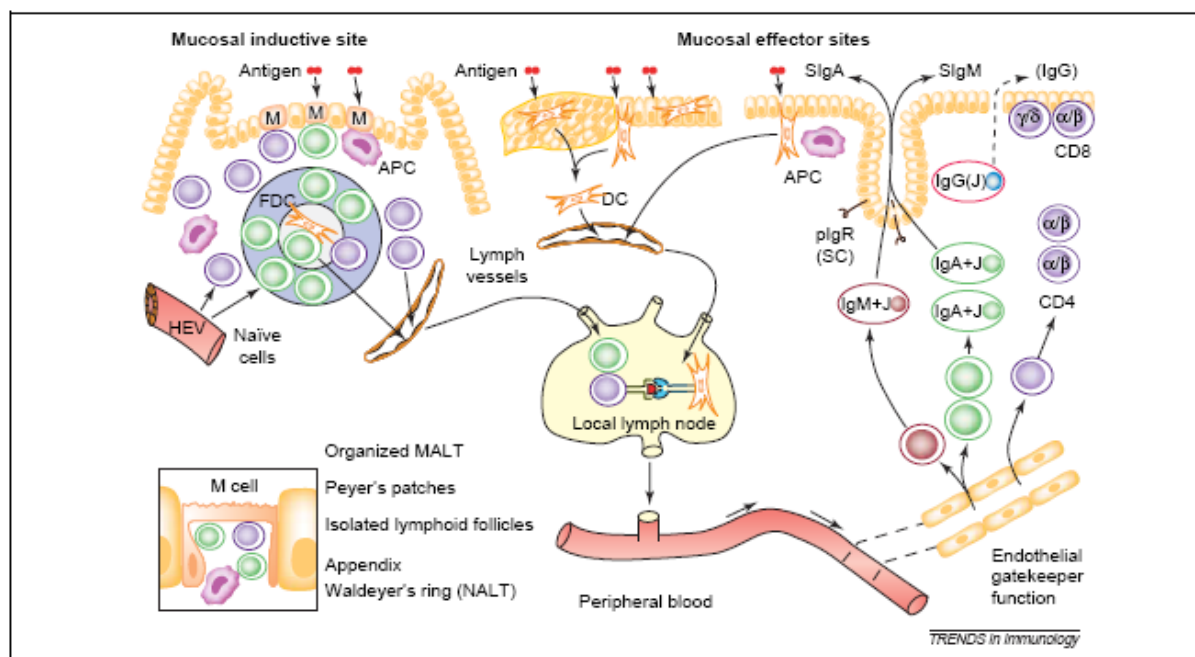
I tillegg til at epitellaget utøver barrierefunksjon, mekanisk rensing og sekreerer kjemiske antimikrobielle forbindelser, er slimhinnene godt utstyrt med både uspesifikke og spesifikke immunologiske forsvarsmekanismer. De uspesifikke forsvarsmekanismene utgjøres av komplement, fagocytiske nøytrofile celler og makrofager, dendritiske celler, NK (natural killer) celler og mast celler. Samlet gir disse et betydelig bidrag til vertens tidlige forsvar mot patogener, samtidig som de initierer spesifikke immunresponser på slimhinnene. (Holmgren & Czerkinsky 2005)

Det spesifikke immunforsvaret utgjøres av ”mucosa-assosiert lymfoid vev” (MALT). Kvantitativt er MALT kroppens viktigste effektororgan med tanke på antistoffmediert immunitet, og hos friske mennesker inneholder MALT 80 % av alle kroppens immunocytter. Dette lymfatiske vevet består av regioner med lymfocytter, makrofager, dendritiske celler og enkelte plasmaceller, dekket av et spesielt epitellag (”follicle-associated epithelial”) som består av M-celler. Antigen tas opp av spesialiserte M-celler ved pinocytose og leveres til antigenpresenterende celler (APC) i det underliggende lymfatiske vevet. APC kan deretter aktivere lymfocytter, enten direkte eller i drenerende lymfeknuter. (Holmgren & Cerkinsky 2005)

I mange slimhinner finnes dendrittiske celler (DC) med lange utløpere (dendritter). Utløperne kan strekke seg gjennom epitelet, såkalt snorklende dendrittiske celler, og ta opp antigener på overflaten, bryte dem ned til peptidfragmenter og så presentere disse på HLA-klasse 2-molekyler til T-celler. Dersom dendrittiske celler aktiveres av vaksine eller adjuvans, vil de vandre til lymfeknuter der de blir aktive APC. (Bakke & Haneberg 2006)

Naive B og T celler kommer til MALT (og lymfe knuter) via ”high endothelial venules (HEVs). Etter å ha blitt aktivert til å bli hukommelses/effektor B og T celler migrerer de fra MALT og regionale lymfe knuter via lymfe og perifer blodbane for så å nå effektor område

ved slimhinne. (Bakke & Haneberg 2006) Migrasjonen skjer ved hjelp av celleadhesjonsmolekyler og kjemokiner. (Holmgren & Czerkinsky 2005)

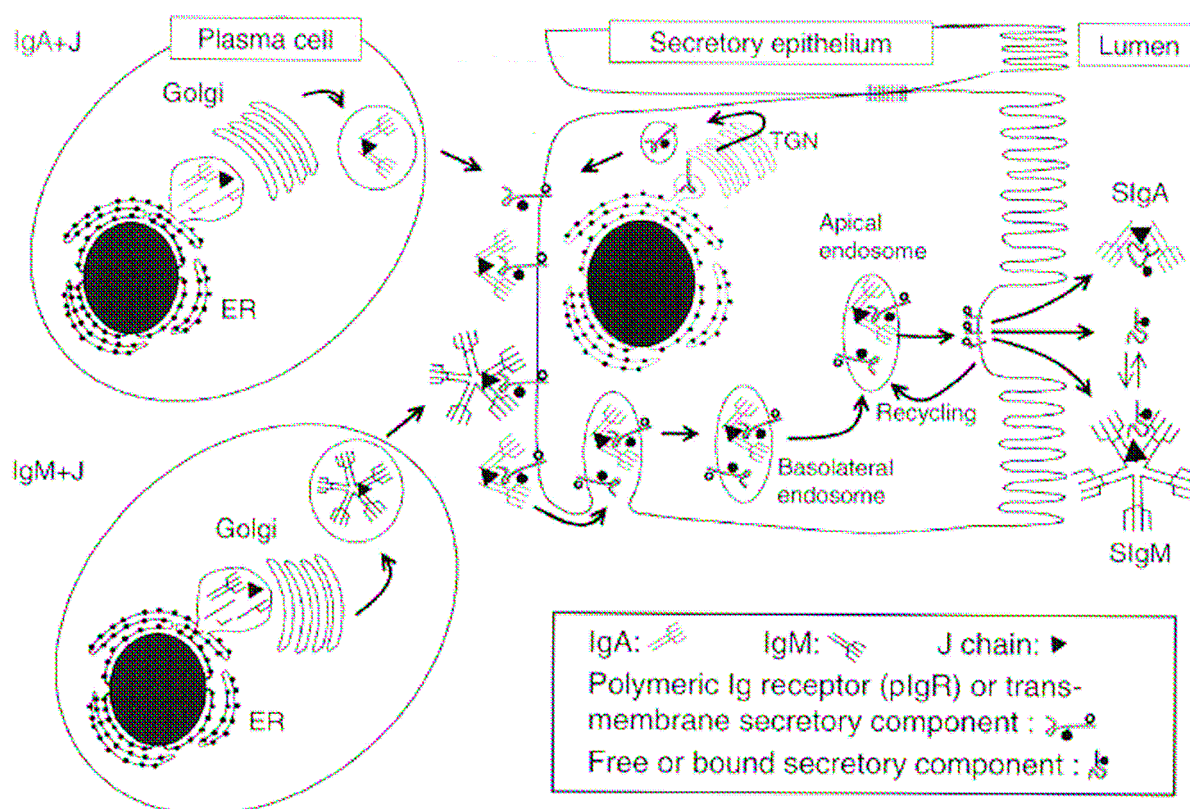


**Figur 2:** Skjematisk beskrivelse av immunapparat i menneskers slimhinner. Induktive sider for slimhinne T og B celler består av regionalt mucosa assosiert lymfatisk vev (MALT) med B-celle follikler og M-celle follikkel assosiert epitel hvor eksogene antigen fra lumen blir transportert aktivt gjennom for å nå profesjonelle antigenpresenterende celler (APCs) inkludert dendrittiske celler (DC), makrofager, B celler og follikulære DC (FDC). Bindevevet under effektorområde for slimhinnen er illustrert med de forskjellige immuncellene B lymfocytter, J-kjede uttrykkende IgA og IgM plasmaceller, IgG plasmaceller med en variant av J-kjede og CD4<sup>+</sup> T celler. I tillegg er transport av sIgA og sIgM ved hjelp av pIgR illustrert, samt paracellulær lekkasje av små mengder både lokalt produsert IgG og IgG fra serum. IgG kan ikke interagere med J-kjede for så "å bindes til pIgR. I nedre venstre hjørne vises detaljene for en M celle i "kontakt" med ulike celletyper. (Brandtzaeg 2004)

### 1.3.2. Produksjon av sekretoriske antistoffer

Slimhinner og eksokrine kjertler i voksne mennesker inneholder mer enn 80% av alle antistoffproduserende celler i kroppen. 80-90% av disse er IgA immunocytter. (Brandtzaeg 2003) sIgA (sekretorisk IgA) er den dominerende antistoffklassen på slimhinnene og i sekreter som melk, svette, tårer og saliva. Her forekommer IgA-molekylet som en dimer holdt sammen av J-kjeden, og bundet til en sekretorisk komponent. Antistoffene produseres i underliggende bindevev og transporteres over epitellaget ved hjelp av "polymer immunoglobulin reseptor" (pIgR). Reseptoren binder dimerisk IgA (og pentamerisk IgM, men

i mindre grad) via J-kjeden. Dette initierer opptak av IgA-komplekset i epitelcellen ved reseptormediert endocytose. Inne i epitelcellen fraktes IgA-komplekset i vesikler til den apikale siden, hvor pIgR kuttes i området mellom membranankerpunktet og IgA-bindingssitet. Dermed blir IgA-dimeren frisatt sammen med en liten del av reseptoren (sekretorisk komponent) som kan bindes til mucin i mucus. Dette gjør at sIgA kan holdes fast på slimhinneoverflaten (Parham 2005)

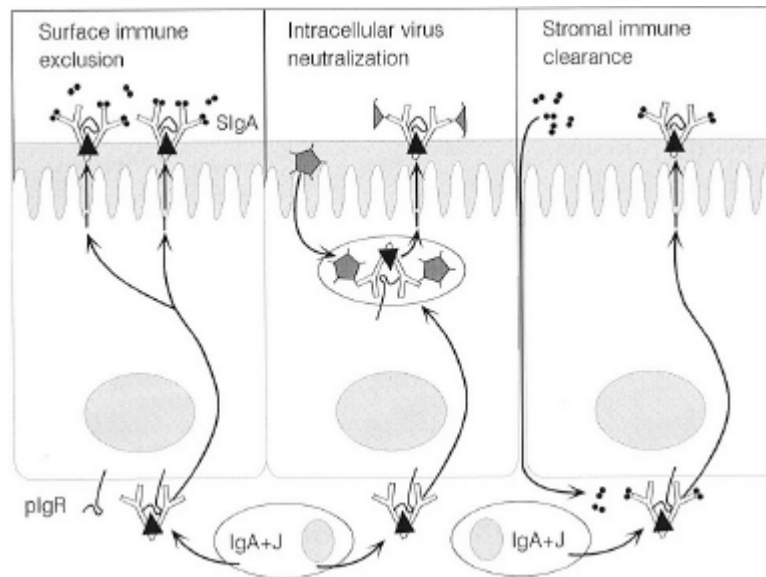


**Figur 3:** Modell for lokal produksjon og transport av sekretorisk IgA og IgM. (Brandtzaeg 2003)

### 1.3.3. Funksjon av sekretoriske antistoffer

IgA er den antatt viktigste effektor komponenten i MALT og danner en spesifikk, immunologisk barriere mot patogene inntrengere som bakterier og virus. (Holmgren og Czerkinsky) Det er beskrevet tre ulike effektor mekanismer for IgA i slimhinnen. (Figur 4) sIgA antistoffer hemmer bakteriell adhesjon og absorpsjon av makromolekyler på slimhinneoverflatene. (surface immune exclusion) Dimere IgA kan inaktivere infeksiøse

inntrenger inne i sekretoriske epitelceller, og sørge for at agens blir transportert tilbake til lumen. Dette beskytter mot epitelskade. (Intracellular virus neutralization) Dimere IgA kan også interagere med antigen som har klart å trenge gjennom slimhinneepitelet, og sende det tilbake til lumen ved hjelp av pIgR-mediert transport. (Stromal immune clearance) (Brandtzaeg 2003)



**Figur 4:** Skjematisert presentasjon av tre måter dimer IgA eller sIgA kan gi immunologisk beskyttelse på slimhinne. (Brandtzaeg 2003)

I tillegg til sIgA, kan sIgM og IgG antistoffer bidra i det spesifikke forsvaret på slimhinneoverflatene. sIgM benytter samme transportmekanisme som sIgA, mens IgG-molekyler kan lekke uspesifikt fra serum til slimhinneoverflater i nedre luftveier (Holmgren og Czerkinsky 2005)

#### 1.3.4. Systemisk antistoffrespons

Patogene mikroorganismer og andre antigene strukturer som kommer i kontakt med slimhinnene, kan også stimulere både antistoffmedier og cellemediert systemisk immunrespons. De første antistoffene som dannes ved infeksjon, er pentamere IgM-molekyler med lav affinitet for antigenet. Disse antistoffene utgjør sin effekt ved å aktivere

komplementsystemet, i tillegg til å nøytralisere antigen direkte. Senere i immunresponsen utgjør IgG den dominerende antistoffklassen i blodet. IgG-molekylene er mindre i størrelse, monomere, mer fleksible, og har høyere affinitet for antigenet. I motsetning til IgM, kan de forlate blodbanen og utøve sine funksjoner i vev. IgG antistoffer virker hovedsakelig opsoniserende ved å binde seg til mikroorganismer og merke dem for fagocytose. I tillegg kan de aktivere komplementsystemet, og direkte nøytralisere virus og bakterier gjennom okkupasjon av bindingssteder (Parham 2005)

### **1.3.5 Immunologisk hukommelse**

En vellykket primær adaptiv immunrespons etablerer langvarig beskyttende immunitet slik at senere infeksjon med samme patogen vil sette i gang en raskere, sterkere og mer spesifikk sekundær immunrespons (boosterrespons). Det er dette prinsippet som tilstrebes ved vaksiner. En boosterrespons utgjøres av sirkulerende antistoffer og kloner av hukommelses B- og T-celler dannet under den primære responsen. B-hukommelsescellene er dannet fra celler som har gjennomgått affinitetsmodning og isotype skift, slik at de har mer følsomme antigenreseptorer på overflaten. Dette gjør at de mer effektivt kan binde spesifikke antigen og presentere dem for T-hjelpeceller (Parham 2005)

For å oppnå boosterrespons ved immunisering, er det viktig at hukommelsesceller får tid til å utvikle seg før booster-dosen gis. Det er tidligere vist at seks ukers immuniseringsintervall av nasal influensavaksine i mus er tilstrekkelig for å oppnå boostereffekt i både saliva og blod. (Gunnufsen 2001. Knapstad 2002)

### **1.3.6 Slimhinnevaksiner**

Vaksiner av levende, svekkede mikrober har vært en av de største suksessene innen medisin. Ved å administrere slike vaksiner direkte på slimhinnen der mikroben normalt har sin naturlige inngangsport i mennesker, kan man få den naturlige immunresponsen til å gi respons både på slimhinne og systemisk. På denne måten har bruken av levende oral poliovaksine eliminert polio fra store deler av verden. Det ble derimot tidlig klart at levende vaksiner kan innebære en risiko for å gi sykdom, spesielt i mennesker med svekket immunforsvar.

(Haneberg & Holst 2002) Den levende poliovaksinen som gis oralt, representerer den første slimhinnevaksinen i allmenn bruk. Senere er det utviklet lignende vaksiner mot tyfoidfieber, kolera og rotavirusinfeksjon, og en nasal vaksine mot influensa (FluMist<sup>®</sup>) er nylig registrert i USA. Den eneste ikke-levende slimhinnevaksinen på markedet i dag er en oral koleravaksine som består av inaktiverte *Vibrio cholerae* og B-subenheten av koleratoksin. Flere forskningsgrupper arbeider imidlertid med å utvikle andre slimhinnevaksiner basert på inaktiverte mikrober eller deler av dem. (Bakke & Haneberg 2006)

Ved Folkehelseinstituttet er det gjort forsøk med dyr som tyder på at ikke-levende nasale vaksiner kan gi opphav til beskyttende immunitet og at de kan kombineres med tilsvarende vaksiner til injeksjon. Kliniske forsøk med nasale vaksiner bestående av betapropiolaktoninaktiverte influensapartikler viste at det kunne oppnås konsentrasjoner av antistoff i serum som regnes som beskyttende mot influensa. Det ble også dannet IgA-antistoff i neseseekret spesifikt rettet mot Influensa, noe som kan tenkes å hemme utbredelsen av sykdommen. Ved å optimalisere immuniseringsregimene slik at den immunologiske hukommelsen blir utnyttet bedre, og eventuelt legge til adjuvans i formuleringene, er det sannsynlig at ikke-levende slimhinnevaksiner kan bli et realistisk alternativ til flere vaksiner som nå gis ved injeksjon. (Bakke & Haneberg 2006)

Slimhinnevaksiner kan gis på flere ulike måter. Ved Folkehelseinstituttet har det blitt vist at intranasal immunisering av mus med inaktivert helcelle *Streptococcus pneumoniae* type 4 var bedre enn oral, gastrisk, samt rektal immunisering, sett i forhold til oppnådd systemisk og lokal immunrespons. Etter smitte med *Streptococcus pneumoniae* type 4 var mus immunisert intranasalt beskyttet både mot systemisk infeksjon og død, selv uten bruk av adjuvans i vaksine. Dette tyder på at en effektiv intranasal vaksine mot invasiv pneumokokksykdom kan lages ut fra en enkel formulering med hele drepte pneumokokker. (Hvalbye et al. 1999)

### 1.3.6. Slimhinneadjuvans

Normalt vil kroppen tåle å bli utsatt for store molekyler som presenteres på slimhinnene i form av fødemidler eller inhalerte substanser. Det utvikles som regel redusert immunreaksjon eller immunologisk toleranse etter gjentatt inntak av slike komponenter med antigene egenskaper. (Holmgren & Czerkinsky 2005) I dyreforsøk er det imidlertid vist at enkelte

toksiner som utskilles fra *V cholerae* og *Escherichia coli*, kan bryte denne toleransen og virke som adjuvans, slik at det blir utviklet immunitet mot proteiner som gis direkte på slimhinner. (Ogra 1996) Grunnlaget for denne virkningen er ikke helt klarlagt, men kan delvis forklares ved at de aktiverer og setter slimhinnen i en tilstand av alarmberedskap. (Neutra & Kozlowski 2006) På denne måten kan virkningen av et antigen bli forsterket ved å gis samtidig med adjuvans, men uten at antigen nødvendigvis er koblet til adjuvans. (Bakke & Haneberg 2006)

Det er imidlertid noen bekymringer i forhold til intranasal immunisering. Mulighetene for neurologiske bivirkninger pga. kort avstand mellom nasal slimhinne og hjerne vekker bekymringer. Det har blitt vist i mus (van Ginkel et al. 2000) og mennesker (Mutsch et al. 2004) at intranasale vaksineformuleringer med toksin som slimhinneadjuvans (kolera toksin og *Escherichia coli* enterotoksin), når nervevev. (Bakke 2005)



## **1.4. DYREFORSØK**

### **1.4.1. Dyr som redskap i medisinsk forskning**

I dyreforsøk gjøres dyr til et redskap for å nå mål som vi mennesker har definert. Målet med dyreforsøk er oftest ikke å hjelpe og behandle det enkelte forsøksdyret. I de tilfeller der mennesker inngår i medisinske forsøk, gjelder bl.a. Helsinki-deklarasjonen som slår fast at hensynet til den enkelte forsøkspersonen alltid skal gå foran samfunnets interesser. Deklarasjonen uttaler også at medisiner skal være grundig testet, bl.a. ved hjelp av forsøksdyr, før de gis til mennesker. (Engh & Hem 2004)

### **1.4.2. Er dyreforsøk nødvendig?**

Medisinsk forskning er viktig, og har gitt en rekke positive resultater, først og fremst for mennesker, men også for dyr. Medisinsk forskning er også en god helseinvestering for framtiden. Dyreforsøk er nødvendig for medisinsk forskning. Mange av landevinningen innen forskningen kunne ikke vær oppnådd uten bruk av dyreforsøk. Selv om man kontinuerlig finner nye og gode alternativer, kan disse ikke erstatte alle dyreforsøk, i alle fall ikke i dag – og sannsynligvis heller ikke i framtiden. Immunrespons mot vaksine er en biologisk respons som det i dag ikke finnes ”in vitro” alternativer til. Det var i denne oppgaven derfor nødvendig å benytte en ”in vivo” modell. (Engh & Hem 2004)

### **1.4.3. Hvorfor velge mus?**

Mus har vært det mest brukte forsøksdyret gjennom tidene. Dette gjaldt også i Norge inntil fisk overtok. Forsøksmusenes biologi er derfor godt kjent. Mus er små og hendige, billige i drift og i anskaffelse, de har hurtig vekst, kort generasjonsintervall, og er kommersielt tilgjengelig i alle størrelser og antall. Mus finnes i mange definerte innavlede linjer og utavlede stammer med mutasjoner (f.eks.: sukkersyke, høyt blodtrykk, fedme) Mus er blant annet godt egnet i immunologistudier, og var derfor et naturlig valg for denne oppgaven. (Hem 2004)

## 2. FORSØKET

### 2.1. BAKGRUNN FOR OG HENSIKT MED FORSØKET

Dagens vaksiner har et forbedringspotensial. Administrasjonsmåte, effekt og tid for beskyttelse, er blant områder det jobbes med å forbedre. Ved Folkehelseinstituttet har det lenge vært forsket på slimhinnevaksiner, og denne hovedfagsoppgaven er en videreføring av dette arbeidet.

Verdenshelseorganisasjon (WHO) prioriterer utvikling av vaksiner som kan gis direkte på slimhinnene. (WHO 2006) Slike vaksiner vil ha mange fordeler til en injeksjonsvaksine. I tillegg til systemisk respons, kan slimhinnevaksiner inducere en lokal og spesifikk antistoffrespons på slimhinnene. (Holmgren & Czerkinsky 2005) Dette kan være viktig for å hindre patogen å kolonisere og penetrere slimhinnene for så å gi systemisk infeksjon. Også smittespredning i befolkningen kan på denne måten reduseres. Pasient kan selv ta en slik vaksine under oppsyn av helsepersonell, og det vil ikke være behov for sterilt utstyr. (Walker 1994) Mye tyder også på at vaksineformuleringen blir enklere, og dermed billigere å produsere enn tilsvarende vaksiner for injeksjon. (Hvalbye et al. 1999) Spesielt i utviklingsland der vaksinetilgangen begrenses av mangel på helsepersonell og dårlig økonomi, vil slimhinnevaksiner være svært fordelaktige. (Walker 1994)

Pneumokokk bakterier og influensa virus er to av de viktigste patogen som rammer mennesker i dag, og det kan nettopp være deres evne til å arbeide sammen som utgjør den største trusselen mot verdens helse. (McCullers 2006) Begge disse mikroorganismene er respiratoriske patogener som koloniserer epitelceller i øvre luftveier. Normalt vil forsvaret i øvre luftveier kunne hindre pneumokokker i å nå lungene. (Salyers & Whitt 2002) Influensa virus gir sjelden lungebetennelse selv, utenom de årene det sirkulerer spesielt virulente stammer, men viruset kan legge forholdene til rette for en etterfølgende bakterieinfeksjon. I voksne, og spesielt eldre mennesker, er sekundær bakteriell lungebetennelse etter influensa, ofte årsak til død. I tillegg til epitelskade, er endringer i luftveienes funksjon, og oppregulering og uttrykking av reseptorer i luftveiene virkninger etter virusinfeksjon som trolig kan legge forholdene til rette for en sekundær bakterieinfeksjon. Mekanismene bak er mindre kjent. (McCullers 2006)

Mange av risikofaktorene for influensasykdom og alvorlig pneumokokksykdom er de samme, og det er anbefalt at disse to vaksinene gis samtidig. (Aaberge 2005) En stor klinisk studie utført i Stockholm viste at sykehusinnleggelser av eldre personer på grunn av pneumokokkpneumonier og invasive pneumokokkinfeksjoner ble redusert med henholdsvis 36 og 52 % hos de som hadde fått influensavaksine i tillegg til pneumokokkvaksine (Christenson et al. 2004)

De fleste av dagens slimhinnevaksiner består av levende, svekkede mikrober. Det ble tidlig klart at levende vaksiner kan innebære en risiko for å gi sykdom, spesielt i mennesker med svekket immunforsvar. (Haneberg & Holst 2002) Ved Folkehelseinstituttet er det vist at intranasal immunisering av ikke-replikerende vaksine mot meningokokker kan stimulere til immunrespons både i serum og lokalt på slimhinnene hos mennesker. (Haneberg et al. 1998) Forsøk ved instituttet har også vist at en enkel formulering med drepte helcelle pneumokokker, gitt i form av nasedråper, beskytter mot pneumokokkinfeksjon i mus. (Hvalbye et al. 1999)

Denne oppgaven fokuserer nettopp på pneumokokker. Effekt av inaktivert pneumokokk helcellevaksine gitt ved injeksjon eller nasedråper, vil bli undersøkt i forhold til immunrespons og beskyttelse mot sykdom etter ulike administrasjonsmåter for smitte med pneumokokker. I tillegg vil det bli sett på om vaksine mot influensa kan virke som adjuvans, eller forsterker, for pneumokokkvaksine når de gis sammen.

I.n. smittemodell med pneumokokker er ikke tidligere etablert ved folkehelseinstituttet. Dette forsøket skal bidra i etablering av metoden, samt å inkludere neseskylling etter smitte.

I pneumokokkenes cellevegg finnes flere potensielle proteinantigen som er uavhengig av serotype. Dagens pneumokokkvaksiner er basert på polysakkaridantigen mot de spesifikke serotypene. En helcellevaksine er derfor svært interessant med tanke på utvikling av en mer universal pneumokokkvaksine, samt med tanke på at barn og eldre oppnår bedre effekt av proteinantigen enn polysakkaridantigen. (Poolman 2004)

Forsøket utføres med håp om å kunne bidra til at slimhinnevaksine mot pneumokokksykdom i mennesker skal bli en realitet.

## 2.2. FORSØKSOPPSETT

### 2.2.1 Forforsøk

I samarbeid med Anders Abrahamsen, som også er hovedfagstudent ved FHI, ble det gjort et forforsøk. Hensikten med dette forforsøket var å få prøvemateriale som kunne brukes til å lage og definere standard for bruk ved ELISA analyser i hovedforsøket. Dette forsøket bestod av to grupper med seks mus i hver. De fikk vaksine av inaktivert influensavirus (INV) hhv. i.n. og s.c. Musene ble immunisert to ganger med seks ukers mellomrom. Det ble tatt salivprøver av musene tre uker etter 2. immunisering. Musene ble to dager senere tomtappet/avlivet. Forforsøket var også til stor nytte for opplæring i håndtering og prøvetaking av mus før hovedforsøk.

### 2.2.2. Hovedforsøk

Det ble brukt 48 mus i hovedforsøket. Disse ble fordelt i åtte grupper med seks mus i hver gruppe. Ikke immunisert, men smittet, kontrollgruppe ble tatt med for å vise at en i.p. smitte metoden fungerte, og for sammenligning med gruppene som fikk vaksine. Negativ kontrollgruppe var viktig for å vise at det ikke var smitte mellom burene/gruppene i isolatoren. For å begrense forsøkets størrelse, ble det ikke satt opp kontrollgruppe for i.n. smitte metode.

Vaksinene ble gitt til forsøksdyr (mus), to ganger med syv ukers mellomrom. Effekten ble målt med ELISA ("enzymmerket" mikrometode) som systemiske antistoffer (i blod) og som antistoffer lokalt på slimhinnene (i spytt). Dyrene ble deretter smittet med en pneumokokkstamme som gir sykdom hos mus. Denne administreres intraperitonealt (i.p.) eller intranasalt (i.n.).

Vaksinene ble gitt både s.c. og i.n. for sammenligning. I dette forsøket ble pneumokokk helcellevaksine benyttet alene, eller i kombinasjon med influensavaksine. Parallelt til dette forsøket har Anders Abrahamsen utført tilsvarende forsøk, der pneumokokk konjugatvaksine ble benyttet.

Alle vaksinedoseringer er valgt på bakgrunn av tidligere forsøk ved Folkehelseinstituttet. (Amundsen 2005, Ticevic 2005) Dosering for smitte med *Streptococcus pneumoniae* Type 4, er valgt på bakgrunn av samtale med veileder for denne oppgaven, Ingeborg S. Aaberge, samt tidligere forsøk. (Aaberge et al. 1995, Janakova et al. 2002) Neseskylling for bakterietelling etter i.n. smitte med pneumokokker, har ikke tidligere vært etablert på instituttet. Tilsvarende metode har derimot tidligere vært etablert for influensa. Alle prøvetidspunkt er valgt på bakgrunn av tidligere etablert smittemodell for pneumokokker. (Aaberge et al 1995) *Streptococcus pneumoniae* inokulat benyttet ved smitte var på forhånd laget ved instituttet etter standardisert metode. (Aaberge et al. 1995)

**Tabell 4:** Oppsett av de ulike gruppene i hovedforsøk.

*PnH* = inaktivert pneumokokk helcelle

*INV* = inaktivert influensavirus

*s.c.* = sub cutan

*i.n.* = intra nasal

*i.p.* = intra peritoneal

*PBS* = fosfatbufret saltvann (placebo)

Mus pr. gr.	Gr.	Grupper immunisert med:	Adm. vaksine	Adm. smitte
6	A	PnH	s.c	i.p
6	B	PnH + INV	s.c	i.p
6	C	PnH	i.n	i.p
6	D	PnH + INV	i.n	i.p
6	E	PnH	i.n	i.n
6	F	PnH + INV	i.n	i.n
6	G	Ikke.immunisert smittet kontroll	PBS s.c	i.p
6	H	Negativ kontroll for smitteforsøk	Ikke vaksine	Ikke smitte

### 2.3. PRØVER OG TIDSRAMME

Metodene for som ble benyttet i dette forsøket, er godt innarbeidet ved Folkehelseinstituttet. Dette gjelder alle metoder, med unntak av PnH ELISA. Det ble for denne analysen utarbeidet en modifisert ELISA metode pga. problemer med uspesifikk binding.

Blod- og saliva- prøver ble tatt av alle gruppene, utenom negativ kontrollgruppe, før første immunisering, tre uker etter første immunisering, og rett før smitte. I tillegg ble musene tomtappet ved avlivning. Blod- og saliva- prøvene ble analysert for hhv. IgG og IgA antistoffer rettet mot influensa og pneumokokker. Negativ kontrollgruppe var kontroll bare for smitteforsøket, og derfor ikke tatt med for ELISA analyse.

Blodprøve for bakterietelling ble tatt av alle musene 3, 12, 24 og 48 timer etter smitte.

Neseskylprøver ble tatt av de gruppene som ble smittet i.n. (Gr. E: PnH i.n. og F: PnH+INV i.n.). Dette ble gjort ett og seks døgn etter smitte.

Uke:	0	3	7	10	11
	I-----I-----I-----I-----I-----				
Vaksine:	↑		↑		
Blod:	B <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>		B <sup>3</sup>	B*
Saliva:	S <sup>1</sup>	S <sup>2</sup>		S <sup>3</sup>	S* S*
Smitte:				+	
Avslutt:					X

**Figur 5:** Tidsramme for forsøk

*B* = Blodprøve

*S* = Salivaprøve

*B\** = Blodprøver for bakterietelling.

*S\** = Neseskylning for bakterietelling

*+* = Smitte

*X* = Avslutning av forsøket med tomtapping av mus.

*1, 2, 3* = Prøve nr.

**Tabell 5:** Eksakte tidspunkt for dette forsøket

30.01-06:	Ankomst mus
07.02-06:	Øremerking
08.02-06:	Salivaprøve 1
13.02-06:	Blodprøve 1
14.02-06:	1.immunisering
06.03-06:	Blodprøve 2
07.03-06:	Salivaprøve 2
04.04-06:	2.immunisering
20.04-06:	Blodprøve 3
21.04-06:	Salivaprøve 3
26.04-06:	Smitte
	Blodprøve for bakterietelling tas 3, 12, 24 og 48 timer etter smitte
	Neseskylling for bakterietelling tas ett og seks døgn etter smitte. (Bare av gruppene som ble smittet i.n.)
02.05-06:	Tomtapping/avlivning

### 3.4. ANALYSER

Det ble utført INV ELISA analyse av blod- og saliva- prøve 1, 2 og 3. Pga. tidsbegrensninger som følge av problemer med PnH ELISA, ble det bestemt å begrense PnH ELISA analyse til blod- og saliva- prøve 3. Man får dermed bare detektert antistoffnivå etter to immuniseringer, men man kan gå ut fra at negativ kontrollgruppe også representerer nullprøve (prøve før immunisering).

Bakterietelling av prøver etter smitte ble foretatt som oppsatt.

## **3. MATERIALER OG METODER**

### **3.1. FORSØKSDYR**

Forsøket var godkjent av Forsøksdyrutvalget, og ble utført i henhold til forskrift om forsøk med dyr fastsatt av Landbruksdepartementet 15. januar 1996. Kurs i forsøksdyrlære ved Norges veterinærhøgskole ble gjennomført før start av forsøk.

#### **3.1.1 Musene**

I hovedforsøket ble det benyttet 48 mus, og i de to forforsøkene ble det benyttet 12 mus i hvert forsøk. Samtlige mus kom fra Bømholt gård, Ry, Danmark. De var spesifikk patogenfrie, innavlede mus av typen BALB/c, med alder 8.-10 uker. De ble akklimatisert i en uke før de ble benyttet i forsøk. Hunnmus ble benyttet, da de er mindre aggressive, og dermed lettere å håndtere.

#### **3.1.2. Oppstalling av musene**

Musene var oppstallet på Folkehelseinstituttets dyreavdeling, under daglig stell og oppsyn av erfarent dyrepersonale. Musene ble delt inn i grupper på 6, og hver gruppe hadde sitt bur. Musene hadde hele tiden mat (pellets av typen; SDS RMI) og drikke (springvann på flaske) tilgjengelig. Burene med 6 mus i hvert, vart stasjonert i kabinett med kontrollert temperatur (ca 20 °C) og luftfuktighet (ca. 50%). Det var lys/mørke syklus i rommene på 12 timer, og lysintensiteten var mindre enn 50 Lux. Av miljøberikelse hadde hvert bur tørkepapir og en ”hytte” av plast. Treflis ble benyttet som strø. Etter smitte ble musene oppstallet i isolator, for å beskytte omgivelsene. For å komme til dyreavdelingen må man gå gjennom en sluse som danner barriere til dyrene. I slusen ble det tatt på overtrekksdress, munnbind, hansker og hårnett, samt rene sko for bruk bare i avdelingen. Dette gjelder for alle mennesker som skal oppholde seg i dyreavdelingen.



### 3.1.3 Håndtering av musene

God håndterings teknikk er viktig for å ikke stresse musene. I tillegg til kurs i forsøksdyrlære, ble god praktisk opplæring gitt av personale i dyreavdelingen. Det ble hele tiden arbeidet med rolige, men bestemte bevegelser. Lydnivået ble holdt til et minimum. Utover i forsøket ble musene lettere å håndtere da de ble roligere, og hadde sjeldnere spontan urinering og avføring. Dette skyldtes trolig at musene ble bedre kjent med håndteringen etter hvert. S.c. immunisering samt blodprøver ble utført av dyreavdelingens personale. Det var da mitt ansvar å sørge for at riktig mus ble hentet frem til en hver tid, samt at vaksiner og prøver ble holdt orden på. Etter god opplæring ved dyreavdelingen, ble all annen håndtering av musene utført på egenhånd.

### 3.1.4. Merking av musene

Musene innen de ulike gruppene/burene ble merket individuelt ved å lage hull i ørene. Dette ble utført av dyrestallens personale etter en ukes akklimatisering. Musene ble merket slik;

Mus 1: hull oppe i venstre øre

Mus 2: hull nede i venstre øre

Mus 3: hull oppe i høyre øre

Mus 4: hull nede i høyre øre

Mus 5: hull oppe i begge ørene

Mus 6: hull nede i begge ørene

### 3.1.5. Observasjon av musene etter smitte

Etter smitte ble musene kontrollert hyppigere enn ellers. Dette for å følge med en eventuell sykdomsutvikling, og unngå unødvendig påkjenning for musene. Det ble laget et skjema hvor helsetilstand ble notert minst en gang daglig de første dagene etter smitte. I tillegg foretok personale ved dyreavdelingen flere sjekker daglig, med fullmakt til å avlive mus ved tegn til alvorlig sykdom.

### 3.2. VAKSINEDOSERINGER

Vaksine var i en stamløsning som ble fortynnet og evt. blandet til riktig forhold før bruk

PnH stamløsning med total proteinkonsentrasjon 7,25 mg/mL

INV stamløsning med total proteinkonsentrasjon 5,7 mg/mL

Den intranasale dosen var 10 ganger så høy som den subkutane dosen. Det er vist at en slik økning i mengder antigen for intranasal vaksine er nødvendig for å oppnå like sterk antistoffrespons i serum som ved parenterale vaksiner (Saunders et al.1999)

Doseringene av PnH og INV-vaksine er tidligere vist å gi god antistoffrespons både i serum og i saliva. (Amundsen 2005).

Mus som har fått to doser med seks ukers mellomrom, har i tidligere forsøk gitt boosterrespons både i serum og saliva (Gunnufsen 2001. Knapstad 2002). Samme doseringsregime ble i dette forsøket fulgt, men av praktiske årsaker i forhold til ferieavvikling ved dyrestallen, ble det valgt å gi to doser med syv ukers mellomrom. Mus som fikk kombinasjon av både INV- og PnH- vaksine fikk disse administrert samtidig ved at vaksineløsningene ble blandet og eventuelt fortynnet til fastsatt volum.

#### 3.2.1. PnH-vaksine

Det var seks mus i hver gruppe. For å få tatt ut riktig mengde av vaksine, ble det satt av til to doser i overskudd både for i.n og s.c administrasjon.

Dette gir totalt vaksinevolum per gruppe;

S.c:  $8 \times 200 \mu\text{L} = 1600 \mu\text{L}$

I.n:  $8 \times 30 \mu\text{L} = 240 \mu\text{L}$

		<b>Pneumokokk helcelle (PnH) stamløsning 7,25 µg/µL</b>		
<b>Gruppe</b>	<b>Adm.</b>	Dose per mus(µg)	Stamløsning per gruppe (6 mus) (µL)	PBS per gruppe (6 mus) (µL)
<b>A</b>	<b>S.c (200µL)</b>	5	5,5	1594,5
<b>C og E</b>	<b>I.n (30µL)</b>	50	55,2 (x2=110,4)	184,8 (x2=369,6)

### 3.2.2. Kombinasjonsvaksine PnH + INV

Vaksinevolum for i.n administrasjon blir litt større for de gruppene som skal ha kombinasjon av PnH- og INV-vaksine. Dette fordi det volumet som må til for å få riktig mengde stamløsning av de to vaksinene, i kombinasjon gir mer enn 240  $\mu\text{L}$  per gruppe. Disse fortynnes dermed ikke. Alternativt kunne stamløsningene ha blitt oppkonsentrert.

Gruppe	Komb. av; Adm.	Influenza (INV) stamløsning 5,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$		Pneumokokk helcelle (PnH) stamløsning 7,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$		PBS per gruppe ( $\mu\text{L}$ )
		Per mus ( $\mu\text{g}$ )	Stamløsning per gruppe ( $\mu\text{L}$ )	Per mus ( $\mu\text{g}$ )	Stamløsning per gruppe ( $\mu\text{L}$ )	
<b>B</b>	<b>S.c (200<math>\mu\text{L}</math>)</b>	15	21,0	5	5,5	1573,5
<b>D og F</b>	<b>I.n (33<math>\mu\text{L}</math>)</b>	150	210,4 ( $\times 2=420,8$ )	50	55,2 ( $\times 2=110,4$ )	0

### 3.2.3. Kontrollgrupper

Musene i gruppe G er ikke-immuniserte kontroller, og gis PBS 200  $\mu\text{L}$  s.c. (placebo), når de andre gruppene får vaksine. Gruppe H er kontroll bare for smittetesten, og gis derfor ikke noe.

### 3.3. TILLAGING AV VAKSINER

#### 3.3.1. PnH og kombinasjonsvaksine PnH + INV

##### Reagenser:

PnH stamløsning med total proteinkonsentrasjon 7,25 mg/mL

INV stamløsning med total proteinkonsentrasjon 5,7 mg/mL

PSB 0,01 M, pH 7,2

##### Utstyr:

Pipetter, pipettespisser (Gilson pipetter)

Rør, 15 mL (Kendall, 0002099STP)

Whirlmixer (Labinco L46)

Ultralydbad (Bandelin, Sonerex TK52)

LAF-benk (Danlaf, VFB 1206)

Tillaging av vaksine utføres i LAF-benk under aseptiske forhold.

- 1) Vaksinstamløsningene av INV og PnH ble tatt ut fra kjøleskap og satt i ultralydbad i 5 minutt for å finfordele partiklene.
- 2) Løsningen ble pipetert over i rør som på forhånd var merket med gruppe nr. (se 3.2. vaksinedoseringer). Løsningen ble fortynnet til riktig konsentrasjon med PBS. Største mengde ble tatt i først.
- 3) Rørene ble så ristet i 1 minutt på whirlmixer for å få en homogen blanding.
- 4) De ferdige vaksineløsningene ble satt i kjøleskap (4°) over natt.
- 5) Vaksine ble tatt ut fra kjøleskap i god tid før immuniseringen skulle foretas. Dette for at løsningene ikke skulle være kalde, og dermed ubehaglige for musene å få injisert.

### **3.4. IMMUNISERING**

#### **3.4.1. Intranasal immunisering**

Utstyr:

Pipetter, pipettespisser (Gilson)

Fire grupper fikk vaksine intranasalt. Vaksinen ble ristet godt før bruk for å sikre at den var homogen, og dermed at lik dosering ble gitt til hver mus. Musene ble fengslet slik at de ble liggende på ryggen. Vaksineløsningen ble påført annenhvert nesebor dråpevis med en pipette, slik at musa fikk tid til å puste inn alle dråpene. Musene som fikk PnH-vaksine, fikk 30  $\mu\text{L}$ , og de som fikk kombinasjonsvaksine av PnH og INV, fikk 33  $\mu\text{L}$ .

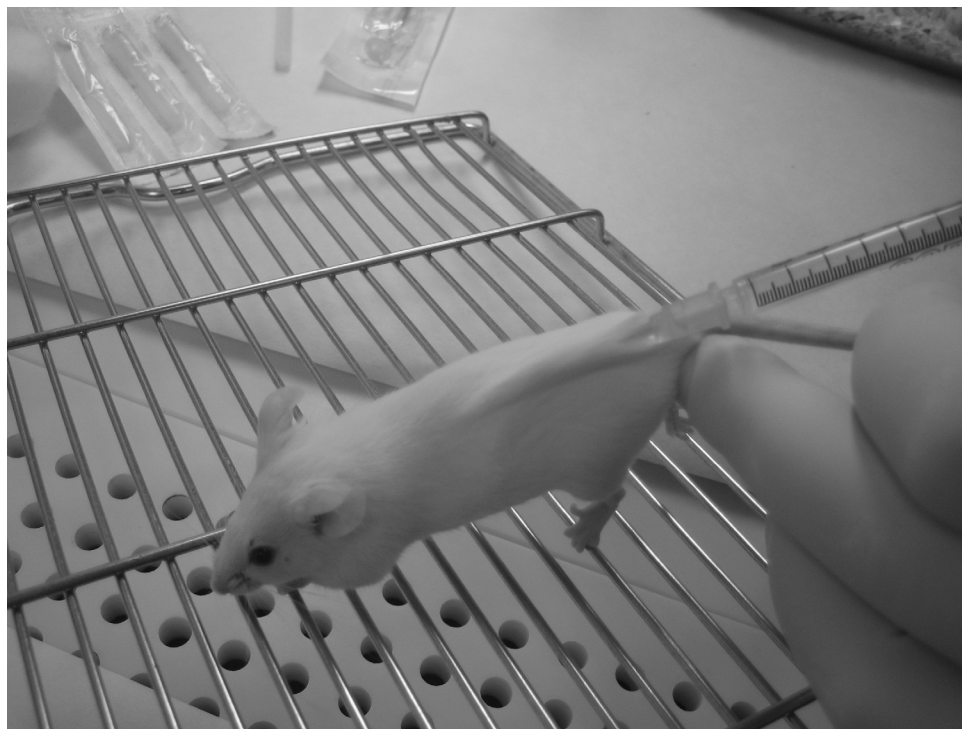
#### **3.4.2. Subcutan immunisering**

Utstyr:

Kanyler, 25G

Engangssprøyter, 1 mL

Tre grupper fikk vaksine subcutant. Vaksinen ble ristet godt før bruk for å sikre at den var homogen, og dermed at lik dosering ble gitt til hver mus. Injiseringen ble utført av dyreavdelingens personale. Musene ble strekt ut ved at de klorete seg fast i burlokket med forlabbene, samtidig som de ble holdt i halen. Vaksinen (200 $\mu\text{L}$ ) ble injisert subkutant i nedre del av ryggen.



*Bilde 1: subcutan immunisering*

### 3.5. PRØVETAKING OG PREPARERING AV PRØVENE

#### 3.5.1. Salivaprøver

##### Reagenser:

Nylaget 1 mg/mL Pilocarpin hydroklorid

Pilocarpine hydrochloride (Sigma-Aldrich, P6503)	0,015 g
PBS 0,01 M, pH = 7,2	15,0 mL

##### Utstyr:

Tusj (til å merke av plass for mus nr. på benkepapir)

Plastbelagt benkepapir (Polytrap 295 PE, Schleicher & Schuell)

Petriskåler, 9 cm

Metallgitter, 11 x 11 cm

Plastkopp med pustehull

Veker, 2mm x 25 med mer (Polywicks, Polyfiltronics Group Inc., USA)

Eppendorfrør, 1,7 mL (Axygen, MTC-175-C, sterile)

Kanyler, 25G (Braun Sterican, 0,50 x 16 mm)

Engangssprøyter, 1 mL (BD plastipak)

Pinsetter (1 pinsett per gruppe, evt vask med sprit mellom hver gruppe)

Isoporkasse med is

Vekt (Mettler AE240)

20 merkede eppendorfrør med to veker i var veid på forhånd, og gav en gjennomsnittsvikt på 0,9978 g per rør med to veker. Dette for å kunne regne nettomengde av saliva fra hver mus etter prøvetaking. Det ble samlet saliva fra en gruppe (6 mus) om gangen.

Musene ble satt på hver sin merkede plass på et metallgitter med en petriskål under, og en plastkopp over (bilde). Hver mus fikk 0,20 mL pilokarpin 1 mg/mL injisert intra peritonealt (i.p), for å øke spyttsekresjonen. Absorbsjonsveker ble benyttet til å samle opp saliva fra munn, petriskål, metallgitter og plastkopp. To absorbsjonsveker med salivaprøve fra hver mus, ble så overført til på forhånd merkede eppendorfrør, og satt direkte på is. Hvert eppendorfrør med prøve ble veid før de ble satt på fryserom (-20 °C) til videre ekstrahering og analysering.



**Bilde:** Salivaprøvetaking.  
Mus oppstilt på avmerket plass  
over en petriskål.



**Bilde:** Salivaprøvetaking.  
Salivaprøver ble samlet med absorpsjonsveker.

### 3.5.2. Preparering av salivaprøver

#### Reagenser:

PBS med 0,05 % Tween 20, pH = 7,2 (ekstraksjonsbuffer)

#### Utstyr:

Kanyler, 25 G (Braun Sterican, 0,50 x 16 mm)

Oppsamlingsrør (sentrifugerør)

Kryorør, 2 mL, sterile (Greiner bio-one)

Whirlmixer (Labinco L46)

Gassbrenner (FireboyPlus, Integra Biosciences)

Sentrifuge (KS-5200C, Kubota)

Salivaprøvene ble tatt opp fra -20°C, og hvert eppendorfrør ble tilsatt 400 µL ekstraksjonsbuffer. To og to rør ble ristet kraftig på whirlmixer i ett minutt. En kanyle ble brent av med gassflamme, og den glødende kanylen ble brukt til å stikke ett hull i bunnen av hvert eppendorfrør mens det ble holdt opp ned. Eppendorfrørene ble umiddelbart satt i hvert sitt oppsamlingsrør. Alle prøvene ble så sentrifugert ned ved 2500 rpm i 10 minutter. Prøvene ble overført fra oppsamlingsrørene til på forhånd merkede kryorør, og oppbevart ved -20°C inntil analysering.



### 3.5.3. Blodprøver

#### Utstyr:

Varmelampe

Skalpellblad (Paragon, No. 22)

Kanyler, 0,80 x 40 mm (BD Microlance 3)

Fengslingsrør

Vitrex kapillærrør, Na-hepariniserte 80IU/mL, 2,30 x 75 mm

Gummiballong

Eppendorfrør, 1,7 mL (Axygen, MTC-175-C, sterile)

Blodprøve av musene ble tatt fra leggvene. Musene ble plassert under en varmelampe i noen minutter før prøvetakingen. Dette for å utvide blodårene, slik at selve prøvetakingen skulle gå lettere og raskere. Dyreavdelingens personale tok selve venepunksjonen. Musene ble holdt i fengslingsrør under prøvetakingen. Leggen hvor blodprøven ble tatt, ble barbert med skalpellblad før det ble stukket hull i leggvnen ved hjelp av kanyle. Blodet ble så samlet i hepariniserte kapillærrør (to ikke fulle rør per mus), før det videre ble tatt over i merkede eppendorfrør ved hjelp av gummiballong. Preparering av prøvene ble utført etter noen timer.

En blodprøve fra mus skal maks være 7.7 mL/kg. (Smith 2004) For en voksen mus av typen BALB/c vil det tilsvare en blodprøve på ca 200 µL. Det ble i dette forsøket tatt i underkant av 200 µL blod av hver mus per prøvetidspunkt.

### 3.5.4. Preparering av blodprøver

#### Utstyr:

Sentrifuge (Heraeus Instruments, Biofuge 13)

Fryserør (Sarstedt, Mikro-Schraubrohre 0,5 mL, PP)

Pipette, pipettespisser (Gilson pipetter)

Prøvene stod noen timer i romtemperatur, før de ble sentrifugert i 10 minutter ved 3000 rpm. Ved sentrifugering blir plasma skilt fra blodcellene. Plasma ble så pipettert over på fryserør som var merket på forhånd. Prøvene ble så oppbevart ved -20 °C inntil analysering.

### 3.5.5. Tomtapping og avlivning

#### Utstyr:

Sprøyter, 2 mL (BD Plastipak)

Kanyler, 0,80 x 40 mm (BD Microlance 3)

Eppendorfrør, 1,7 mL (Axygen, MTC-175-C, sterile)

Saks

Pinsett

CO<sub>2</sub>-gassbeholder

Kanylebøtte

Isolator med sluse til sikkerhetsbenk (ClanLAF, VBF 1206 BS)

Tomtappingen ble utført i sikkerhetsbenken knyttet til isolatoren hvor musene var oppstallet etter smitte. Dette for å beskytte personale mot smitte. Dyreavdelingens personale foretok selve prøvetakingen.

Musene ble fullstendig bedøvet, tre om gangen, med CO<sub>2</sub>-gass i en kanylebøtte. Pelsen på brystkassen ble så klippet opp ved hjelp av saks og pinsett, før en sprøyte ble stukket inn i hjertet (Kanylen ble stukket inn over andre ribbeben). Blodet ble trekt ut mens hjertet fortsatt slo. Blodet fra hver mus ble overført til på forhånd merkede eppendorfrør. Det ble tappet ca. 1,5 mL blod fra hver mus. Musene dør straks etter denne prøvetakingen.

Preparering av prøvene ble utført som for de andre blodprøvene.

### 3.6. SMITTE AV MUS

#### 3.6.1. Tillaging av bakterieløsning

##### Reagenser:

Buljong: Todd Hewitt Oxoid

Bakterier: Streptococcus pneumoniae Type 4 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL)

Kultur laget ved FHI: 11/9-1992. (Fryst ved midtlogaritmisk vekstfase,  $-70$  °C)

Internt navn ved FHI: 7/87

Internasjonalt navn: TIGR4

(Aaberge et al., 1995)

##### Utstyr:

Whirlmikser (Labinco L 46)

Pipette, pipettespisser (Gilson pipetter)

Plastrør med skrukork, 15 mL

Plastrør med skrukork, 50 mL

Fortynningsrør (Ellemannrør 2,5 mL, plast)

Inkubator ( $37$  °C)

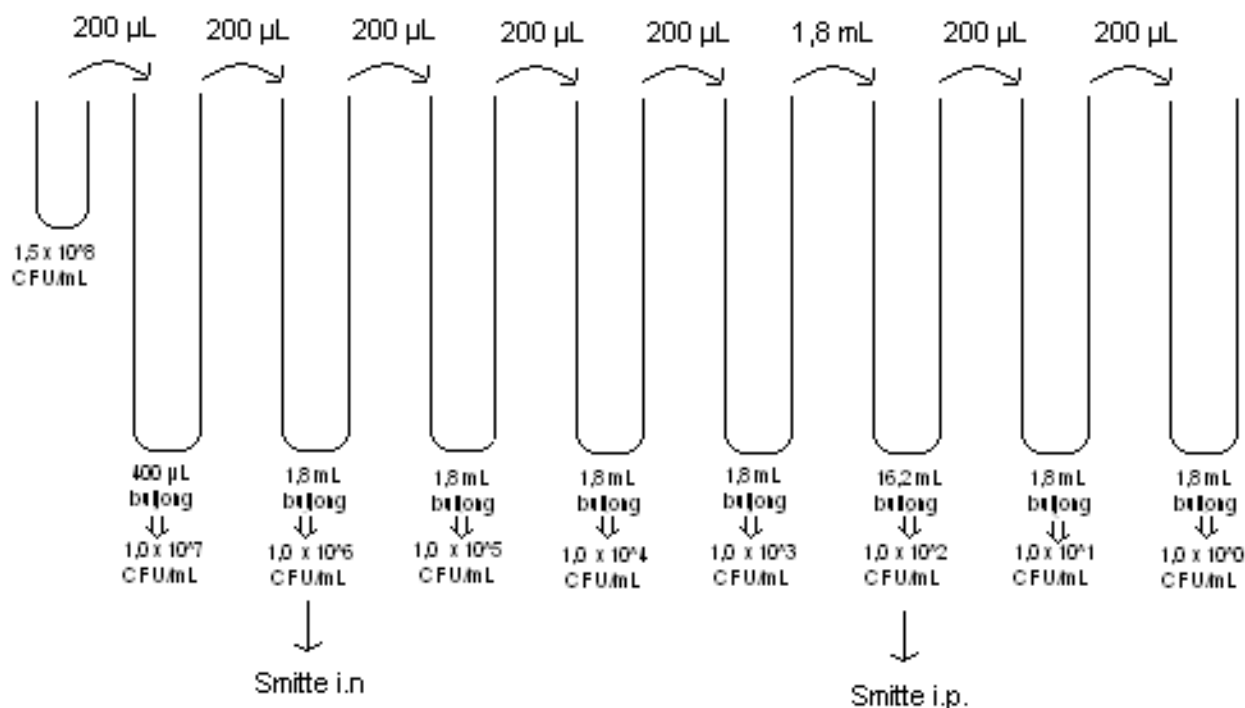
I forkant av smitteforsøket ble det utført en bakterietelling, slik at konsentrasjon i utgangsrøret kunne bekreftes. Den ble funnet til å være  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL.

Selve bakteriefortynningen ble foretatt rett før smitte som vist i figur. Buljongen ble tatt ut fra fryserom dagen før fortynningen, for å bli romtemperert slik at bakteriekulturens virulens og antall CFU/mL skulle bevares. Før fortynning ble buljong fylt i fortynningsrør til  $400\mu\text{L}$  i ett rør,  $1,8$  mL i seks rør, og  $16,2$  mL i ett rør. Dette for å kunne utføre fortynningsrekke, frem mot ønsket konsentrasjon for bruk ved smitte, på en enkel måte.

Bakteriekulturen var på forhånd dyrket frem ved instituttet. Midt-logaritmisk vekstfase ble funnet ved hjelp optisk tetthet, og bakteriekultur ble da umiddelbart tatt over på  $1$  ml rør og fryst ved hjelp av flytende nitrogen i fem minutter. Videre ble røret fryselagret ved  $-70$  °C inntil bruk. Dette var utført etter standardisert metode. (Aaberge et al. 1995)

Tining av bakteriekultur ble gjort raskt, umiddelbart før bruk, ved gni røret mellom hendene. Først ble bakteriekulturen fortynnet 1/3, deretter ble det utført 10-folds fortynninger mellom hvert rør. 200  $\mu\text{L}$  ble overført mellom hvert rør, med unntak for røret som skulle brukes ved i.p. smitte der det trengtes ekstra stort volum. Rørene ble blandet godt på whirlmikser mellom fortynningene.

100  $\mu\text{L}$  av hver av de tre siste fortynningene ble sådd ut på blodagar, og inkubert ved 37  $^{\circ}\text{C}$  over natt. Bakterietelling dagen etter smitte gav dermed en ekstra kontroll på at doseringen gitt til musene stemte.



**Figur 6:** Fortynning av bakteriekultur før smitte.

### 3.6.2. Smitte av musene med pneumokokker

Alle musene med unntak av negativ kontrollgruppe ble smittet med pneumokokker. Musene ble smittet gruppevis i sikkerhetsbenk med sluse til isolator, hvor musene ble oppstallet i tiden etter smitte. I.p. dosering ble valgt ut fra tidligere erfaring ved Folkehelseinstituttet. (Aaberge 1995) Doseringen for i.n. smitte i dette forsøket var lavere enn det som tidligere har vært brukt ved instituttet. (Janakova et al. 2002) Negativ kontrollgruppe ble sluset direkte til isolator.

Rapportskjema for hver mus ble laget. Her ble observert helsestatus, i form av frisk, syk eller død/avlivet, beskrevet minst en gang daglig de første dagene etter smitte. Musene ble under hele forsøket observert flere ganger daglig av dyrestallens personale, som også fikk i oppgave å avlive mus som ble alvorlig syke.

**GRUPPE:** \_\_\_\_\_

Mus / Tid	Smitte	T3	T12	T24	T48	Tomtapp.
1						
2						
3						
4						
5						
6						

*Figur 7: Rapportskjema for observert helsestatus etter smitte*

### 3.6.3. Intraperitoneal smitte av musene

Reagenser:

Bakterieløsning

Utstyr:

Sprøyter, 1 mL (BD)

Kanyler, 0,5 x 16 mm (BD)

Isolator med sluse til sikkerhetsbenk (ClanLAF, VBF 1206 BS)

Musene i disse gruppene ble smittet i.p.;

A: PnH s.c.

B: PnH+INV s.c.

C: PnH i.n.

D: PnH+INV i.n.

G: Positiv kontrollgruppe

En og en gruppe ble smittet i.p. Dosering var 0,5 mL av rør med  $1,0 \times 10^2$  CFU/mL. Dette gir 50 bakterier (CFU) per mus.

#### 3.6.4. Intranasal smitte av musene

##### Reagenser:

Ketamin 10 mg/mL (Ketalar®, Pfizer)

Bakterieløsning

##### Utstyr:

Sprøyter, 1 mL (BD)

Kanyler, 0,5 x 16 mm (BD)

Pipette, pipettespisser (Gilson pipetter)

Isolator med sluse til LAF-benk (ClanLAF, VBF 1206 BS)

Musene i disse gruppene ble smittet i.n.;

E: PnH i.n.\*

F: PnH+INV i.n.\*

Først ble alle seks musene i en gruppe anestisert med ketamin (50 µL/mus) i.p. Doseringen ble bestemt ut fra tidligere erfaring ved dyrestallen. I løpet av ett minutt kunne man se at musene ble sløve. Dette gjorde at musene pustet roligere, og dermed lettere fikk i seg bakteriene for smitte. En og en mus ble smittet med pneumokokker ved at 30 µL av bakterieløsningen dråpevis ble påført musens nesebor med en pipette.

I.n. dosering var 30 µL av rør med  $1,0 \times 10^6$  CFU/mL. Dette gir  $3 \times 10^4$  bakterier per mus.

### 3.7. PRØVETAKING ETTER SMITTE FOR BAKTERIETELLING

#### 3.7.1. Blodprøver etter smitte

##### Reagenser:

Buljong (Todd Hewitt Oxoid) (225 µL ble fylt i hvert fortynningsrør dagen før prøve)

##### Utstyr:

Skalpellblad (Paragon, No. 22)

Kanyler, 0,80 x 40 mm (BD Microlance 3)

Fengslingsrør

Vitrex kapillærrør, Na-hepariniserte 80IU/mL, 2,30 x 75 mm, 130µL

Gummiballong

Buljongrør til fortynning (Ellermannrør, 3,5 mL, plast)

Plastøse (NUNC)

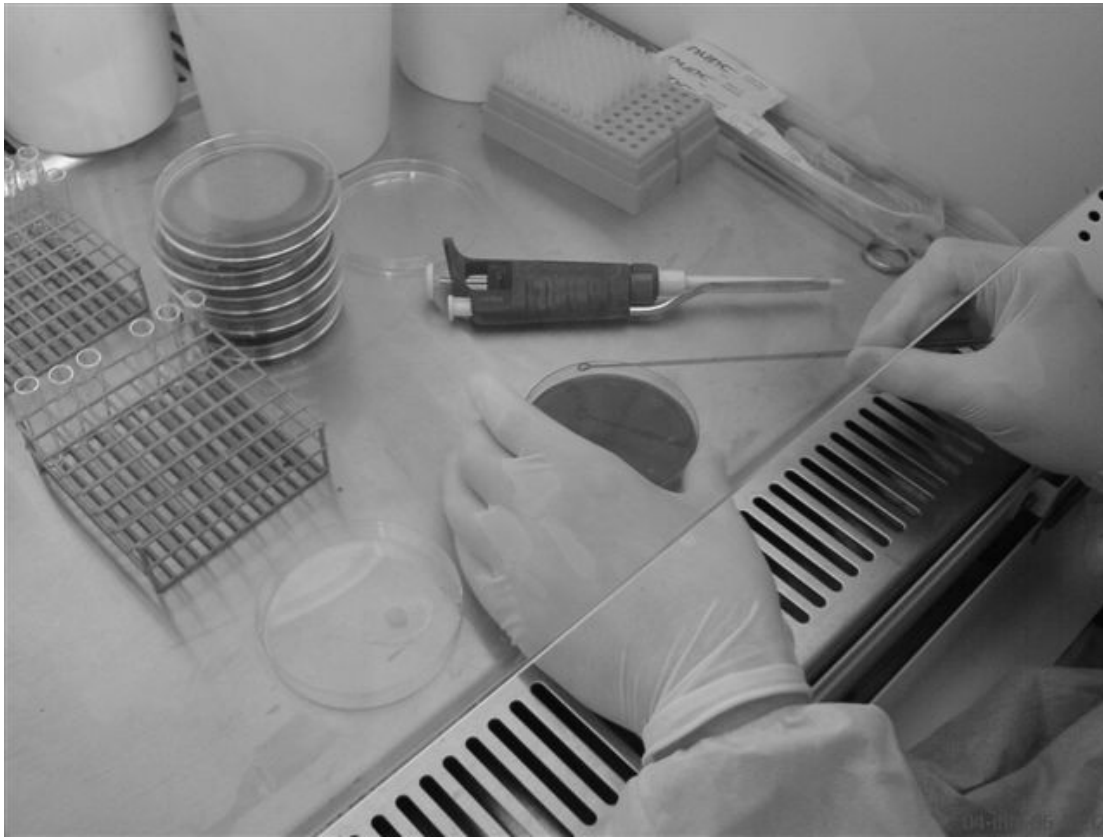
Blodagarskåler (Colombiaagar med hesteblood)

Inkubator (37°C)

Isolator med sluse til LAF-benk (ClanLAF, VBF 1206 BS)

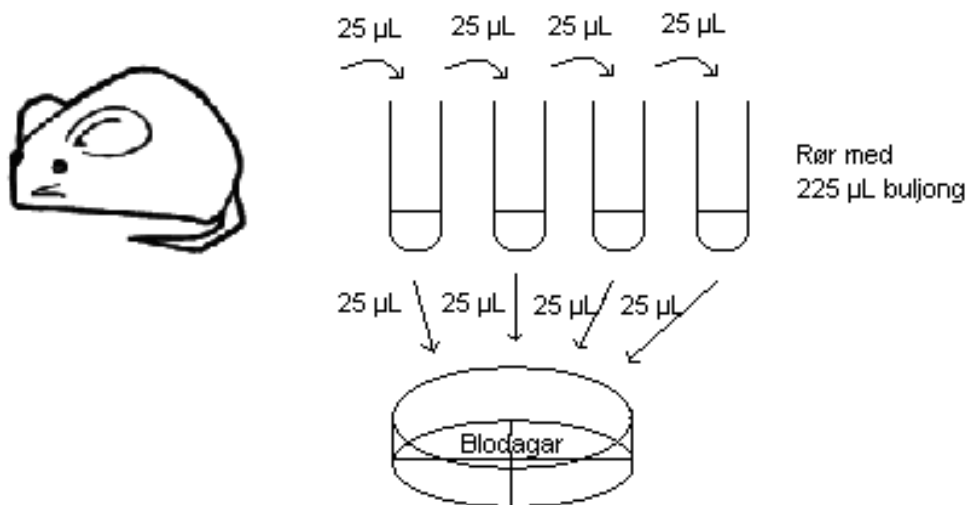
Arbeidet ble utført i sikkerhetsbenk knyttet til isolatoren. Blodprøvene ble tatt 3, 12, 24 og 48 timer etter smitte. Prøvevolumet ble begrenset til ca 25 µL siden prøvetidspunktene var så nærme hverandre. Fortynningsrør ble tilsatt 225 µL buljong dagen før prøvetaking, og stod kjølig inntil bruk.

Dyreavdelingens personale tok selve venepunksjonen. Musene ble holdt i fengslingsrør under prøvetakingen. Leggen hvor blodprøven ble tatt, ble barbert med skalpellblad før det ble stukket hull i leggvenen ved hjelp av kanyler. Blodet ble samlet i Na-hepariniserte kapillærrør (ca 25 µL per mus), før det videre ble de tatt over i rør med buljong ved hjelp av gummiballong.



**Bilde 4:** Fortynning av serumprøve etter smitte.

En 10-folds fortynning ble utført av hver prøve med fire fortynninger. Det ble blandet godt mellom hver fortynning ved å pipettere opp og ned noen ganger. 25  $\mu\text{L}$  av hver fortynning ble så dyrket på blodagarskål. Skålene var på forhånd delt i fire, og merket med fortynning, gr., mus nr., dato og prøvetidspunkt. Skålene ble så innkubert i minimum 18 timer ved 37°C, før bakterietelling.



**Figur 8:** Fortynning av blodprøve etter smitte.



### 3.7.2. Neseskylling etter smitte

#### Reagenser:

Væske til neseskylling (2 % BSA i PBS ble laget dagen før prøve, og satt i kjøleskap)

Albumin, bovine (Sigma-Aldrich, A-9647) (=BSA)	0,8 g
PBS 0,01 M, pH = 7,2	ad 40 mL

Buljong (Todd Hewitt Oxoid)

#### Utstyr:

Petriskåler, 9 cm

Engangssprøyter, 1 mL

Buljongrør til fortykning (Ellermannrør, 3,5 mL, plast)

Plastøse (NUNC)

Blodagarskåler (Colombiaagar med hesteblood)

Inkubator (37°C)

Isolator med sluse til sikkerhetsbenk (ClanLAF, VFB 1206 BS)

Bare de musene som ble smittet i.n. ble tatt neseskylling på (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*).

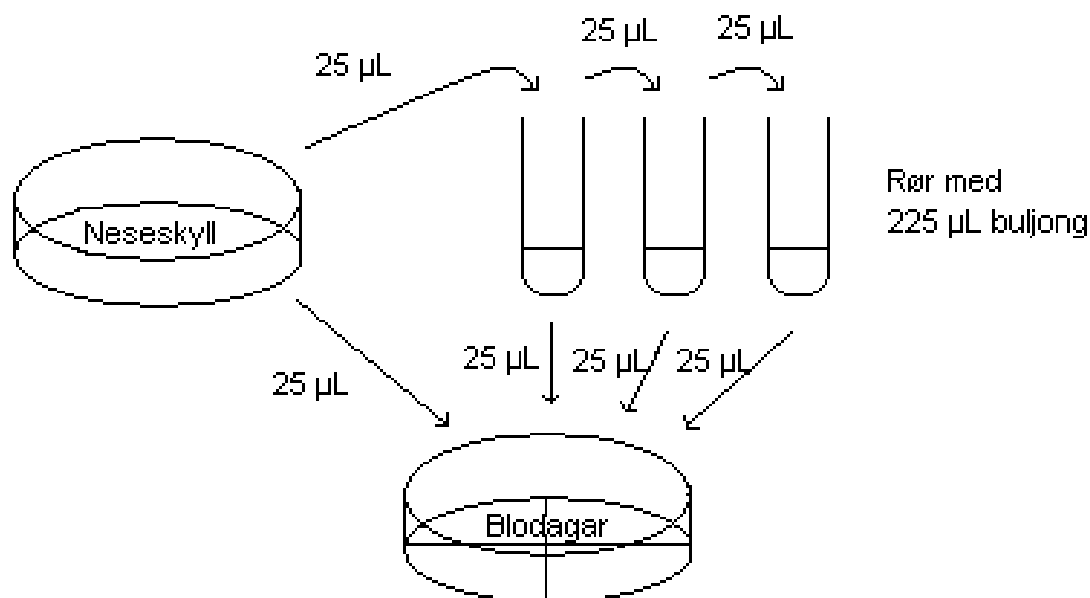
Arbeidet ble utført i sikkerhetsbenk knyttet til isolatoren.



*Bilde 5: Neseskylling*

En og en mus ble holdt stramt i nakkeskinnet og halen, og holdt på ryggen, slik at hodet vendte ned, over en tom petriskål. Skyllvæske (0,5 ml per mus) ble påført musens munn dråpevis med en 1 mL sprøyte. Den første dråpen ble plassert i munnen slik at musen puster gjennom nesa. Resten av skyllvæsken ble så sprutet i jevnt tempo gjennom munn. Man kunne da se at skyllvæsken kom ut av musens nese, og samlet seg i petriskålen. Neseskyllvæsken ble så sugd opp og ned med sprøyten noen ganger, for å blande den godt, da noen dråper vil kunne falle direkte fra munnen.

25  $\mu$ L ble pipetert ut, og sådd ufortynnet på blodagar. 25  $\mu$ L ble tatt fra petriskål over i rør med 225  $\mu$ L buljong. Fortynningsrør var tilsatt 225  $\mu$ L buljong dagen før prøvetaking, og stod kjølig inntil bruk. En 10-folds fortynning ble utført av hver prøve med tre fortynninger. Hver fortynning ble blandet godt ved hjelp av pipette før videre overføring. Fortynningene ble så dyrket på blodagar. Skålene var delt i fire, og merket med fortynning, gr., mus nr., dato og prøvetidspunkt på forhånd. Skålene ble så inkubert i minimum 18 timer ved 37 °C, før bakterietelling.



**Figur 9:** Fortynning av neseskyll etter smitte.

### 3.7.3. Bakterietelling og utregning av CFU/mL prøve

Etter at prøvene og fortynningene hadde vært innkubert i minimum 18 timer, ble koloniformende enheter (CFU) bestemt ved å telle kolonier på skåler. Skålene var delt i fire, og det var satt på 25  $\mu\text{L}$  prøve med 10-folds fortynning mellom hver. Den fortynningen som inneholdt mellom 10 og 100 CFU var lettest å telle nøyaktig, og ble dermed valgt som representant for hver enkelt prøve.

25  $\mu\text{L}$  blodprøve var fortynnet fire ganger med 10-folds fortynninger, så avhengig av hvilken fortynning som brukt, ble CFU multiplisert følgende for å gi antall CFU/mL blod.

$4 \times 10^2$  for første fortynning

$4 \times 10^3$  for andre fortynning

$4 \times 10^4$  for tredje fortynning

$4 \times 10^5$  for fjerde fortynning

Ved bakterietelling etter blodprøve var dermed  $4 \times 10^2$  CFU/mL blod, laveste verdi som kunne telles.

25  $\mu\text{L}$  neseskylt ble sådd ut direkte før tre 10-foldsfortynninger ble utført. Dermed må CFU for neseskylt multipliseres med følgende for å gi antall CFU/mL prøve.

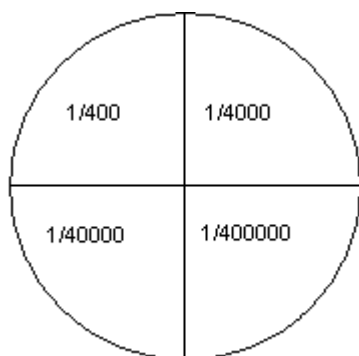
$4 \times 10^1$  for prøve

$4 \times 10^2$  for første fortynning

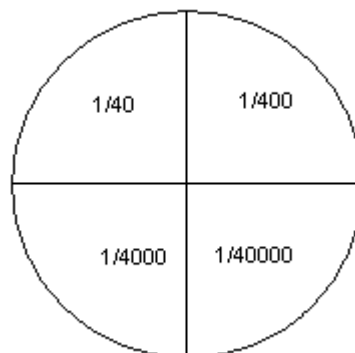
$4 \times 10^3$  for andre fortynning

$4 \times 10^4$  for tredje fortynning

Ved bakterietelling etter neseskylt var dermed  $4 \times 10^1$  CFU/mL laveste verdi som kunne telles.



**Figur 10:** Blodprøve fortynning



**Figur 11:** Neseskylt fortynning

### 3.8 ANALYSE AV PRØVEMATERIALE

For å sjekke immunresponsen musene fikk etter immunisering ble indirekte ELISA-analyse benyttet. Denne analysemetoden detekterer antistoffer i prøver. I denne oppgaven ble det analysert for systemiske antistoffer (IgG i blod) og antistoffer lokalt på slimhinnene (IgA i spytt).

#### 3.8.1. Prinsipp for indirekte ELISA

##### 1. Coating (\*)

Antigen, som er spesifikke mot de antistoffene som skal detekteres fra prøvene, blir satt på microbrønnplatene.

##### 2. Vasking

Platene vaskes med vaskebuffer for å fjerne ubundne antigen.

##### 3. Blokkering

Blokkeringsbuffer (proteiner) tilsettes for å fylle opp eventuelle tomrom, der antigen ikke har bundet seg. Dette er viktig for å hindre uspesifikk binding. Noen ganger tilsettes "blokkeringsbuffer" i fortykning av prøver og standard istedenfor direkte i brønnene.

##### 4. Vasking

Ubundet blokkeringsbuffer fjernes med vaskebuffer.

##### 5. Prøve (Y)

Prøve påsettes, og eventuelt antistoff mot antigenet binder seg.

##### 6. Vasking

Ubundet antistoff vaskes bort med vaskebuffer.

##### 7. Konjugat (E-Y-E)

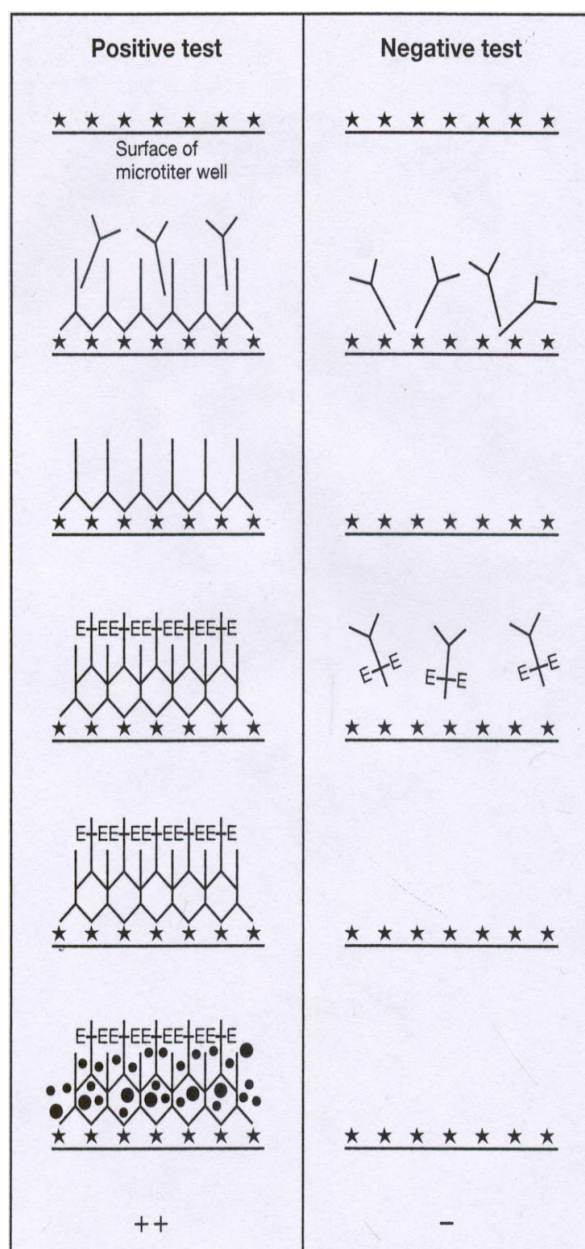
Et enzymkonjugert sekundært antistoff som binder seg til antistoffene i prøvene blir påsatt.

##### 8. Vasking

Vaskebuffer fjerner ubundet enzymkonjugert antistoff.

##### 9. Substrat

Substrat for enzymene blir tilsatt, og gir fargereaksjon som er proporsjonal med antistoffkonsentrasjonen i prøve.



**Figur 12:**

Prinsipp for indirekte ELISA.  
(Madigan et al. 2003)

### 3.8.2. Tillaging og definering av standarder

Saliva- og blod- prøver analyseres for antistoffer ved indirekte ELISA. Det er da nødvendig med en standardkurve som viser sammenheng mellom absorbanse (OD-verdi) og antistoffkonsentrasjon. En slik standardkurve ble laget ved å bruke standardløsninger med antistoff rettet mot samme antigen som vaksinene.

Saliva standardene ble laget fra prøver som var igjen fra tidligere forsøk ved Folkehelse instituttet (Amundsen 2005, Ticevic 2005). Salivaprøvene ble definert etter IgA-konsentrasjonen, siden antistoffer i IgA-klassen er dominerende i sekreter.

Blod INV standard ble dannet av prøver fra forforsøk, og serum PnH standard fra tomtapping av forsøk som ble kjørt parallelt til dette. (Abrahamsen 2006) Blodprøvene ble definert etter konsentrasjonen av IgG, som er den viktigste antistoffklassen i blodet.

Prøver med forventet høyt innhold av antistoff, ble analysert ved hjelp av ELISA. De prøvene som gav høye OD-verdi, ble så blandet sammen til en pool-løsning. Denne pool-løsningen ble kjørt i ELISA-analyse med fortynningsrekke, for å kunne finne passende startfortynning til standard, og definere startkonsentrasjon (U/mL). Ved definering av standard tas det utgangspunkt i fortynningen som gir OD-verdi nærmest 0,2. Antistoffmengden i den brønnen med beste fortynning, settes lik 1U.

#### Følgende museprøver ble valgt ut til å lage pool-løsninger:

INV IgG: Forforsøk (s.c. vaksine)	Mus 4, 5 og 6.
INV IgA: Tidligere forsøk (salivaprøve II)	Amundsen: Mus C1, C2, C5, Ticevic: Mus C2, C6.
PnH IgG: Parallelt forsøk (tomtapping)	Mus gr. A 1-6, og B 1-6.
PnH IgA: Tidligere forsøk (salivaprøve)	Amundsen: saliva II: A1, A3, A4, A5, A6, Ticevic: saliva I: A3, Ticevic: saliva II: A3, A6.

Informasjon om startkonsentrasjon av standard, og fortynningsrekke av standard og prøve, settes inn i dataprogram for ELISA avleser. Programmet vil da bruke dette, i tillegg til OD-verdi, for utregning av konsentrasjonen av antistoff i prøvene. Startfortynning av prøvene ble valgt etter å ha prøvd hva som samsvarte best med standard. Flest mulig OD-verdier i prøvefortynningen bør komme innenfor spekteret av OD-verdier i fortynningsrekken av standard.

Startfortynningen av prøvene:

Salivaprøvene (INV) 1:10

Serumprøvene (INV) 1:400

Salivaprøvene (PnH) 1:10

Serumprøvene (PnH) 1:100

Startfortynning av standardene:

Standard for antistoff rettet mot influensa (INV) i serum: (1:200) (640 U/mL)

Standard for antistoff rettet mot influensa (INV) i saliva: (1: 5) (40 U/mL)

Standard for antistoff rettet mot pneumokokker (PnH) i serum: (1:200) (640 U/mL)

Standard for antistoff rettet mot pneumokokker (PnH) i saliva: (1: 5) (20 U/mL)

### 3.8.3. Generelt oppsett av ELISA-plate

I rad A kolonne 1-11 ble det tilsatt 200  $\mu\text{L}$  av hhv standard og prøve. De resterende brønnene ble fylt med 100  $\mu\text{L}$  blokkeringsbuffer. Standard og prøver ble så fortynnet 2-folds ved å overføre 100  $\mu\text{L}$  fra rad A(1-11) til neste rad, og videre nedover ved hjelp av gaffelpipette. Mellom hver rad ble løsningen i brønnene godt blandet ved å ta den opp og ned av pipetten syv ganger. For å få likt volum i alle brønnene ble 100  $\mu\text{L}$  fra rad H kolonne 1-11 kastet ut etter fortynning. Kolonne 12 blir tatt med for å kunne justere for bakgrunnsfarge.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	BL
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
C	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
G	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	BL

**Figur 13:** Generelt oppsett av ELISA-plate

*P* = Prøve

↓ = Fortynning (2-folds)

*BL* = Blokkeringsbuffer

*Std* = Standard

Ved coatingen ble det laget noen plater uten coat på rad H. Disse ble benyttet ved innstilling av standard. Noen prøver ble satt på her, i tillegg til en annen rad med coat. Dette for å sikre at platene som ble brukt i analysen ikke gav uspesifikk binding til platen.

### 3.8.4. ELISA-metode benyttet for bestemmelse av INV-antistoffkonsentrasjon

#### Reagenser:

- Coat: Vaksinstamløsningen (INV-antigen, konsentrasjon 5700µg/mL)
- Vask: Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20 uten Ca og Mg, pH = 7,2
- Blokkering: Skim milk powder (Oxid, LP0031, Hampshire, England)
- Konjugat: Peroksydase-konjugert geit anti-mus IgG (Sigma-Aldrich, A-9309) eller Peroksydase-konjugert geit anti-mus IgA (Sigma-Aldrich, A-4789)
- Substrat: OPD- (ortho-Phenylenediamine Dihydrochloride) tabletter (Sigma-Aldrich, P-6912)
- Katalysator for substrat: Hydrogenperoksid 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 1.2201-250)
- Stoppløsning: Svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1,25 M (FH, 0502037)
- PBS 0,01 M, pH = 7

#### Utstyr:

- Mikrotestplate, maxisorp. (Nunc-immunoplate 439454)
- ELISA-vasker (Skan Washer 300 version B, Molecular Devices)
- Plastrau til reagenser ved bruk av multikanalpipette
- Pipetter og pipettespisser (Gilson pipetter)
- Reagensrør (Ellermannrør, 3,5 mL, plast)
- Målesylindere
- Erlenmeyerkolber
- Tape til forsegling av plate (Tamro)
- Whirlmixer (Labinco L46)
- Inkubatorskap (37°C, Termaks)
- ELISA avleser (Emax, Molecular Devices)
- Magnetrorer og magnet



### 1. Coating

Antigen spesifikke mot de antistoffene som skulle detekteres fra prøvene, ble satt på microbrønnplatene.

Vaksinestamløsningen (INV-antigen, konsentrasjon 5700 $\mu$ g/mL) ble fortynnet 1:285 med PBS. Dette gav 40  $\mu$ L vaksinestamløsning i 11360  $\mu$ L PBS. Konsentrasjon på coateløsningen ble da 20  $\mu$ g/mL INV-antigen.

100  $\mu$ L av coateløsningen ble tilsatt hver brønn på ELISA-platene. Noen få plater ble ikke coatet i rad H. Disse brønnene ble tilsatt 100  $\mu$ L PBS. Platene uten coat på rad H, ble brukt ved innstilling av standard, som en kontroll på at det ikke var uspesifikk binding til platene. Platene ble forseglet, før de ble satt på kjølerom (4°C) inntil bruk. (ca. to måneders holdbarhet)

### 2. Vasking

Platene ble vasket med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, fem ganger, for å fjerne antigen som ikke hadde bundet seg til brønnene på mikrobrønnplatene.

### 3. Blokkering

Blokkeringsbuffer (proteiner) ble tilsatt for å fylle opp eventuelle tomrom, der antigen ikke hadde bundet seg. Dette er viktig for å hindre uspesifikk binding.

Skummet melkepulver løst i PBS ble brukt som blokkeringsbuffer.

Blokkeringsbufferen (5%) ble laget ved å veie opp ønsket mengde for utblanding i PBS (5:100). Blandingen ble satt på magnetrører i 1 time, og deretter 30 min i romtemperatur før bruk. Holdbar i 2 dager i kjøleskap.

200  $\mu$ L blokkeringsbuffer ble tilsatt hver brønn. Platene med blokkeringsbuffer ble satt i inkubatorskap (37°C) i 1 time og deretter 30 minutter i romtemperatur før vask.

### 4. Vasking

Platene ble vasket med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, fem ganger for å fjerne blokkeringsbuffer som ikke har bundet seg til brønnene på mikrobrønnplatene.

## 5. Prøve

Fortynnet prøve og standard ble påsatt, og eventuelt antistoff mot antigenet i coaten bindes. Prøver og standarder ble fortynnet i blokkeringsbufferen.

### Startfortynningen av prøvene:

Salivaprøvene 1:10

Blodprøvene 1:400

### Startfortynning av standardene:

Standard for antistoff rettet mot influensa (INV) i blod: (1:200) (640 U/mL)

Standard for antistoff rettet mot influensa (INV) i saliva: (1: 5) (40 U/mL)

200 $\mu$ L fortynnet prøve ble tilsatt i brønnene A2-A11. (+ evt rad H)

200 $\mu$ L standard ble tilsatt i brønn A1. (+ evt. rad H)

Resterende brønner ble fylt med 100  $\mu$ L blokkeringsbuffer.

Prøver og standarder ble fortynnet (2-folds) ved å overføre 100  $\mu$ L fra en brønn til den neste i kolonnen ved hjelp av gaffelpipette. 100  $\mu$ L fra siste brønn ble kastet, for at volum i alle brønnene skulle bli likt. Platene ble så forseglet og satt i kjølerom (4°C) over natt.

## 6. Vasking

Platene ble vasket i fem omganger med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, for å fjerne ubundet antistoff.

## 7. Konjugat

Som konjugat ble det brukt peroksidase-konjugert geit anti-mus IgA til påvisning av IgA i salivaprøvene, og peroksidase-konjugert geit anti-mus IgG til påvisning av IgG i blodprøvene. Dette er enzymkonjugerte sekundære antistoff som binder seg til antistoffene i prøvene. Konjugatet ble fortynnet 1:1000 i blokkeringsbuffer. Det ble satt av til 10 mL per plate. Det gav 10  $\mu$ L konjugat i 9990  $\mu$ L blokkeringsbuffer. 100  $\mu$ L av fortynnet konjugat, ble så tilsatt hver brønn på tid, for så å stå med konjugatet i nøyaktig 60 minutter før vasking. Tiden mellom start på hver plate ble satt til 2 min og 15 sek, da dette var tiden som trengtes mellom vask av hver plate. Stoppeklokke ble benyttet.

### **8. Vasking**

Konjugatet ble helt ut. Platene ble vasket i seks omganger med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, for å fjerne ubundet enzymkonjugert antistoff.

### **9. Substrat**

Som substrat for enzymet peroksidase, ble OPD-tabletter benyttet. Dette substratet gir en gul/oransje fargereaksjon ved tilstedeværelse av antistoff i prøvene. Fargeintensiteten er proporsjonal med mengden antistoff i prøven.

For hver plate ble 1 OPD-tablett løst mørkt i 12,5 mL forsfat-citrat buffer. Rett før applisering ble det tilsatt 5  $\mu\text{L}$  30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  per plate, som katalysator. 100 $\mu\text{L}$  av substratløsningen ble så tilsatt hver brønn på tid. Platene ble plassert i en mørk skuff i nøyaktig 30 minutter før tilsetning av stoppløsning. (1 min mellom hver plate)

### **10. Stopping**

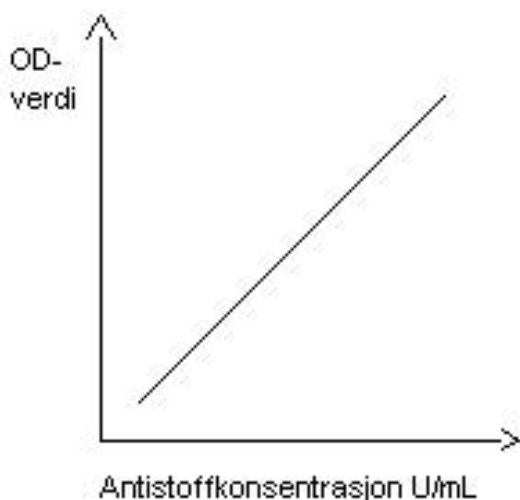
Fargereaksjonen ble stoppet ved å tilsette 50  $\mu\text{L}$  svovelsyre til hver brønn på platene. Også dette ble gjort på tid, for at alle brønnene skal få lik tid til å gi fargereaksjon. Platene ble satt tilbake i skuffen.

### **11. Avlesning**

10 minutter etter stopping, ble platene tatt ut av skuffen for avlesning på ELISA-avleser med filter på 490 nm. OD-verdien (absorbansen) i hver brønn ble målt, og korrigert av blankprøvene.

### **Beregning av antistoffkonsentrasjon**

OD-verdiene til standard løsningene ble brukt til å lage standardkurver med antistoffkonsentrasjon (U/mL) på x-aksen, og OD-verdier på y-aksen. Dette gav tilnærmet rettlinjede standardkurver ( $y = ax + b$ ) som kunne brukes til utregning av konsentrasjonen i prøvene ut fra avleste OD-verdier.



**Figur 14:**

*Standardkurve for utregning av konsentrasjon av antistoff i prøvene. Antistoffkonsentrasjon (U/mL) på x-aksen, og OD-verdier på y-aksen.*

Data program som tilhører ELISA-avleser foretar denne beregningen, etter at startkonsentrasjonen i standard, og fortyninger som ble utført, er definert manuelt. For IgG i blodprøvene får man dermed oppgitt konsentrasjonen direkte, og bare snittverdi for hver enkelt prøve må beregnes.

Salivaprøvene ble fortynnet under preparering, så dette måtte tas hensyn til ved utregning av IgA konsentrasjon i prøvene;

For å beregne konsentrasjonen i ekstraksjonsvæsken, ble konsentrasjonen i fortynnet prøve multiplisert med tilsvarende resiproke fortyning. Fortynningsfaktoren i ekstraksjonsløsningen ble beregnet ved å dividere ekstraksjonsvolumet ( $400 \mu\text{L} + \text{vekt av saliva}$ ) med vekt av saliva. Ved å multiplisere fortynningsfaktoren med konsentrasjonen i ekstraksjonsløsningen, ble konsentrasjonen av IgA i salivaprøve bestemt.

### 3.8.5. ELISA-metode benyttet for bestemmelse av PnH-antistoffkonsentrasjon

På grunn av problemer med uspesifikk binding ble det for PnH-ELISA brukt en modifisert metode i forhold til den som ble brukt for INV-ELISA.

#### Reagenser:

Coating: Vaksinstamløsningen (PnH-antigen, konsentrasjon 7250 µg/mL)

Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20 uten Ca og Mg, pH = 7,2

Konjugat: Peroksydase-konjugert geit anti-mus IgG (Sigma-Aldrich, A-9309) eller Peroksydase-konjugert geit anti-mus IgA (Sigma-Aldrich, A-4789)

Substrat: OPD-(ortho-Phenylenediamine Dihydrochloride)tabl. (Sigma-Aldrich, P-6912)

Katalysator for substrat: Hydrogenperoksid 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 1.2201-250)

PBS 0,01 M, pH = 7

Fosfat-citrat buffer 0,05 M

Stoppløsning: Svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1,25 M (FH, 0502037)

Serumfortynningsbuffer: 30% BSA løsn.

(PAA Laboratories GmbH, lev. av Pedersen & Sønn)

fortynnet til 0,5 % (2mL 30% BSA + 118 mL PBS m/Tween 20)

Nøytraliseringsbuffer: PnC C-PS Pneumokokk C polysakkarid (SSI)

(10 mg tørrstoff løses til 2 mg/mL i steril PBS og fordeles i nuncrør, 500 µL i hver. Oppbevares i fryseskap inntil bruk)

#### Utstyr:

Mikrotestplate, maxisorp. (Nunc-immunoplate 439454)

ELISA-vasker (Skan Washer 300 version B, Molecular Devices)

Plasttrau til reagenser ved bruk av multikanalpipette

Pipetter og pipettespisser (Gilson pipetter)

Reagensrør (Ellermannrør, 3,5 mL, plast)

Målesylindere

Erlenmeyerkolber

Tape til forsegling av plate (Tamro)

Whirlmixer (Labinco L46)

Inkubatorskap (37°C, Termaks)

ELISA avleser (Emax, Molecular Devices)

### 1. Coating

Antigen spesifikke mot de antistoffene som skulle detekteres fra prøvene, ble satt på microbrønnplatene.

Vaksinestamløsningen (PnH-antigen, konsentrasjon 7250 µg/mL) fortynnes 1:72 med PBS. Dette gav 40 µL vaksinestamløsning i 11360 µL PBS. Konsentrasjon på coateløsningen ble da 100 µg/mL PnH-antigen.

100 µL av coateløsningen ble tilsatt hver brønn på ELISA-platene. Noen få plater ble ikke coatet i rad H. Disse brønnene ble tilsatt 100µL PBS. Platene uten coat på rad H, ble brukt ved innstilling av standard, som en kontroll på at det ikke var uspesifikk binding til platene. Platene ble forseglet. De stod så 30 minutter i romtemperatur. Deretter ble de inkubert i 3 timer ved 37°C, før de ble satt på kjølerom (4°C) inntil bruk. (ca. to måneders holdbarhet)

### 2. Vasking

Platene ble vasket med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, fem ganger, for å fjerne antigen som ikke hadde bundet seg til brønnene på mikrobrønnplatene.

### 3. Reaksjon med serum

I pneumokokkenes cellevegg finnes et polysakkarid (pneumokokk C polysakkarid) som stimulerer til antistoff produksjon, men det er ikke funnet at disse gir noen form for beskyttelse mot sykdom.

(Musher et al. 1990) Det var derfor ønskelig å nøytralisere disse antistoffene før prøve ble analysert.

Dette ble utført ved bruk av PNC.

Av 2 mg/mL PNC trengtes:  $((10\mu\text{L}/\text{mL}/2000\mu\text{g}/\text{mL}) \times 10\,000\ \mu\text{L})$  50 µL. Denne ble videre fortynnet i 10 000 µL 0,5% BSA/PBS/Tween 20

11 µL blodprøve ble fortynnet 1:10 i 110 µL PNC (fortynnet) i ett lite reagensrør.

Standard ble fortynnet 1:10 ved å ta 200 µL standard og 1800 µL PNC (fortynnet).

Prøve og standard ble så mikset på whirlmixer, for så å skulle stå i en time.

Deretter ble prøvene videre fortynnet til 1:100 ved å tilsette 1089 µL 0,5% BSA/PBS/Tween 20 i hvert rør. Tween 20 virker som en blokkeringsbuffer

#### 4. Prøve

Fortynnet prøve og standard ble påsatt, og eventuelt antistoff mot antigenet i coaten bindes.

##### Startfortynningen av prøvene (PnH):

Salivaprøvene 1:10

Blodprøvene 1:100

##### Startfortynning av standardene:

Standard for antistoff rettet pneumokokker (PnH) i blod: (1:200) (640 U/mL)

Standard for antistoff rettet pneumokokker (PnH) i saliva: (1: 5) (20 U/mL)

200µL fortynnet prøve ble tilsatt i brønnene A2-A11.(+ evt 100 µL på rad H om uten coat)

200µL standard ble tilsatt i brønn A1. (+ evt 100 µL på rad H om uten coat)

De resterende brønnene ble fylt med 100 µL 0,5 % BSA/PBS/Tween 20.

Prøver og standard (A1-11) ble fortynnet (2-folds) ved å overføre 100 µL fra en brønn til den neste i kolonnen ved hjelp av multikanalpipette. Platene ble så forseglet og satt i inkubatorskap (37°C) i 2 timer.

#### 5. Vasking

Platene ble vasket i fem omganger med Dulbeccos vaskebuffer med Tween 20, for å fjerne ubundet antistoff.

#### 6. Konjugat

Som konjugat ble det brukt peroksidase-konjugert geit anti-mus IgA til påvisning av IgA i salivaprøvene, og peroksidase-konjugert geit anti-mus IgG til påvisning av IgG i serumprøvene. Dette er enzymkonjugerte sekundære antistoff som binder seg til antistoffene i prøvene. Konjugatet ble fortynnet 1:1000 i PBS/Tween 20. Det ble satt av til 10 mL per plate. Det gav 10 µL konjugat i 9990 µL blokkeringsbuffer. 100 µL av fortynnet konjugat, ble så tilsatt hver brønn på tid, for så å stå med konjugatet i nøyaktig 60 minutter før vasking. Tiden mellom start på hver plate ble satt til 1 minutt, da dette var tiden som trengtes mellom vask av hver plate. Stoppeklokke ble benyttet.

Videre ble vasking, påsetting av substrat, stopping, avlesning og beregning av antistoffkonsentrasjon, utført som i metode for INV.

### 3.9. STATISTISKE METODER OG GRAFISK FREMSTILLING

Dataprogrammet GrafPad PRISM Versjon 4.03, ble benyttet til grafisk fremstilling og statistiske beregninger. Siden gruppene i forsøket var små ( $n = 6$ ), ble det benyttet en ikke-parametrisk metode til de statistiske analysene. Slike metoder baseres på en rangering av resultatene, fra laveste til høyeste verdi. Dette sikrer at statistikken er valid, selv om populasjonsdistribusjonen ikke er normalfordelt.

For å beregne signifikante forskjeller mellom to ulike grupper, ble tosidig Mann-Whitney U-test benyttet. Dataprogrammet (GrafPad PRISM) benytter følgende formel i utregningen:

$$U = n_1 \times n_2 + n_1(n_1 + 1) / 2 - R_1,$$

Der  $n$  er antall observasjoner i de to gruppene som sammenlignes (henholdsvis gruppe 1 og 2) og  $R_1$  er summen av rangeringsnumrene til gruppe 1. Programmet regner automatisk ut tilhørende P-verdi ut fra U-verdien. P-verdien er et mål på sannsynligheten for at forskjellen mellom de to gruppene er tilfeldig. Ved  $P < 0,05$  anses det å være signifikant forskjell mellom måleresultatene fra de to gruppene.



## 4. RESULTATER

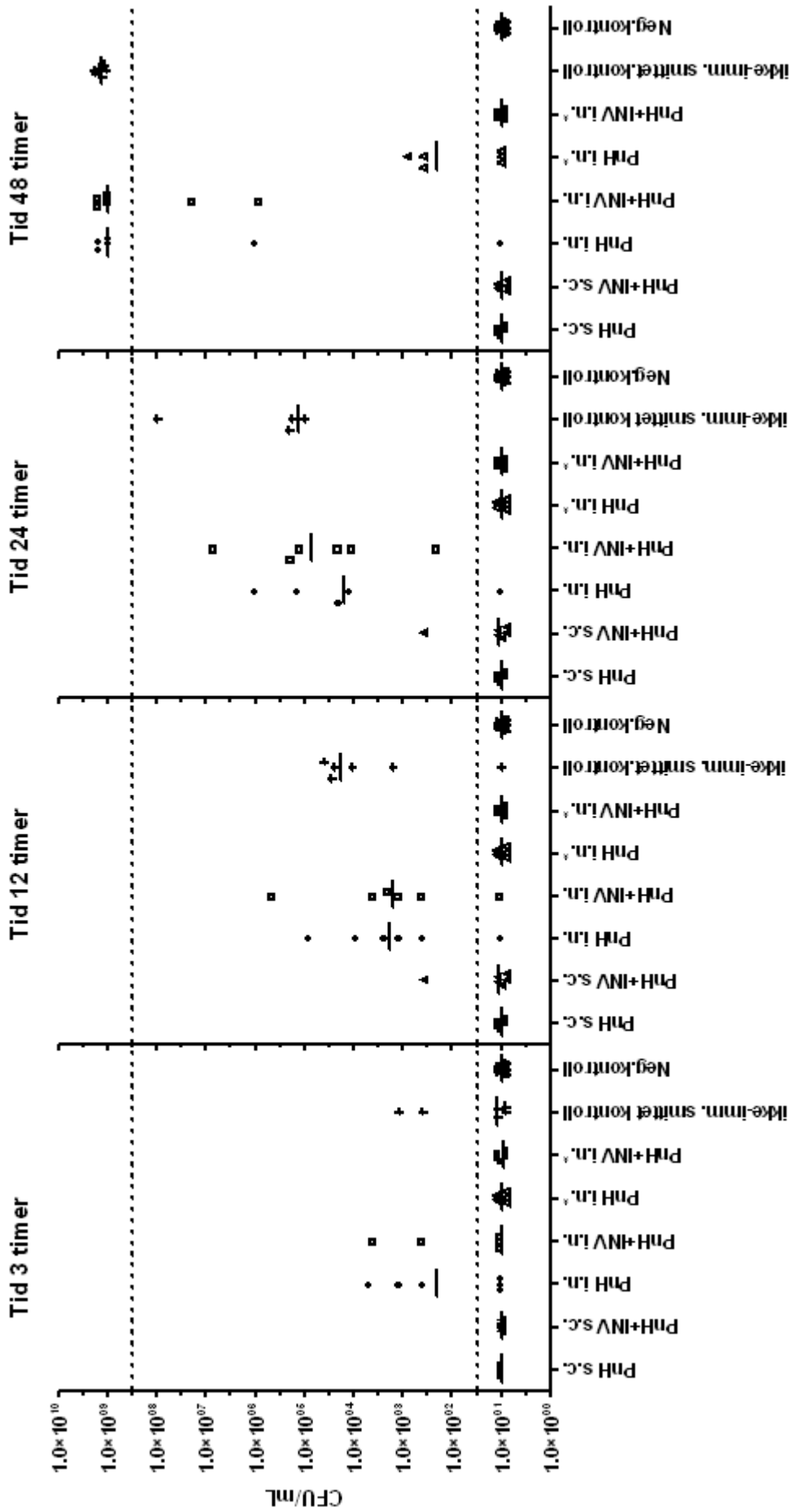
### 4.1. BESKYTTELSE MOT PNEUMOKOKK SYKDOM

#### 4.1.1. Bakterier i blod etter smitte

Etter smitte av musene med Pneumokokker, ble det tatt blodprøve for utsåing og bakterietelling. Dette for å kunne påvise tilstedeværelse av bakterier i blodet etter smitte. Prøvene ble tatt hhv. 3, 12, 24 og 48 timer etter smitte. Resultatene viser hvordan grupper som har fått ulike vaksineløsninger, administrert på ulike måter, var beskyttet mot bakterieinfeksjon i blod. For gruppene som fikk vaksine administrert i.n., kan man også se på forskjell etter i.n\* og i.p smittemåte. Både ikke-immunisert smittet kontrollgruppe, og negativ kontrollgruppe (ikke smittet) for i.p smitte var med i smitteforsøket. For å begrense forsøkets størrelse, ble det ikke tatt med kontrollgruppe for i.n. smitte her, men i det parallelle forsøket. (Abrahamsen 2005)

Det var seks mus i hver gruppe med unntak av PnH s.c, der mus nr.3 døde, av ukjent årsak, før smitteforsøket startet. Alle musene bortsett fra negativ kontrollgruppe ble smittet med pneumokokker. Noen av prøvene kunne ikke telles pga. forurensninger i agarskål. For enkelte grupper vil det derfor ved noen tidspunkt være færre enn seks prøver. Alle prøver hvor man ikke kunne detektere bakterievekst, er satt lavere enn nedre deteksjonsgrense ( $4 \times 10^2$ ). For døde mus ble der satt en verdi som var høyere enn det man kunne finne hos mus som levde ( $>1 \times 10^8$ ). Alvorlig syke mus, som ble avlivet, var i noen tilfeller vanskelig å ta prøve av. Disse blir presentert i figur (Figur 15) som døde, og dermed gitt en verdi over øvre deteksjonsgrense. Disse tilpasningene ble gjort for at prøvene fra alle mus som inngikk i forsøket skulle kunne presenteres. (Figur 15)

Ikke-immunisert smittet kontrollgruppe viser at musene i gruppen ble smittet ved administrasjon av bakterieløsning i.p. Denne gruppen er også viktig for sammenligning med gruppene som har fått vaksine. Negativ kontroll (ikke smittet) viser at det ikke er smitte blant musene som ikke har fått administrert bakterieløsning, og dermed ikke smitte mellom burene/gruppene i isolatoren hvor musene ble oppstallet etter smitte.



**Figur 15:** Bakterietelling i blod ved fire ulike tidspunkt etter smitte. X-aksen viser gruppene i forsøket ut fra vaksine gitt, og administrasjonsmåte for vaksine. Y-aksen viser CFU/mL blod. Alle musene bortsett fra negativ kontrollgruppe ble smittet med pneumokokker. To grupper merket \* er smittet i.n., de resterende er smittet i.p. Ved i.n. smitte ble det gitt  $3 \times 10^4$  bakterier, og ved i.p. smitte 50 bakterier. Stiplet linje viser øvre og nedre deteksjonsgrense. Pga. små grupper og stor spredning, er median i stedet for middelverdi avmerket i figur (—).

For gruppene immunisert s.c. kunne man ikke finne bakterier i blod for noen av prøvene etter i.p.smitte. Mus som hadde blitt s.c. immunisert med PnH eller PnH+INV var altså beskyttet mot pneumokokkinfeksjon. Det kan ikke vises til forskjell mellom gruppe som fikk PnH alene, og gruppe som fikk PnH i kombinasjon med INV.

I.n. vaksinerer forhindret ikke bakterier i blod etter i.p. smitte. Det var ikke signifikant forskjell i bakterietall i blod mellom gruppen som fikk kombinasjonsvaksine, og gruppen som bare hadde fått PnH vaksine (T3  $P=0,49$  og T24  $P=0,49$ ). Beskyttelsen var ikke god nok til å forhindre alvorlig sykdom. Disse gruppene hadde heller ingen statistisk signifikant forskjell fra ikke-immunisert smittet kontrollgruppe (PnH i.n. mot ikke-imm. smittet kontrollgruppe T24  $P=0,82$ ).

Etter i.n. smitte var det derimot svært få bakterier i blod blant gruppene som hadde fått i.n. vaksine. Hos tre mus i gruppen som hadde fått PnH i.n. kunne man se bakterier i blod etter 48 timer, mens gruppen som hadde fått PnH+INV ikke hadde bakterier i blod. Det er dermed en antydning til at PnH i kombinasjon med INV gir best beskyttelse, men forskjellen er ikke statistisk signifikant ( $P=0,18$ ).

I gruppene PnH i.n., PnH+INV i.n. og ikke-immunisert smittet kontroll, kunne man alt etter 3 timers prøven påvise bakterier i blod. CFU/mL økte i disse gruppene i hver prøve frem til 48 timersprøven. Flere av musene klarte seg ikke til 48 timers prøven, og de resterende ble avlivet da men tydelig kunne se tegn til alvorlig sykdom, i form av lavt aktivitetsnivå og pjuskete pels. Disse gruppene var derfor ikke beskyttet mot alvorlig sykdom. I gruppe som fikk PnH i.n. skilte mus nr. 5 seg tydelig fra det andre, ved at det ikke kunne påvises bakterier i noen av prøvene.

#### **4.1.2. Musenes tilstand etter smitte**

Etter smitte ble musene godt overvåket. Helsestatus til hver enkelt mus ble observert og beskrevet i rapportskjema, i form av frisk, syk eller død/avlivet, minst en gang daglig de første dagene etter smitte. Musene ble under hele forsøket observert flere ganger daglig av dyrestallens personale, som også fikk i oppgave å avlive mus som ble alvorlig syke. For gruppe PnH s.c. var det bare fem mus i gruppen før smitte.

Endringer i observert helsetilstand, vises først 48 timer etter smitte. Mellom 48 timer og 6 døgn var det ingen endring i overlevelse, men to mus ble syke på denne tiden. Den ene musen var i gruppen som

hadde fått PnH s.c., og den andre i gruppen som hadde fått PnH i.n. Til sammenligning kunne man ikke se endring i gruppene som hadde fått INV i tillegg til PnH. Tomtapping/avlivning av musene som hadde overlevd ble utført 6 døgn etter smitte.

Gruppe	3 timer			12 timer			24 timer			48 timer			6 døgn		
	F	S	D	F	S	D	F	S	D	F	S	D	F	S	D
PnH s.c.	5			5			5			5			4	1	
PnH+INV s.c.	6			6			6			6			6		
PnH i.n.	6			6			6			1	5		1		5
PnH+INV i.n.	6			6			6				6				6
PnH i.n.*	6			6			6			6			5	1	
PnH+INV i.n.*	6			6			6			6			6		
Ikke-imm.smittet kontroll	6			6			6				6				6
Negativ kontroll	6			6			6			6			6		

**Tabell:** Tilstand etter smitte. Alle gruppene utenom negativ kontroll er smittet med pneumokokker. Gruppene angis etter vaksine gitt, og administrasjonsmåte for vaksine.

Timer = tid etter smitte

F = Frisk

S = Syk

D = Død eller avlivet pga. alvorlig sykdom

PnH = Helcelle pneumokokkvaksine

INV = Influensavaksine

Ikke imm. = ikke immunisert

\* = gruppe smittet i.n. (resten er smittet i.p.)

Gruppe/Tid	T 24 (24 timer etter smitte)		T48 (48 timer etter smitte)	
	%	n	%	n
PnH s.c.	100 %	5/5	100 %	5/5
PnH+INV s.c.	100 %	6/6	100 %	6/6
PnH i.n.	100 %	5/5	17 %	1/6
PnH+INV i.n.	100 %	6/6	0 %	0/6
PnH i.n.*	100 %	6/6	100 %	6/6
PnH+INV i.n.*	100 %	6/6	100 %	6/6
Ikke-imm.smittet kontr.	100 %	4/4	0 %	0/6
Negativ kontroll	100 %	6/6	100 %	6/6

**Tabell:** Overlevelse etter smitte. Alle gruppene utenom negativ kontrollgruppe er smittet med pneumokokker. Gruppene merket \* er smittet i.n. med  $3 \times 10^4$  bakterier, de resterende gruppene er smittet i.p. med 50 bakterier. Overlevelse er angitt som prosent (%) og numerisk (n).

Når det gjelder overlevelse kom gruppene som hadde fått i.n. vaksine, og ble smittet i.p. (PnH i.n. og PnH+INV i.n.) dårligst ut, med unntak av ikke-immunisert smittet kontrollgruppe. Overlevelsen som vises 48 timer etter smitte, endret seg ikke frem mot tomtapping/avlivning.

#### 4.1.3. Bakterier i neseskyl etter smitte

For gruppene som ble smittet i.n. (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*) ble det tatt ett døgn og seks døgn etter smitte. Denne metoden, etter smitte med pneumokokker, har ikke vært etablert tidligere ved Folkehelseinstituttet.

##### PnH i.n.\*

Mus nr.	Tid etter smitte	
	1 døgn	6 døgn
1	÷	÷
2	÷	÷
3	÷	Forurensset
4	÷	÷
5	÷	$8 \times 10^3$
6	÷	÷

##### PnH+INV i.n.\*

Mus	Tid etter smitte	
	1 døgn	6 døgn
1	÷	÷
2	÷	÷
3	÷	$2 \times 10^2$
4	÷	÷
5	Forurensset	Forurensset
6	$4 \times 10^1$	÷

**Tabell 8:** Neseskylprøver for gruppene som ble smittet i.n. (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*) Prøvene ble tatt 1 døgn og 6 døgn etter smitte. Noen av prøvene kunne ikke telles pga. forurensninger i agariskål.

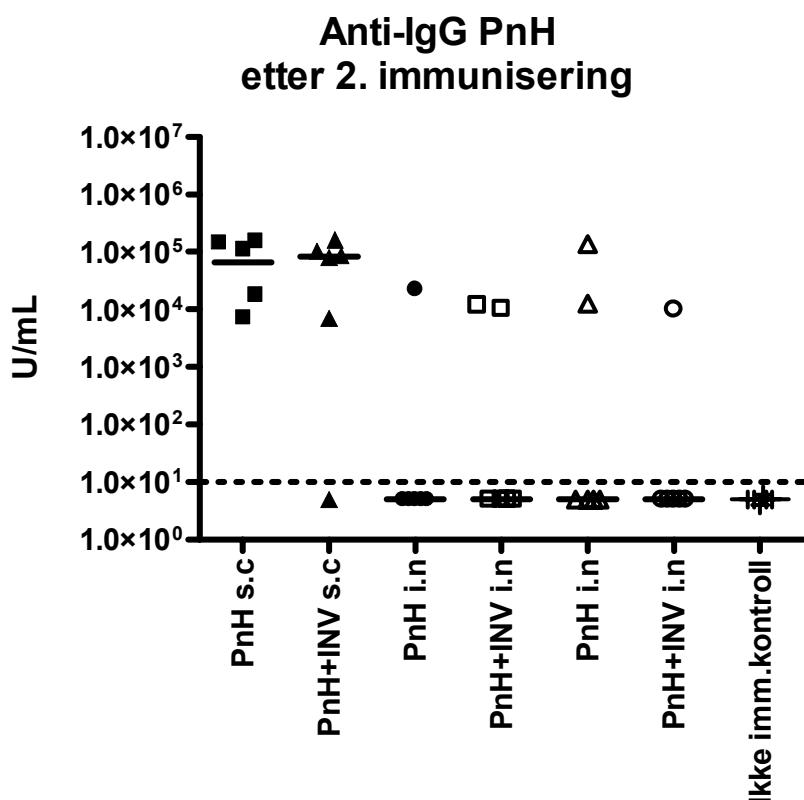
For de tolv prøvene (seks mus i hver gruppe) ble det ved første tidspunkt funne bakterier i en prøve, og ved siste tidspunkt i to prøver. Ingen av de positive prøvene var fra samme mus. Bakterietallet ved siste tidspunkt var også høyere enn for første, noe som gjør at det kunne ha vært interessant å ha fulgt musene i lengre tid etter smitte. Noen av prøvene var ikke tellbare pga. forurensing.

## 4.2. IMMUNRESPONS MOT PNEUMOKOKKER

Denne oppgaven fokuserer på beskyttelse mot Pneumokokker. Det var derfor ønskelig å se på antistoffresponseren rettet mot pneumokokker, for å se hvor godt pneumokokkvaksinen stimulerte til produksjon av spesifikke antistoffer. Alle blod- og salivaprøver ble analysert for henholdsvis IgG og IgA antistoffer rettet mot pneumokokker ved indirekte ELISA.

### 4.2.1 IgG antistoffrespons i blod rettet mot pneumokokker

Blodprøve ble tatt dagen før 1.immunisering, 20 dager etter 1. immunisering, og 16 dager etter 2. immunisering. Problem med PnH analyse-metoden tok mye tid underveis, så det ble pga. tidsmangel bestemt å analysere bare blodprøvene etter 2.immunisering.



**Figur 16:** IgG antistoffrespons (U/mL) i blodprøve for hver enkelt mus 16 dager etter 2. immunisering. For gruppene som hadde fått intra nasal vaksine, er to og to grupper like. Dette for å kunne se på forskjell etter ulik administrasjon av bakterier ved smitte. I gruppen som har fått PnH s.c. er det bare fem mus, da mus nr.3 døde før serumprøve etter 1.immunisering. Median er avmerket i figur (—). Stiplet linje viser deteksjonsgrense for påvisning av antistoffer.

Etter 2. immunisering kunne man se sterk respons i gruppene som hadde fått vaksine administrert s.c. (PnH s.c. og PnH+INV s.c.). Responsen er signifikant høyere enn for ikke-imm. kontrollgruppe ( $P=0,0043$  for PnH s.c. mot ikke immunisert kontroll, og  $P=0,00152$  for PnH+INV s.c. mot ikke-immunisert kontroll). Det kunne ikke vises til signifikant forskjell mellom gruppe med, og uten INV.

Minst en mus i hver gruppe som hadde fått administrert vaksine i.n. så ut til å ha fått god respons. Gruppene som helhet kunne derimot ikke vise til signifikant forskjell fra ikke-imm. kontroll. (Td. PnH i.n. mot ikke-imm. kontroll  $P=0,3939$ )

Det kan, som forventet, ikke påvises IgG antistoff mot pneumokokker i ikke-immunisert kontrollgruppe.

#### **4.2.2. IgA antistoffrespons i saliva rettet mot pneumokokker**

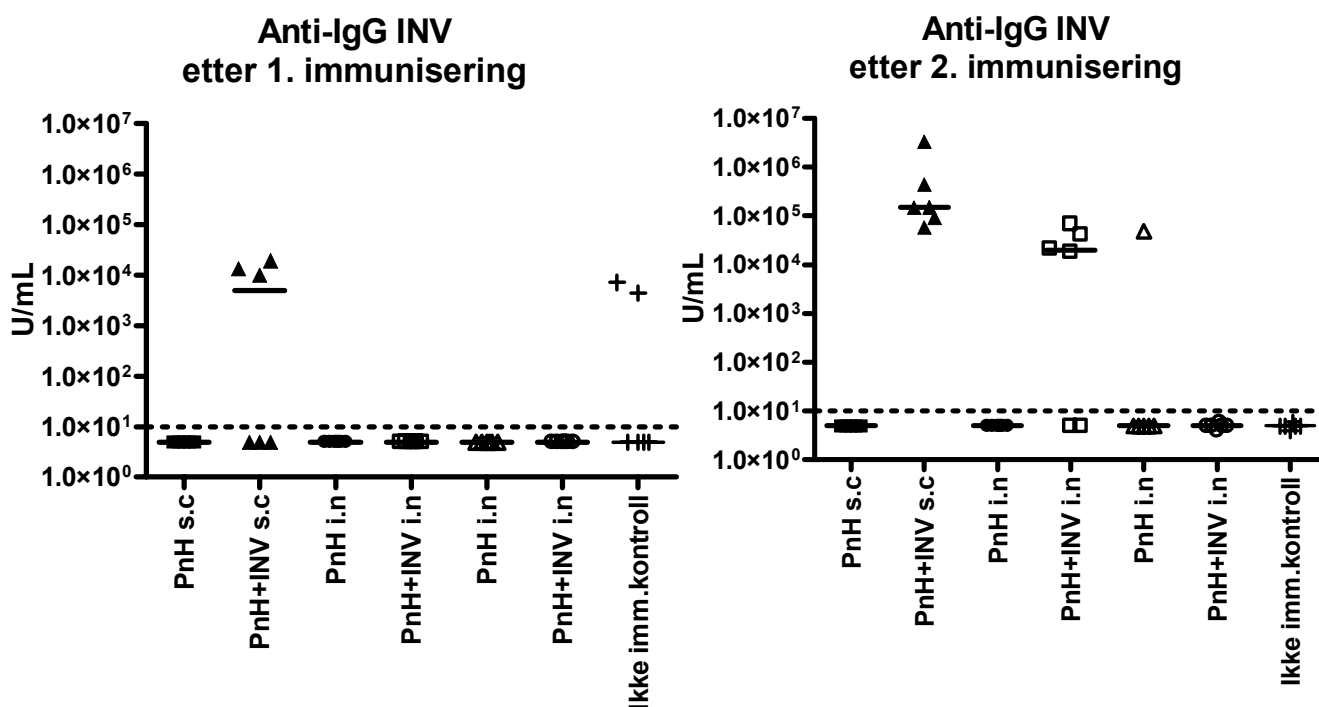
ELISA analyse av salivaprøvene gav lite informasjon. Det ble også her bare analysert prøvene etter 2. immunisering. Av disse prøvene var det bare én som hadde OD-verdi  $> 0,1$ . Det var mus nr. 1 i gruppen som hadde fått PnH+INV i.n. som gav en OD-verdi på 0,118. Forskjellen til blanke prøver var for liten til at resultatene kan vektlegges. Signifikant grad av IgA antistoff i saliva rettet mot pneumokokker kunne dermed ikke påvises.

### 4.3 IMMUNRESPONS MOT INFLUENZA

Denne oppgaven fokuserer på beskyttelse mot Pneumokokker, men siden tre av gruppene fikk influensavaksine i tillegg til pneumokokkvaksine, var det ønskelig å se på antistoffresponseren rettet mot influensa. Dette for å se etter eventuelle interaksjoner (hemming/potensiering) mellom de ulike vaksinene, og for å kontrollere at influensavaksinene stimulerte til produksjon av spesifikke antistoffer. Alle blod- og salivaprøver ble analysert for henholdsvis IgG og IgA antistoffer rettet mot influensa ved indirekte ELISA.

#### 4.3.1. IgG antistoffrespons i blod rettet mot influensa

Blodprøve ble tatt dagen før 1. immunisering, 20 dager etter 1. immunisering, og 16 dager etter 2. immunisering. Det kunne ikke påvises IgG antistoffrespons i noen av prøvene før immunisering.



**Figur 17:** IgG antistoffrespons (U/mL) i blodprøve for hver enkelt mus etter 1. immunisering, og etter 2. immunisering. For gruppene som hadde fått intra nasal vaksine, er to og to grupper like. Dette for å kunne se på forskjell etter ulik administrasjon av bakterier ved smitte. I gruppen som har fått PnH s.c. er det bare fem mus, da mus nr.3 døde før blodprøve etter 1.immunisering. Median er avmerket i figur (—). Stiplet linje viser deteksjonsgrense for påvisning av antistoffer.



Etter 1. immunisering kunne man se en respons hos tre av seks mus i gruppen som hadde fått PnH+INV s.c. Denne responsen forsterkes ytterligere etter 2. immunisering, og da viser alle seks musene god respons. Man kan etter 2. immunisering vise til en signifikant forskjell både fra ikke-imm. kontrollgruppe ( $P=0,002$ ), og fra gruppe som bare har fått PnH s.c. ( $P=0,002$ ).

Etter 2. immunisering ser man også en respons hos fire av seks mus i den ene av de to gruppene som har fått PnH+INV i.n. Responsen er ikke god nok til at det er signifikant forskjell verken i forhold til den andre gruppen med samme vaksine ( $P=0,065$ ), eller kontrollgruppen ( $P=0,065$ ). Det er en signifikant forskjell til gruppen som har fått s.c vaksine (PnH+INV s.c) ( $P=0,0043$ ).

Ikke-immunisert kontrollgruppe har etter 1. immunisering to mus med antistoffrespons. Denne responsen kan ikke påvises etter 2. immunisering. En mus i gruppen som har fått PnH i.n. viser også uventet antistoffrespons.

#### **4.3.2. IgA antistoffrespons i saliva rettet mot influensa**

ELISA analyse av salivaprøvene gav lite informasjon. Alle prøvene hadde OD-verdi  $< 0,1$ , og forskjellen til blanke prøver var for liten til at resultatene kan vektlegges. IgA antistoff i saliva rettet mot influensa kunne dermed ikke påvises på noe tidspunkt under forsøket.

## 5. DISKUSJON

Denne oppgaven fokuserte på pneumokokker. Effekt av inaktivert pneumokokk helcellevaksine gitt ved injeksjon eller nasedråper, ble undersøkt i forhold til immunrespons, og beskyttelse mot sykdom etter ulike administrasjonsmåter for smitte med pneumokokker. I tillegg ble det sett på om vaksine mot influensa kunne virke som adjuvans, eller forsterker, for pneumokokkvaksine når de ble gitt sammen.

For gruppene immunisert s.c. kunne man ikke finne bakterier i blod for noen av prøvene etter i.p.smitte. (PnH s.c. og PnH+INV s.c.) Overlevelsen etter 6 døgn var 100%, men en mus i gruppen som bare hadde fått PnH s.c. var da litt syk. Disse gruppene kunne også vise til sterk IgG respons mot PnH i blodprøve etter 2. immunisering, noe som bekrefter at vaksinene har hatt god effekt etter s.c. administrering. Det kan ikke vises til statistisk signifikant forskjell mellom gruppe som fikk PnH alene, og gruppe som fikk PnH i kombinasjon med INV, verken når det gjelder immunrespons eller overlevelse etter i.p. smitte med pneumokokker. Man kan imidlertid se en antydning til at PnH+INV s.c. gir bedre beskyttelse, siden en mus i gruppen PnH s.c. var blitt syk seks døgn etter smitte. Dette kan være interessant å se nærmere på i senere forsøk.

I.n. vaksinerer forhindret ikke bakterier i blod etter i.p. smitte. (PnH i.n., PnH+INV i.n.) Beskyttelsen var ikke god nok til å bekjempe infeksjon og alvorlig sykdom. Sett i forhold til antistoffrespons i blod etter 2. immunisering var dette ikke overraskende, da liten IgG-respons kunne påvises. En mus i gruppen som fikk PnH i.n. (mus nr.5) skilte seg tydelig fra det andre, ved at det ikke kunne påvises CFU på noen av prøvene. 48 timer etter smitte var det, for de to gruppene, bare denne musen som levde. Man må gå ut fra at denne musen var beskyttet.

Det kan ikke vises til forskjell mellom gruppe som fikk PnH i.n. alene, gruppe som fikk PnH+INV i.n., og ikke-immunisert smittet kontroll, verken når det gjelder IgG respons eller bakterietall i blod etter smitte med pneumokokker i.p. I disse gruppene kunne man alt etter 3 timers prøven påvise bakterier i serum. CFU/mL økte i disse gruppene i hver prøve frem til 48 timers prøven. Flere av musene klarte seg ikke til 48 timers prøven, og de resterende (utenom mus nr.5 i gruppen som fikk PnH i.n) ble avlivet da men tydelig kunne se tegn til alvorlig

sykdom, i form av lavt aktivitetsnivå og pjuskete pels. Disse gruppe var altså ikke beskyttet mot alvorlig sykdom.

Sett i forhold til tidligere forsøk ved instituttet, var den dårlige beskyttelsen uventet. Forsøket der bruk av inaktivert helcelle *Streptococcus pneumoniae* type 4 for i.n. immunisering, og senere i.p. smitte med levende bakterier fra samme stamme, har vist å gi beskyttelse mot sykdom. (Hvalbye et al. 1999) Doseringsregime i dette forsøket var imidlertid forskjellig fra regime brukt i forsøket henvist til. For senere forsøk bør derfor doseringsregime optimaliseres.

Det er ikke tidligere etablert noen metode for i.n. smitte med pneumokokker ved Folkehelseinstituttet. Dette forsøket skulle dermed bidra i etablering av en slik metode, samt å inkludere neseskylning etter i.n. smitte. Resultatene etter i.n. og i.p. smitte kan ikke nødvendigvis sammenlignes, da man ikke vet sikkert om bakteriene er like virulente etter ulik administrasjon. Doseringene for de to smittemetodene er også svært forskjellig. I dette forsøket ble det av praktiske årsaker ikke tatt med ikke-imm. smittet kontrollgruppe for i.n. smitte. Denne gruppen ble tatt med i det parallelle forsøket. (Abrahamsen 2006) Det viste seg imidlertid at den i.n. smittemetoden var svært ømfintlig for hvor lang tid det gikk fra tilberedning av smittesuspensjon, til smitte faktisk foregikk. Ikke-imm. smittet kontrollgruppe for i.n. smitte i det parallelle forsøket, kunne dermed ikke brukes for direkte sammenligning med vaksinerte grupper i dette forsøket.

I gruppene som hadde fått vaksine i.n., og senere ble smittet i.n. (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*) kunne man etter 48 timer observere at ingen av musene viste fysisk tegn til sykdom. Ved bakterietelling i blod kunne lite bakterier påvises. Det kan se ut som i.n. vaksinerings gav svært god beskyttelse mot i.n. smitte. Det er antydning til at PnH i kombinasjon med INV gir best beskyttelse, men forskjellen er ikke statistisk signifikant ( $P=0,18$ ). Denne forskjellen kom først til syne ved T48. Det var i dette forsøket ikke satt opp flere prøvetidspunkt, men dette kunne vært utgangspunkt for videre studier der man kunne følge musene i lengre tid etter smitte. I ett slikt forsøk burde man også ta med kontrollgruppe for i.n. smitte, for å være sikker på at smittemetoden faktisk gir bakterier i blod og/eller alvorlig sykdom hos mus. Grupper med flere enn seks mus kan også være nyttig for å styrke resultatene.

For gruppene som ble smittet i.n. (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*) ble det tatt neseskylprøve ett døgn og seks døgn etter smitte. Dette hadde aldri tidligere vært gjort ved Folkehelseinstituttet etter smitte med pneumokokker. For de tolv prøvene (seks mus i hver gruppe) ble det ved første tidspunkt funne bakterier i en prøve, og ved siste tidspunkt i to prøver. Ingen av de positive prøvene var fra samme mus. Bakterietallet ved siste tidspunkt var også høyere enn for første, noe som gjør at det kunne ha vært interessant, også her, å ha fulgt musene i lengre tid etter smitte. Noen av prøvene var ikke tellbare pga. forurensing. Disse ble trolig forurenset av *Proteus* bakterier som finnes i musetarm under prøvetakningen. Dette er en antagelse med grunnlag i karakteristisk lukt og sverming av bakteriene i blodagar. Som tidligere nevnt var det i dette forsøket ikke noen ikke-imm. smittet kontrollgruppe for i.n. smitte. Uten å kunne sammenligne dette smittforsøket med det parallelle (Abrahamsen 2006), skal det likevel nevnes at ikke-imm. smittet kontrollgruppe der viste bakterier i neseskyl for alle musene etter i.n. smitte.

Forsøket viser at man kan finne pneumokokker i neseskyllevæske etter i.n. smitte. Videre forsøk er nødvendig for å se om dette kan være en eksperimentell modell for kolonisering av pneumokokker. Flere tidspunkt for neseskyling bør tas med for optimalisering av modellen. En modell for kolonisering av pneumokokker på slimhinne, vil også være viktig med tanke på beskyttelse mot øre- og bihulebetennelse.

Når det gjelder antistoffrespons mot influensa kunne man etter 1. immunisering se respons hos tre av seks mus i gruppen som hadde fått PnH+INV s.c. Denne responsen ble etter 2. immunisering ytterligere forsterket, og da viser alle seks musene god respons. Man kan etter 2. immunisering vise til en statistisk signifikant forskjell både fra ikke-imm. kontrollgruppe, og fra gruppe som bare har fått PnH s.c. Etter 2. immunisering ser man også en respons hos fire av seks mus i den ene av de to gruppene som har fått PnH+INV i.n. Responsen var derimot ikke god nok til at det er signifikant forskjell verken i forhold til den andre gruppen med samme vaksine eller ikke-imm. kontrollgruppe. Det er signifikant forskjell til gruppen som har fått s.c vaksine (PnH+INV s.c), og man kan derfor ikke vise til at i.n. vaksine ga like god IgG respons som s.c.

Ikke-imm. kontrollgruppe hadde etter 1. immunisering to mus med antistoffrespons mot influensa. Denne responsen kunne ikke påvises etter 2. immunisering. En mus i gruppen som hadde fått PnH i.n. viste også uventet antistoffrespons. En forklaring kan være at musene

hadde antistoffer som kryssreagerte med pneumokokkantigenene i coaten. Det hadde vært ønskelig å ta en ny analyse av alle prøvene for å utelukke eventuelle feil oppstått under analysering. Tidsrammen for oppgaven gav dessverre ikke rom for dette.

Resultatene viser at gruppe som hadde fått influensavaksine subcutant, fikk god IgG-respons. Det fikk derimot ikke musene som hadde fått influensavaksine intranasalt. Dette var uventet siden vaksinen tidligere har gitt god IgG respons i forsøk etter i.n. administrasjon. (Amundsen 2005)

Minst en mus i hver gruppe som hadde fått administrert vaksine i.n. (PnH i.n. og PnH+INV i.n.) (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*), så ut til å ha fått god IgG respons mot PnH i serum etter 2. immunisering. Gruppene som helhet kunne derimot ikke vise til statistisk signifikant forskjell fra ikke-imm. kontroll.

Det kunne ikke påvises signifikant nivå av IgA i noen av salivaprøvene fra dette forsøket. Tidligere forsøk ved instituttet med bruk av samme vaksiner og dosering i mus av typen BALB/c, kunne vise til god antistoffrespons i både blod og saliva etter i.n. vaksine. (Amundsen 2005) Det kunne derfor ha vært interessant å ha sett nærmere på ELISA-analysen for så sjekke om den har vært for lite ømfintlig. Undervegs i PnH ELISA-analysene oppstod problem med uspesifikkbinding, så mange prøver måtte kjøres flere ganger. Da metoden endelig fungerte, var det lite prøvemateriale til overs, så muligheten for å bekrefte resultatene i en ekstra analyse utgikk.

Ikke-imm. smittet kontrollgruppe viser at musene i gruppen ble smittet ved administrasjon av bakterieløsning i.p., og at doseringen var tilstrekkelig til å gi alvorlig sykdom/død hos mus. Denne gruppen var også viktig for sammenligning med gruppene som har fått vaksine. Negativ kontrollgruppe viser at det ikke var smitte blant musene som ikke har fått administrert bakterieløsning, og dermed ikke smitte mellom burene/gruppene i isolatoren. Kontrollgruppene viser klart at smitteforsøket for i.p smitte har fungert.

Ikke-imm. kontrollgruppe for i.n. smitte var, som tidligere nevnt, ikke med i dette forsøket. Det kan vises til bakterier i blod i den ene gruppen etter i.n. smitte (PnH i.n.\*) samt i neseskyllet etter smitte. Det er derfor grunn til å tro at også den intranasale smittemåten fungerte, men kontroll på om doseringen av bakterier ved smitte var tilstrekkelig for å gi

alvorlig sykdom mangler. Doseringen for i.n. smitte i dette forsøket var lavere enn det som tidligere har vært brukt ved instituttet (Janakova et al. 2002), men ser likevel ut til å være tilstrekkelig for å gi bakterier i blod etter smitte.

Det ble, som forventet, ikke påviset IgG antistoff mot pneumokokker i ikke-imm. kontrollgruppe, da den ikke hadde fått vaksine.

Vaksinene ble gitt både subcutant og intranasalt for sammenligning. I forsøket ble pneumokokk helcellevaksine (PnH) benyttet alene, og i kombinasjon med influensavaksine. Forsøket viser at musene fikk god IgG immunrespons i serum, både mot PnH og INV, etter s.c. immunisering. S.c. immunisering gav også beskyttelse mot sykdom etter i.p. smitte. I.n. immunisering gav dårlig IgG respons i serum mot både PnH og INV. Beskyttelse mot sykdom etter i.n., men ikke i.p. smitte ble oppnådd. I.n. smittemetode er imidlertid ikke godt nok etablert til at man direkte kan sammenligne beskyttelse etter ulike administrasjoner av smitte. Når det gjelder den i.n. smittemetoden kom flere interessante observasjoner frem i prøvene tatt 48 timer etter smitte. Bl.a. fant man sterke tendenser til at INV i kombinasjon med PnH i den i.n. vaksinen, forsterker beskyttelse mot bakterier i blod etter i.n. smitte. Dette kan være en svært interessant observasjon å se nærmere på i senere forsøk, da slimhinnene er den naturlige inngangsporten for pneumokokker som gir sykdom hos menneske. Kanskje kan nettopp dette være en viktig observasjon det bør jobbes videre med for å nå målet om en ikke-levende slimhinnevaksine som kan beskytte mennesker mot pneumokokk sykdom.

I pneumokokkbakteriens cellevegg finnes flere potensielle proteinantigen for beskyttelse mot pneumokokksykdom uavhengig av serotype. Det jobbes i dag med kliniske forsøk der vaksiner med enkelte proteinantigen testes (Poolman 2004) Det ble i dette forsøket benyttet en vaksine av inaktivert helcelle *Streptococcus pneumoniae* type 4, før smitte med bakterier av samme serotype. Det kunne vært interessant å sjekke om denne vaksinen gav beskyttelse også mot andre serotyper.

Signifikant nivå av IgA i salivaprøvene kunne ikke vises hos noen av gruppene, og lite IgG i blod kunne påvises hos musene som hadde fått i.n. vaksine. Til tross for lite påvist antistoff kunne man i smitteforsøket se beskyttelse innen flere av gruppene. Dette viser viktigheten av å gjennomføre smitteforsøk, mot bare å skulle anta grad av beskyttelse ut fra antistoffer i prøvemateriale.

## 6. KONKLUSJON

Gruppene som fikk vaksine s.c. (PnH s.c. og PnH+INV s.c.) fikk god IgG immunrespons, og var beskyttet mot alvorlig sykdom etter i.p smitte med pneumokokker.

Gruppene som fikk i.n. vaksine var beskyttet mot alvorlig sykdom etter i.n smitte (PnH i.n.\* og PnH+INV i.n.\*), men ikke etter i.p smitte. (PnH i.n. og PnH+INV i.n.) Modell for i.n. smitte må imidlertid etableres, før man direkte kan sammenligne resultatene etter ulike smittemetoder. Statistisk signifikant mengde av antistoff verken i serum eller saliva kunne påvises etter i.n. immunisering.

Ikke-immunisert smittet kontrollgruppe viste at administrasjon og dosering av bakteriesuspensjon i.p. fungerte tilstrekkelig til å gi alvorlig sykdom hos mus. Negativ kontrollgruppe viste at det ikke var smitte mellom burene/gruppene i isolatoren etter smitte. Dette viser at i.p. smittemodell har fungert.

Det kunne ikke vises til statistisk signifikant påvirkning ved administrasjon av influensavaksine i tillegg til pneumokokk helcellevaksine. Dette gjaldt både for immunrespons etter vaksinerings, og beskyttelse mot pneumokokksykdom etter smitte. Tendenser til påvirkning av beskyttelse er likevel til stede, og danner grunnlag for videre studier.

## REFERANSER

Aaberge I. S., Eng J., Lermark G., Løvik M.: "Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum." *Microbial Pathogenesis*, 1995; 18: 143-52

Aaberge I. S.: "Pneumokokkvaksine til eldre." *Tidsskr Nor Lægeforen* 2005; 125: 45-6

Abrahamsen A.: "Nasal og subkutan pneumokokk konjugatvaksine i kombinasjon med influensavaksine: Immunrespons og beskyttelse mot pneumokokksykdom."

Hovedfagsoppgave ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2006

Amundsen H.: "Nasal og subkutan influensavaksine i kombinasjon med pneumokokkvaksiner: Immunrespons og beskyttelse mot influensa." Hovedfagsoppgave ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2005

Bakke H. S. W.: "Strategies for making non-replicating mucosal vaccines suitable for use in humans." Doktorgradsoppgave, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2005

Bakke H., Setek T. N., Huynh P.N. et al.: "Immunisation schedules for non-replicating nasal vaccines can be made simple by allowing time for development of immunological memory." *Vaccine*, 2004; 22: 2278-84

Bakke H., Haneberg B.: "Slimhinnevaksiner i utvikling." *Tidsskr Nor Lægeforen.*, 2006; 126: 2818-21

Bergsaker M. A. R., Aaberge I. S., Abrahamsen T. G., Flægstad T., Høiby E. A., Løvoll Ø., Schumacher A., Wathne K. O.: "Anbefalinger for bruk av konjugert pneumokokkvaksine i Norge." Rapport til Helse- og omsorgsdepartementet, Oslo, 2004



Block S. T.: "Causative pathogens, antibiotic resistance and therapeutic considerations in acute otitis media." *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1997; 16: 449-56

Brandtzaeg P.: "Role of secretory antibodies in the defence against infections." *Int. J. Medical Microbiology*, 2003; 293: 3-15

Brandtzaeg P., Pabst R.: "Let's go mucosal: communication on slippery ground." *Trends in Immunology*, 2004; 25: 570-7

Christenson B., Hedlund J., Lundbergh P. et al.: "Additive preventive effect of influenza and pneumococcal vaccines in elderly persons." *Eur. Respir. J.*, 2004; 23: 363 - 8

Engh E. & Hem A.: "Forsøksdyrbiologi." *Kompendium i forsøksdyrlære, Norges veterinærhøgskole*, 2004; 61-6

Eskola J., Kilpi H., Palmu A., et al.: "Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media." *New Engl. J. Med.*, 2001; 344: 403-9

Gunnufsen T.: "Nasal vaksine mot influenza: Betydning av doseringsintervall og Bordetella pertussis som adjuvans." *Hovedfagsoppgave ved avdeling for mikrobiologi, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo*, 2001

Haneberg B., Holst J.: "Can nonliving nasal vaccines be made to work?" *Future Drugs Ltd. Expert Rev. Vaccines* 1(2), 2002

Haneberg B., Dalseg R., Wedege E., Høiby E. A., Haugen I. L., Oftung F., Andersen S. R., Naess L. M., Aase A., Michaelsen T. E., Holst J.: "Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans." *Infection and Immunity*, 1998; 1334-41

Hausdorff W. P., Feikin D. R., Klugman K. P.: "Epidemiological differences among pneumococcal serotypes." *Lancet Infect. Dis.*, 2005; 5: 83-93

Hem A.: "Forsøksdyrbiologi." Kompendium i forsøksdyrlære, Norges veterinærhøgskole, 2004; 100-5

Holmgren J., Czerkinsky C.: "Mucosal immunity and vaccines." *Nature medicine*, 2005; 11: 45-53

Hvalbye B. K. R., Aaberge I. S., Løvik M., Haneberg B.: "Intranasal Immunization with Heat-Inactivated *Streptococcus pneumoniae* Protects Mice against Systemic Pneumococcal Infection." *Infection and Immunity*, 1999; 67: 4320-25

Høiby E. A., Hasseltvedt V., Aaberge I. S.: "Pneumokokksykdom og – vaksine." *Norges Apotekerforenings tidsskrift*, 1998; 1: 14-8

Janakova L., Bakke H., Haugen I. L., Berstad A. K. H., Høiby E. A., Aaberge I. S., Haneberg B.: "Influence of intravenous anesthesia on mucosal and systemic antibody responses to nasal vaccines." *Infection and immunity*, 2002; 70: 5479-84

Knapstad S-E.: "Nasal vaksine mot influensa: betydning av immunoglobulin A i sekreter for beskyttelse mot infeksjon." Hovedfagsoppgave ved avdeling for mikrobiologi, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2002

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.: "Brock biology of microorganisms." Tenth edition, Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey 2003; 834

Munthe L. A.: "Kua, gutten og lymfeknuten – immunologiske prinsipper for vaksinasjon." *Tidsskr. Nor. Lægeforen.*, 2006; 126: 2532-7

Musher D. M., Watson D. A., Baughn R. E.: "Does naturally acquired IgG antibody to cell wall polysaccharide protect human subjects against pneumococcal infection?" *The Journal of Infectious Diseases*, 1990; 161: 736-40

Mutsch M., Weigong Z., Rhodes P., Bopp M., Chen R. T., Linder T., Spyr C., Steffen R.: "Use of inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's Palsy in Switzerland." *N. Engl. J. Med.*, 2004; 350: 896-903

McCullers J. A.: "Insights into the Interaction between Influenza Virus and Pneumococcus." *Clinical Microbiology*, 2006; 19: 571-82

Neutra M. R., Kozlowski P. A.: "Mucosal vaccines: the promise and the challenge." *Nat. Rev. Immunol.*, 2006; 6: 148-8

Nichol KL, Baken L, Wuorenma J et al. "The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease." *Arch Intern. Med.* 1999; 159: 2437 - 42

Ogra P. L.: "Mucosal immunoprophylaxis: an introductory overview." Academic Press, 1996; 3-14

Parham P.: "The immune system." Second edition, Garland Science, New York, 2005; 194-205, 214, 269-70, 289, 383

Pedersen M. K., Høiby E. A., Frøholm L.O., Hasseltvedt V., Lermark G., Caugant D. A.: "Systemic pneumococcal disease in Norway 1995-2001: capsular serotypes and antimicrobial resistance." *Epidemiol. Infect.*, 2004; 132: 167-75

Poolman J. T.: "Pneumococcal vaccine development." *Expert Rev. Vaccines*, 2004; 3(5): 597-604

Salyers A. A. & Whitt D. D.: "Bacterial pathogenesis - a molecular approach." Second edition, ASM Press, Washington D. C., 2002; 276-85

Smith A.: "Forsøksdyrbiologi." *Kompendium i forsøksdyrlære*, Norges veterinærhøgskole, 2004; 107

Smittevernhandboka, Nasjonalt Folkehelseinstitutt, 2006

Internettadresse: [www.fhi.no](http://www.fhi.no)

Ticevic A.: "Nasal og subkutan influensavaksine og pneumokokkvaksiner: Immunrespons og beskyttelse mot influensa." Hovedfagsoppgave ved avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2005

Tilgham R. C.: "Clinical significance of bacteriemia in pneumococcal pneumonia." Arch. Intern. Med., 1937; 59: 602-19

Tumpey T. M., Renshaw M., Clements J. D., Katz J. M.: "Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection." Journal of Virology, 2001; 75: 5141-50

Van Ginkel F. W., Jackson R. J., Yki Y., McGhee J. R.: "Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues." J. Immunol., 2000; 165: 4778-82

Verdens helseorganisasjon (WHO), 2006

Internettadresse: [www.who.int/immunization\\_delivery/new\\_vaccines/technologies/en/](http://www.who.int/immunization_delivery/new_vaccines/technologies/en/)

Walker R. I.: "New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization." Vaccine, 1994; 12: 387-400