

THERM-A-LUNG: THERMotherapy Against persistent bacterial LUNG infections

Effekten af hyppig termoterapi på bakterievækst og mikrobefundet i lungerne samt antibiotikaforbrug hos deltagere med kronisk lungeinfektion frem for ingen termoterapi.

Forfattere

Mohamad Isam Saeed¹, Pradeesh Sivapalan¹, Josefin Eklöf¹, Matiullah Naqibullah¹, Zaigham Saghir^{1,2}, Caspar Corti¹, Lise Stensen Bhatia¹, Karin Armbruster¹, Jens D. Lundgren^{2,3} og Jens-Ulrik Stæhr Jensen^{1,2,3}

¹Lungemedicinsk Sektion, Afdeling for Medicinske Sygdomme, Herlev og Gentofte Universitetshospital

²Institut for Klinisk Medicin, Københavns Universitet

³PERSIMUNE & CHIP, Infektionsmedicinsk afdeling, Rigshospitalet.

Koordinerende investigator:

Mohamad Isam Saeed, læge, Ph.d.-studerende
Lungemedicinsk Sektion, Afdeling for Medicinske Sygdomme
Herlev og Gentofte Universitetshospital

Primærkomité

Den videnskabetiske komité for Region H. VEK nr. H-22019877. Anmeldelsesnr. 90222

Videnskabelig Projekt sponsor

Chronic Obstructive Pulmonary Disease Trial Network: COP:TRIN – et netværk af uafhængige KOL-forskere i Danmark: www.coptrin.dk. Kontaktperson: Professor og forskningsansvarlig overlæge Jens-Ulrik Stæhr Jensen, Ph.d.

Styrekomité:

1. Lungemedicinsk afdeling, Gentofte Hospital: Professor og forskningsansvarlig overlæge Jens-Ulrik Jensen, ph.d.; læge Pradeesh Sivapalan, ph.d.
2. Lungemedicinsk afdeling, Hvidovre Hospital: Overlæge Pia Thaning; overlæge Mia Moberg ph.d.; Professor og overlæge Charlotte Suppli Ulrik, DMSc.; overlæge Julie Janner, ph.d.
3. Lungemedicinsk afdeling, Bispebjerg Hospital: Ledende overlæge, Helle Frost Andreassen, ph.d.
4. Lungemedicinsk afdeling, Odense Universitetshospital: Professor og overlæge, Christian B. Laursen, ph.d.
5. Lungemedicinsk afdeling, Aalborg Universitetshospital: Overlæge Ulla M. Weinreich, ph.d.

6. Lungemedicinsk afdeling, Næstved Sygehus: Professor og forskningsansvarlig overlæge Uffe Bødtger, ph.d.
7. Lunge-og infektionsmedicinsk afdeling, Nordsjællands Hospital, Hillerød: Overlæge Andrea Browatski.
8. Lungemedicinsk afdeling, Sjællands Universitetshospital Roskilde: Overlæge, forskningslektor Christian Meyer.
9. Lungemedicinsk afdeling, Aarhus Universitetshospital: Professor og forskningsansvarlig overlæge Elisabeth Bendstrup, ph.d.
10. Infektionsmedicinsk afdeling, Hvidovre Hospital: Professor og overlæge Thomas Benfield, ph.d.
11. Palliationsenheden, Herlev Hospital: Overlæge Kristoffer Marså
12. Lungemedicinsk afdeling, Sydvestjysk Sygehus: Overlæge Torben Tranborg Jensen.
13. Universitair Ziekenhuis Antwerpen: Senior consultant Thérèse Lappere, ph.d.
14. The University of Manchester: Professor, Senior consultant Jørgen Vestbo, DMSc.
15. Patientrepræsentant, Merete Raaschou, cand.psych.

Indholdsfortegnelse

Hypotese	4
Formål	4
Baggrund.....	5
Rationale for projektet - videnskabeligt perspektiv:.....	7
Metode.....	7
Design.....	7
Hvervning og inklusion.....	8
Sample-size (statistisk styrkeberegning/stikprøvestørrelse).....	10
Undersøgelser.....	11
Dataopsamling.....	12
Randomiseret kontrolleret interventionsstudie (RCT).....	13
Udtagning af biologisk materiale	14
Forskningsbiobank.....	15
Biobank til fremtidig forskning.....	15
Risici, bivirkninger og hændelser	16
Statistiske analyser	18
Stadie 1:.....	18
Primær end-point:.....	18
Sekundære end-points:.....	18
Stadie 2:.....	18
Primær end-point:.....	18
Sekundære end-points:.....	18
Oplysninger fra patientjournaler	19
Økonomi.....	20
Vederlag/ydelser.....	20
Offentliggørelse af resultater.....	20
Videnskabsetisk redegørelse.....	21
Udelukkelse fra eller afbrydelse af forsøg.....	22
Oplysning om erstatning- eller godtgørelsesordninger	22
Referencer.....	22
Appendix.....	24
Kontraindikationer til bronkoskopi.....	24

Hypotese

Delhypotese 1:

En intervention med termoterapi, bestående af min. 7 minutters ophold i min. 85°C miljø mindst 4 gange ugentligt i 6 mdr., vil medføre en reduktion i mængden af koloniserende bakterier i bronkoalveolær lavage (BAL) hos personer med persisterende lungeinfektion* frem for ingen termoterapi.

Delhypotese 2:

En intervention med termoterapi, bestående af min. 7 minutters ophold i min. 85°C miljø mindst 4 gange ugentligt i 6 mdr., vil hyppigere forårsage eradikation af koloniserende bakterier i lungerne, defineret ved ingen antibiotikaforbrug de sidste 14 dage før sidste studiedag (6 mdr. follow-up besøg), hos personer med persisterende lungeinfektion* frem for ingen termoterapi.

Delhypotese 3:

En intervention med termoterapi, bestående af min. 7 minutters ophold i min. 85°C miljø mindst 4 gange ugentligt i 6 mdr., vil resultere i en mindre "patogen" og mere diverse sammensætning af lungemikrobiomet hos personer med persisterende lungeinfektion* frem for ingen termoterapi.

*min. 2 dyrkninger fra luftveje (sputum, ekspektorat, bronchial lavage eller bronchoalveolær lavage) over seneste 24 mdr. med en af følgende bakterier: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Klebsiella oxytoca* eller *Klebsiella pneumoniae*.

Formål

Formålene med dette studie er at:

1) afgøre, hvorvidt en intervention med termoterapi, som defineret ovenfor, i et randomiseret kontrolleret studie (RCT) blandt forsøgspatienter med persisterende lungeinfektion vil kunne reducere mængden af bakterier* i BAL væske. Kontrolpatienter og interventionspatienter vil begge få standardbehandling. Det her stadie af studiet har også til formål at fungere som en gennemførlighedstest af det næste stadie beskrevet i 2).

2) afgøre under samme RCT som beskrevet ovenfor, hvorvidt en intervention med termoterapi, som defineret ovenfor, vil kunne forårsage eradikation af patogene bakterier* i lungerne hos forsøgspatienter med persisterende lungeinfektion.

3) karakterisere ændringer i lungemikrobiomet mellem kontrolpatienter og interventionspatienter under samme RCT som i 1) og dermed afgøre om lungemikrobiomet tilpasser sig/ændrer sig efter en intervention med termoterapi, som defineret ovenfor.

*dyrket min. 2 gange over 24 mdr. og bakterie af arten og species: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca* eller *Klebsiella pneumoniae*. Ligeledes skal bakterien være dyrket min. 1 gang efter antibiotikabehandling.

Baggrund

Normalt er bakterielle lungeinfektioner akutte såsom samfundserhvervet lungebetændelse og forsvinder typisk efter antibiotikabehandling uden at efterlade meget varig skade på lungerne [1]. Men en stor del af personer med forstyrret clearance af slim og/eller forstyrret lungeimmunsystem får persisterende lungeinfektioner, som kan være livslange, normalt ikke forsvinder selv med antibiotika og kan i høj grad øge sygelighed og dødelighed [1]. Disse vedvarende lungeinfektioner er således karakteriseret ved stabile perioder med akutte forværringer (exacerbationer) indimellem, hvilket kan give lignende forløb som ved kroniske lungesygdomme såsom astma, kronisk obstruktiv lungesygdom (KOL) og bronkiektasi [1-4]. Oftest er bakterierne: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) og *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) involveret og er forbundet med hyppige exacerbationer, øget dødelighed og signifikant forringelse af livskvalitet [4-10]. Samtidigt er sandsynligheden for eradikation meget lav, når bakterierne koloniserer lungerne, pga. dannelse af biofilm [11-14].

Biofilm består af vand (>70 vægt%) samt extracellulær polymer substans (polysakkarider, proteiner og DNA) og har bl.a. til formål at beskytte bakterierne mod

antibiotika og tungmetaller, tilbageholde vand og næring, og promovere overførsel af genetisk materiale [15, 16]. Således vil biofilm bidrage til udvikling af antibiotikaresistens og fysisk forhindre antibiotika i at nå hen til bakterierne [17]. Dog er vand meget varmeledende, og biofilm har vist sig at være lige så varmeledende (med specifik ledningsevne på 0,6 Watt/meter*°C = specifik ledningsevne for vand), forklaret af at >70% af biofilms vægt udgøres af vand [18, 19]. Altså vil varme kunne overføres igennem biofilm og medføre bakteriedrab, uafhængigt af antibiotikaresistens. Det vides dog ikke, om der sker "patoadaptive" ændringer i lungernes mikrobiom som følge af termoterapi.

Ved hjælp af bakterie helgenom shotgun-sekventering (bakterie-WGS) kan det ikke kun vurderes, hvilke bakterier der er til stede i en prøve, men også tilstedeværelsen af andre mikroorganismer som vira, fager og eukaryote mikroorganismer [20]. Bakterie-WGS tillader yderligere estimering af genprofiler, ud fra hvilke mængden af unikke gener og metaboliske potentialeprofiler kan beregnes, hvor sidstnævnte angiver, hvilke metaboliske funktioner mikrobiomet har potentialet til at udføre [21-25]. Det metaboliske potentiale er særligt vigtigt, da man ved, at mikrobiomet primært interagerer med immunsystemet gennem produktion eller modifikation af metabolitter [21-25]. Fra genprofilerne kan specifikke gener af interesse ekstraheres, såsom antibiotikaresistensgener, og det kan bestemmes, om de udtagne bakterier har dem eller ej [26]. Imidlertid belyser bakterie-WGS ikke, om de sekventerede gener er funktionelle eller udtrykt under de givne omstændigheder (epigenetik), blot at de er til stede i genomerne [21].

Bakterievækst- og levetid er, blandt andre faktorer, særdeles afhængig af temperatur, således, at bakterier har hhv. en minimum-, optimum- og maksimumtemperatur, som de kan vokse i [27]. For diverse bakterier man har set i lungebetændelser hos patienter med kronisk lungeinfektion er de: *P. aeruginosa* 25-42°C med optimum på 37°C, *K. pneumoniae* 17-46°C med optimum på 35°C og for *S. aureus* 7-48,5°C med optimum mellem 30-37°C [28, 29]. Temperaturer højere end de maksimale værdier vil hæmme levetiden for bakterier, dog afhængig af tiden bakterierne befinder sig i den givne temperatur. Tiden det tager at reducere antallet af mikroorganismer med 90% (decimal reduktionstid) i 55°C er 304 sekunder for *P. aeruginosa* og 22 sekunder for *K. pneumoniae* [30, 31]. I 60°C er decimal reduktionstid på 49 sekunder for *P. aeruginosa*

og <2 sekunder for *K. pneumoniae* [30]. Disse estimeringer af decimal reduktionstid blev dog foretaget in vitro og ikke i mennesker.

Saunabadning er en form for helkrops-termoterapi, hvor de traditionelle finske saunaformer er de mest undersøgte, dvs. kort eksponering på 5-20 min med temperatur mellem 80-100°C og relativ luftfugtighed på 10-20% [32]. Blandt nogle af de undersøgte effekter var, at saunabadning min. to gange om ugen var associeret med en 28-44% lavere risiko for pneumoni [33] og lavere forekomst af lungesygdomme såsom astma, øvre luftvejsinfektion og forværring af KOL [34, 35]. Dog var studierne begrænsede af at være observationelle i design, have en lav sample-size eller ikke at have gjort brug af parakliniske undersøgelser til at registrere data på potentielle confoundere.

Det har aldrig været undersøgt om systematisk, hyppig saunabadning kan 1) have indflydelse på bakteriemængden i lungerne, 2) eradikere patogene bakterier i lungerne, så antibiotikaforbruget mindskes, og 3) kan ændre på sammensætningen og diversiteten af bakterier i lungerne.

Rationale for projektet - videnskabeligt perspektiv:

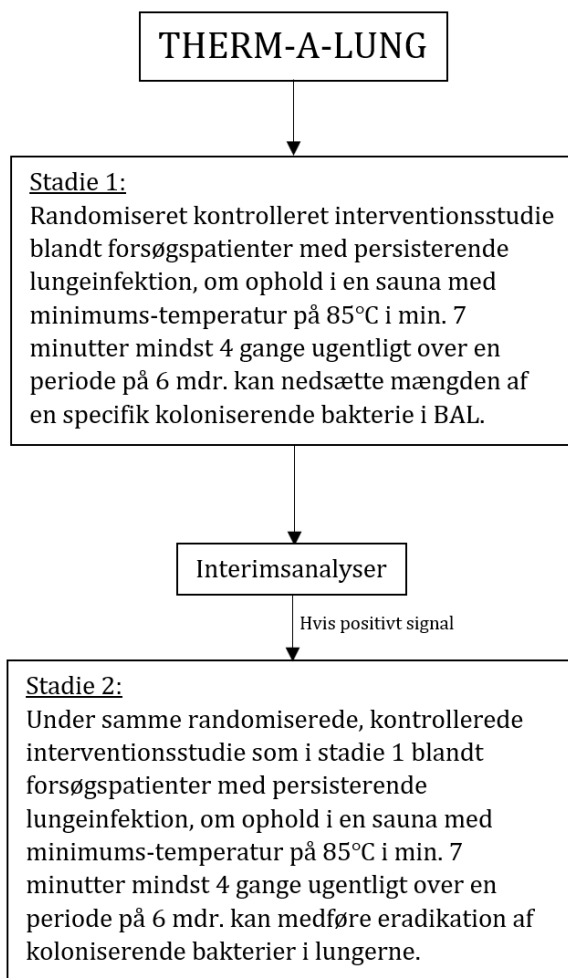
Patienter med persisterende lungeinfektioner er i livslang risiko for at få alvorlige lungebetændelser pga. kronisk bakteriekolonisation i lungerne. Desværre har eradikation af de koloniserende bakterier vist sig at være særdeles udfordrende, og flere antibiotikakure er ofte nødvendigt for at holde den kroniske lungeinfektion under kontrol. Dertil er det ikke grundigt undersøgt, hvorvidt disse antibiotikakure har effekt på sygdomskontrol, da biofilmdannelse forhindrer antibiotika i at dræbe bakterierne. Med dette studie vil vi undersøge, om hyppig saunabadning kan hæmme bakterievækst (og kronisk kolonisation af en eller flere bakterier) i lungerne hos patienter med persisterende lungeinfektion, medføre eradikation af bakterier i lungerne samt muligvis ændre på bakteriesammensætningen i lungerne. Således vil patienterne potentielt få øget velvære, livskvalitet og forbedret deres symptombyrde.

Metode

Design

Projektets studiedesign er opbygget jf. nedenstående figur:

Figur 1: Oversigt over stadier i THERM-A-LUNG projektet



THERM-A-LUNG vil foregå således, at der i stadie 1 rekrutteres 16 forsøgspatienter med persisterende lungeinfektion (se sample-size udregning), hvor det primære end-point er mængden af bakterier i BAL og som vil indgå i interimsanalyserne. Hvis der kommer et positivt signal fra de analyser, vil forsøget fortsætte i et stadie 2, hvor yderligere 134 forsøgspatienter med persisterende lungeinfektion rekrutteres og det primære end-point ændres til eradikation af koloniserende bakterier i lungerne. Altså udføres de samme undersøgelser, procedurer og analyser hos alle 150 forsøgspatienter i THERM-A-LUNG. Mikrobiomanalyser i form af bakterie-WGS udføres ligeledes på alle 150 forsøgspatienter, men kun hvis forsøget fortsætter i et stadie 2.

Hvervning og inklusion

Forsøgspatienter til projektet vil blive hvervet blandt personer, der har persisterende lungeinfektion (se nedenunder for in- og eksklusionskriterier). Rekruttering sker ved annoncer og opslag i lokalaviser, dagblade, via Lungeforeningen og dets medlemsblad, samt igennem lunge- og infektionsmedicin-ambulatorierne hos Herlev og Gentofte

Universitetshospital, fra Nordsjællands Hospital, fra Amager-Hvidovre Hospital, fra Bispebjerg Hospital og fra Rigshospitalet. Ved rekruttering via annoncer og opslag kan deltagerne pr. mail eller tlf. kontakte studiepersonale (se under Dataopsamling) og så få tilsendt den skriftlige deltagerinformation pr. mail eller andre måder, hvis deltageren ønsker dette. Der kan senere aftales et informationsmøde med studiepersonale på et af de deltagende afdelingers matrikler i et booket lokale der er godkendt til patientundersøgelse. Ved rekruttering via ambulatorier vil studiepersonalet i samarbejde med de behandlende ambulatorielæger på de ovennævnte hospitaler identificere og rekruttere deltagere, hvor informationsmødet afholdes i kombination med ambulatoriemødet (hvis deltageren viser interesse for at deltage), og deltagerinformation udleveres fysisk. I alle former for rekruttering vil deltageren oplyses om retten til en bisidder ved den første kontakt, og retten vil også fremgå af den skriftlige deltagerinformation. Til informationsmødet vil mundtlig deltagerinformation gives af studiepersonale, og det tilstræbes at studiepersonale ikke har vagt under rekruttering, og hvis vedkommende har så overgives vagttelefon til andet personale under mødet. Efter mødet gives op til 24 timers betænkningstid, og der vil indhentes informeret samtykke ved underskrevet samtykkeerklæring, forudsat at deltageren vil deltage i projektet.

Inklusionskriterier:

- Alder ≥ 18 år
- Habil og myndig
- Forceret ekspiratorisk volumen i første sekund (FEV₁) > 1,0 L
- Have haft et positivt dyrkningssvar fra ekspektorat, trakealsug eller BAL min. 2 gange de seneste 24 mdr. for bakterier af arten og species: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca* eller *Klebsiella pneumoniae*. Dertil min. 1 positivt dyrkningssvar efter behandling med antibiotika
- Er villig til at gå i sauna (min. 85°C varmt i min. 7 minutter) 4 gange om ugen i et halvt år eller undgå at gå i sauna i et halvt år

Eksklusionskriterier:

- Allergi over for lidocain og/eller midazolam

- Kontraindikationer til bronkoskopi*
- Tidligere alvorlig larynxspasme (intubationskrævende)
- Graviditet/ammende
- Svære sproglige problemer eller manglende evne til at give skriftligt informeret samtykke
- Svær psykisk sygdom som ikke er kontrolleret med medicin. NB: Patienter med kontrolleret psykisk sygdom kan indgå og vil blive spurgt på lige fod med andre

*Beskrevet under Appendix.

Sample-size (statistisk styrkeberegning/stikprøvestørrelse)

Stadie 1

Type 1 fejlgrænse (α) på 5%. Power ($1-\beta$) på 80%.

Det forventes at forsøgspatienter i kontrolgruppen efter 6 mdr, har en dyrkning fra BAL på gennemsnitlig $12,0 \cdot 10^3$ colony forming units (cfu)/mL med standard deviation (SD) på $3,0 \cdot 10^3$ cfu/mL. Forsøgspatienter i termoterapi-gruppen forventes at have en dyrkning fra BAL på gennemsnitlig $6,0 \cdot 10^3$ cfu/mL og samme SD.

Dette giver en sample size på 12 (6+6) personer. For at sikre statistisk styrke og for at tage forbehold for, at forsøgspatienter trækker sig ud af projektet, vil der rekrutteres 16 forsøgspatienter til projektet i stadie 1.

Stadie 2

Type 1 fejlgrænse (α) på 5%. Power ($1-\beta$) på 80%.

Gennemsnitlig forekomst af eradikation af (ved baseline) dyrkede bakterier fra lungerne i kontrolgruppen forventes at være 10% efter 6 måneder uden termoterapi. Forventet forekomst i termoterapigruppen forventes at være 30%.

Dette giver en sample size på 124 (62+62) personer. For at sikre statistisk styrke og for at tage forbehold for, at forsøgspatienter trækker sig ud af projektet og loss to follow-up, vil der rekrutteres 134 yderligere forsøgspatienter til projektet i stadie 2, dvs. i alt 150 forsøgspatienter rekrutteres i løbet af THERM-A-LUNG.

Mikrobiomundersøgelser

Tidligere erfaring viser, at der skal laves mikrobiomundersøgelser på mindst 25 personer i hver gruppe, der randomiseres til, for at kunne påvise en forskel.

Altså udføres mikrobiomundersøgelser kun, hvis der kan rekrutteres min. 25 personer i hhv. kontrol- og interventionsgruppen, dvs. det er forudsat at studie 2 af studiet kan udføres. I det tilfælde foretages mikrobiomundersøgelser på alle forsøgspatienter, da der rekrutteres 75 forsøgspatienter i hver gruppe i løbet af begge stadier.

Undersøgelser

Procedure for BAL beskrives under Udtagning af biologisk materiale.

Tabel 1: Oversigt over undersøgelser som hver forsøgspatient i begge stadier af THERM-A-LUNG skal gennemgå:

	Rekruttering	Inklusion	Efter 6 måneders intervention
Informeret samtykke	X		
Screening for egnethed i studiet	X		
Sygehistorie og klinisk undersøgelse		X	X
Graviditetstest ¹ (urin-hCG)		X	
Elektrokardiografi (EKG)		X	X
Blodprøver		X	X
BAL ²		X	X
Chronic Obstructive Pulmonary Disease Assessment Test (CAT)		X	X

Medical Research Council (MRC)-dyspnø skala		X	X
Vægtmåling		X	X
Højdemåling		X	
Lungefunktionsmåling (LFU, alm. spirometri)		X	X
6-minutters gangtest (6MWT)		X	X

¹Alle kvinder i den fertile alder, ²Laves inden for to uge efter inklusion og 6 mdr.

kontrolbesøg – hvis pt. afstår fra at have foretaget BAL, tilbydes trakealsug i stedet.

Blodprøver: Standard-blodprøver: Væsketal, nyretal, levertal (inkl. INR), CRP, glukose, leukocytter, differentialtælling, hæmoglobin- og jernindhold, procalcitonin.

Spørgeskemaer: Der anvendes standardiserede spørgeskemaer. CAT og MRC-dyspnø skala er korte og enkle tests, som giver en forståelse for sværhedsgraden af deres kroniske lungeinfektion.

Dataopsamling

Den primære daglige projektledelse varetages af den projektansvarlige (ph.d.-studerende). Derudover oplæres en projektgruppe (investigatorer), bestående af sundhedspersonale fra de involverede afdelinger til at bistå den projektansvarlige med rekruttering, prøvetagning/måling og evt. opfølgning af patienter.

I studiet vil forsøgspatienten ved inklusion og 6 måneders kontrolbesøg indkaldes til en samtale med personale mhp. sygehistorie inkl. medicinforbrug og objektiv undersøgelse. Dertil tages der standard-blodprøver (analyseres på Klinisk Biokemisk Afdeling på rekrutteret hospital), EKG, der måles vægt, lungefunktion, 6MWT samt spørgeskemaer udfyldes (CAT og MRC-dyspnø). Højde måles kun ved inklusion, og ligeledes vil der for kvinder i den fertile alder skulle tages en urinprøve ved inklusion til graviditetstest. Ved begge besøg aftales der tidspunkt for hvornår BAL kan udføres, om vidt muligt inden for to uger. Hvis forsøgspatienten afstår fra at have foretaget BAL, men stadig vil være med i studiet, kan de få foretag trakealsug i stedet, der kan gøres på dagen ved inklusion og 6 måneders kontrolbesøg. BAL-prøver og evt. trakealsugprøver

sendes til nærmeste Klinisk Mikrobiologisk Afdeling/Statens Serum Institut til mikroskopi, dyrkning og analyse. Bakterie-WGS udføres på alle BAL-/trakealsugprøverne udtaget til mikrobiomanalyser, men først når forsøget fortsætter i et stadie 2. Her ekstraheres bakterielt arvemateriale totalt fra humant vha. DNA-ekstraktionskits, der ødelægger humane celler og DNA, således at humant DNA ikke genanalyseres, og det kun er bakteriegenener der sekventeres. Herefter analyseres de sekventerede gener for bakterieslægt og -art samt specifikke genprofiler, der belyser bakteriernes metaboliske potentiale og eventuelle antibiotikaresistensgener. Endelig vil der til 6 måneders kontrolbesøg blive spurgt ind til, om forsøgspatienten fulgte interventionen/ingen intervention.

Overlevelse og død (inkl. dødsårsag) registreres fra Dødsårsagsregisteret (DAR). Data, der opsamles fra forsøgspatienternes patientjournaler, er beskrevet under "Oplysning fra patientjournaler. Indsamlede data vil blive behandlet fortroligt af personalet tilknyttet projektet. Data vil blive rapporteret i elektroniske Case Report Forms (eCRF) specifikt for hver patient. CRF opbevares i arkiv på de involverede afdelinger i 5 år.

Randomiseret kontrolleret interventionsstudie (RCT)

Studiet vil blive udført som et randomiseret, kontrolleret, "open label", multicenter interventionsstudie hos personer med persisterende lungeinfektion (se specifikke inklusions- og eksklusionskriterier ovenfor i afsnit om Hvervning og inklusion). Der vil i først stadie inkluderes 16 patienter hos de deltagende afdelinger med opstart 1. oktober 2022, hvorefter der udføres interimanalyser. Hvis der kommer positivt signal ud fra de analyser, rekrutteres 134 yderligere patienter i stadie 2, dvs. at 150 i alt vil deltage i Intention To Treat analysen af det primære outcome. Randomisering stratificeres for alder>65/alder≤65 og allerede eksisterende lungesygdom (astma, KOL, interstitiel lungesygdom og bronkiektasi inkl. cystisk fibrose og primær ciliær dyskinesi). Studiet forventes afsluttet oktober 2026.

I studiet randomiseres forsøgspatienter 1:1 til henholdsvis kontrolgruppe og interventionsgruppe jf. nedenstående:

- a) Kontrolgruppe: Må ikke gå i sauna i 6 mdr. Pt. der ved f.eks. en forglemmelse, kommer til at gøre det, forbliver dog i studiet, for at undgå at indføre bias. Det vil

blive registreret som en "protocol violation", men patienten vil indgå i Intention To Treat analyse og modified Intention To Treat analyse.

- b) Interventionsgruppe: Skal gå i sauna (min. temperatur 85°C) min. 4 gange om ugen i 6 mdr. Hver saunabadning skal vare mindst 7 min. Forsøgspatienterne får refunderet udgifter til abonnementkort til valgfri svømmehal/sauna under perioden.

Udtagning af biologisk materiale

Blodprøverne tages ved venepunktur. Der udtages maksimalt 30 ml pr. besøg, dvs. max 60 mL jf. tabel 1.

BAL foretages som led i en bronkoskopi undersøgelse, dvs. faste 6 timer før procedure samt tørste 2 timer før, let sedation med 5-10mg intravenøst midazolam og lokalbedøvelse med 2-3 mL lidocain-gel 2% i næsehulen/svælg [36]. Dernæst føres bronkoskopet (Olympus model BF-H190; Waltham, MA, USA, ydre diameter distalt 5,5 mm) ind transnasalt eller gennem mund med bidering og lidocain-gel 2% på stemmelæber samt trachea, og skopet føres ned til 8./9. bronkiesegment af højre og venstre lunge. Herefter forskyldes/rensens arbejdskanalen med 20 ml isotonisk saltvand, hvorefter der skiftes til afsugningsslange til opsamlingsbeholder, og der foretages skylning med 3 x 50-60 ml isotonisk saltvand i det alveolære lungevæv [36]. Prøverne opsamles og opbevares i køleskab (4-8°C), indtil de sendes til KMA/SSI. Under proceduren overvåges sederingsgrad, vejrtrækning, puls, iltmætning og blodtryk samt efter proceduren. BAL udføres af læge oplært i bronkoskopi og BAL, assisteret af lungesygeplejersker/klinisk personale og superviseret af speciallæge.

Hvis forsøgspatienten er i behandling med adenosin-diphosphat hæmmere (clopidogrel, prasugrel og ticagrelor), pauseres behandling i 5 dage før BAL, hvis i behandling med acetylsalicylsyre (75-150 mg dagligt), dabigatran eller edoxaban, pauseres i 3 dage før BAL, hvis i behandling med rivaroxaban eller apixaban, pauseres i 2 dage før BAL. Antitrombotisk behandling genoptages dagen efter BAL. Hvis forsøgspatienten er i behandling med warfarin, skal International Normalized Ratio (INR) være <1,5 ved blodprøve taget på inklusionsdagen for ikke at opfylde kontraindikation for bronkoskopi (se Appendix).

Trakealsug udføres ved at bruge trakealsugsæt, der sættes op med prøveglas og sugekateter, hvis spids påføres lidocain 2%-gel [37]. Sugekateteret føres ind (uden sug) igennem forsøgspersonens næse og ned i svælget, til der mærkes modstand mod stemmelæberne, hvorefter forsøgspersonen bedes at tage en dyb indånding eller hoste, og suget føres yderligere 3-5 cm ned, og der suges i højst 15 sekunder ad gangen (og op til 5 mL sekret). Herefter trækkes sugekateteret op uden sug for at forhindre opblanding med øvre luftvejssekreter og kateteret skylles igennem med 1-2 mL isotonisk saltvand [37].

Forskningsbiobank

Der oprettes en forskningsbiobank for opbevaring af blodprøver, sputumprøver og BAL-prøver. Der vil i alt udtages op til 60 mL blod fra hver forsøgsperson. Disse analyseres for at tjekke helbredsstatus som forklaret ved tabel 1. Af BAL-prøver tages der 30 mL pr. besøg, altså 60 mL pr. person (ved evt. trakealsug-prøver så op til 5 mL pr. besøg, altså 10 mL pr. person). Alle prøver opbevares i fryser i et aflåst rum med henblik på analyse inden projektets afslutning. Sputumprøverne/BAL-prøverne analyseres for at se hvilke og hvor mange bakterier, der er i de nedre luftveje. Der foretages mikrobiomundersøgelser (se Dataopsamling) på BAL-prøverne (evt. trakealsug-prøver) for at karakterisere lungemikrobiomet hos forsøgspersonerne ved baseline og efter 6 mdr. Alle prøver opbevares i pseudoanonymiseret form, hvor de analyseres og vil blive gjort i årene efter rekruttering er færdiggjort. Denne forskningsbiobank vil anvendes til at besvare de i denne protokol beskrevne hypoteser, inklusive substudier. Det biologiske materiale i forskningsbiobanken opbevares frem til endelig afslutning af projektet, (forventet oktober 2026), hvorefter alt overskydende materiale overgår til en biobank til fremtidig forskning (se nedenunder).

Biobank til fremtidig forskning

Der er hentet tilladelse fra Videnscenter for Dataanmeldelser til at oprette en ny biobank til fremtidig forskning med opbevaring af det overskydende materiale. Efter projektets og forskningsbiobankens ophør vil det overskydende materiale overføres til denne nye biobank til fremtidig forskning inden for lungeinfektioner. Brug af dette materiale til ny forskning skal godkendes af Videnskabsetisk Komité, og der vil som udgangspunkt indhentes nyt samtykke fra forsøgsparticipanterne til at bruge materialet, medmindre Videnskabsetisk Komité dispenserer for dette. Prøverne (det overskydende

materiale fra forskningsbiobanken) vil blive låst væk og opbevaret pseudoanonymiseret i 5 år i henhold til gældende lovgivning inkl. databeskyttelsesreglerne. Det skal siges, at informeret samtykke til deltagelse i projektet giver tilladelse til, at biologisk materiale kan opbevares i forskningsbiobanken og det overskydende materiale i biobanken til fremtidig forskning.

Risici, bivirkninger og hændelser

Saunabadning bliver anset for at være meget sikkert, også for patienter med bevaret lungefunktion (FEV₁ på >80% af forventet normalværdi) [32]. De mest væsentlige komplikationer er dehydrering og overophedning, der dog er sjældne, indtræder langsomt og først efter >20 min pr. session [38], hvor forsøgspatienterne her kun er i sauna i 7-10 min, og risikoen for komplikationer derfor minimeret [39]. Givet den relativt lave luftfugtighed på 10-20% i en traditionel sauna [40], er risikoen for overophedning meget lav, da kroppen kan køle sig af ved fordampning af sved på huden [41]. Dertil kan forsøgspatienterne selv gå ud af en sauna, hvis der bliver behov for det.

Ved udtagning af blodprøver ses hyppigt (hos 5-15%) forbigående misfarvning af indstiksstedet som følge af en mindre blodansamling under huden (blå mærker). Derudover er der risiko for let smerte ved indstik og minimal risiko for infektion.

Der er ingen kendte risici og bivirkninger forbundet med opsamling af urinprøver.

Trakealsugning kan give ubehag i form af irritation af næseslimhinden, kvælningss fornemmelse og kraftig hoste, men forsøgspersonen vil altid være i stand til at trække vejret, og hoste er med til at gøre undersøgelsen vellykket. Komplikationer er sjældne, men vil være selvlimiterende blødning fra næsehulen og i meget sjældne tilfælde besvimelse og bronkospasme. Dertil bruges 2%-lidocain gel (bivirkninger beskrevet længere nede) til trakealsug.

Bronkoskopiundersøgelser foregår i let sedation med lokalbedøvelse i næse, svælg, stemmelæber og luftrør. BAL har følgende bivirkningsprofil [42]: 0,26% for hypoksæmi, 0,17% for blødning, 0,08% for lungeødem, 0,08% for bronkospasme, 0,08% for hypertension og 0,08% for dyspnø. For at undgå bivirkningerne (fra både bronkoskopi og sederende lægemidler) bliver forsøgspatienterne monitoreret for sederingsgrad, vejtrækning, puls, iltmætning og blodtryk under proceduren. Dertil bliver der foretaget

lægeundersøgelse samt taget forprøver (blodprøver, EKG og spirometri) til proceduren for at vurdere behov for anæstesipersonale, og om forsøgspersonen kan gennemgå bronkoskopi, ligesom disse bliver gennemgået af bronkoskopøren på undersøgelsesdagen.

Ved bronkoskopiundersøgelser bruges lidocain 2% gel og intravenøst midazolam.

Lidocain har jf. pro.medicin.dk følgende bivirkninger:

Sjældne (0,01-0,1 %)	Allergiske reaktioner, Anafylaktisk reaktion.
----------------------	---

Systemisk absorption kan medføre alvorlige bivirkninger fra centralnervesystemet (respirationsdepression/bevidstløshed) samt kardiovaskulære bivirkninger.

Midazolam har jf. pro.medicin.dk følgende bivirkninger:

Almindelige (1-10 %)	Kvalme, Opkastning. Bevidsthedstab, Sedation. Somnolens. Respirationsdepression.
Ikke kendt hyppighed	Angioødem.

Det skal siges, at studierne her ikke undersøger terapeutisk, forebyggende eller diagnostisk effekt og sikkerhed af lidocain og midazolam eller har det formål at opnå ny viden om deres farmakologiske virkninger. Disse bruges kun som værktøjer for at kunne udføre bronkoskopi og gives også som standard før en diagnostisk bronkoskopiundersøgelse i hospitalsregi. Skulle der mod forventning opstå alvorlige relaterede bivirkninger (SAR), vil produktresuméerne for lidocain og midazolam bruges som reference.

Investigator skal rapportere alle alvorlige hændelser/bivirkninger (SAR) til sponsor hurtigst muligt. Således kan sponsor omgående rapportere videre til Lægemiddelstyrelsen og VEK senest 7 dage efter, at sponsor har fået kendskab til en sådan formodet bivirkning. Samtidig underrettes forsøgsansvarlige på de øvrige centre.

Der udarbejdes en årlig liste over alle alvorlige ventede og uventede bivirkninger samt hændelser, som er indtruffet i forsøgsperioden, og en rapport om forsøgspersonernes sikkerhed, som indsendes til Videnskabsetisk Komité. Desuden rapporteres alle bivirkninger og hændelser ved forsøgets afslutning i den endelige rapport til Videnskabsetisk Komité.

Statistiske analyser

Stadie 1:

Primær end-point:

- Ændringer i bakterievækst (målt i cfu/mL) fra BAL¹ efter 6 mdr.

Sekundære end-points:

- Eradikation af dyrkede bakterier² fra baseline, defineret ved ingen brug af antibiotika de seneste 14 dage fra 6 måneders follow-up besøg.
- Antal indlæggelser for alle årsager eller død inden for 6 mdr.
- Fysisk performance målt ved gangdistance på 6MWT
- Antal antibiotikakure³ inden for 6 mdr.
- Ændringer i FEV₁ efter 6 mdr.
- Ændringer i kropsmasseindex (BMI)⁴ efter 6 mdr.
- Klinisk relevante ændringer i CAT-score efter 6 mdr.
- Ændringer i status fra MRC-dyspnø score fra <3 til ≥3, efter 6 mdr.
- Forskel på sammensætning af lungemikrobiomet efter 6 mdr.
- Forskel på diversitet af lungemikrobiomet efter 6 mdr.

¹Hvis patienten afstår fra at have BAL udført, tilbydes trakealsugning i stedet.

²*Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Staphylococcus aureus, Achromobacter xylosoxidans, Haemophilus influenzae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae*

³Alle slags antibiotika, der bruges mod luftvejssygdomme.

⁴BMI tab på mere end 1 enhed.

Stadie 2:

Primær end-point:

- Eradikation af dyrkede bakterier¹ fra baseline, defineret ved ingen brug af antibiotika de seneste 14 dage fra 6 måneders follow-up besøg.

Sekundære end-points:

- Antal indlæggelser for alle årsager eller død inden for 6 mdr.
- Fysisk performance målt ved gangdistance på 6MWT
- Ændringer i bakterievækst (målt i cfu/mL) fra BAL² efter 6 mdr.
- Antal antibiotikakure³ inden for 6 mdr.

- Ændringer i FEV₁ efter 6 mdr.
- Ændringer i BMI⁴ efter 6 mdr.
- Ændringer i CAT-score efter 6 mdr.
- Ændringer i status fra MRC-dyspnø score fra <3 til 3≥, efter 6 mdr.
- Forskel på sammensætning af lungemikrobiomet efter 6 mdr.
- Forskel på diversitet af lungemikrobiomet efter 6 mdr.

¹*Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Staphylococcus aureus, Achromobacter xylosoxidans, Haemophilus influenzae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae*

²Hvis patienten afstår fra at have BAL udført, tilbydes trakealsugning i stedet.

³Alle slags antibiotika, der bruges mod luftvejssygdomme.

⁴BMI tab på mere end 1 enhed.

Oplysninger fra patientjournaler

Der indhentes ingen oplysninger fra patientjournaler, før der er indhentet informeret samtykke fra forsøgspersoner. Til identificering og rekruttering af deltagere i ambulatorierne nævnt under "Hvervning og inklusion" kan de behandlende ambulatorielæger videregive navn, mødetid i ambulatoriet og information om egnethed (jf. de tidligere forklaret in- og eksklusionskriterier) på deltagerne til studiepersonale mhp. at holde informationsmøde, hvis deltageren viser interesse for projektet. Der indhentes studierelevante oplysninger fra forsøgspersonernes patientjournaler efter inklusion i studierne (informationer som skal bruges til den studiespecifikke Case Report Form, eller svarende til data der skal indhentes til efterfølgende godkendte tillægsprotokoller). Der vil registreres følgende data ved inklusion i studiet: demografiske data, sundhedstilstand, aktuelt og tidligere medicinforbrug, aktuelle og tidligere sygdomme, sværhedsgrad og udvikling af disse sygdomme. Løbende under studiet indhentes oplysninger om indlæggelser, indlæggelsesårsag, medicinforbrug, eventuelle nye diagnoser. Disse oplysninger bruges til at besvare de beskrevne hypoteser.

Ved informeret samtykke fra forsøgspersoner gives der tilladelse til, at forsøgsansvarlige kan indhente disse oplysninger fra patientjournalen. Samtykket giver

ligeledes forsøgsansvarlige, COP:TRIN og dennes repræsentanter samt eventuel kontrolmyndighed direkte adgang til at indhente oplysninger i patientens journal m.v., herunder elektronisk journal, med henblik på at se oplysninger om forsøgspersonens helbredsforhold, som er nødvendige som led i gennemførelsen af forskningsprojektet samt i kontroløjemed, herunder egenkontrol, kvalitetskontrol og monitorering, som disse er forpligtet til at udføre.

Økonomi

Initiativet til forsøget af taget af Sponsor, professor Jens-Ulrik Stæhr Jensen og understøttet af styrekomiteen for COP:TRIN (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Trial Network) og Lungemedicinsk Afdeling, Herlev og Gentofte Universitetshospital. Studiets gennemførelse garanteres af sponsor. Der søges penge fra fonde til de forsøgsansvarlige personer (forskere og vejledere), aflønning af hjælpepersonale, betaling af bronkoskopi procedurer, medikamenter ifm. dette, laboratorieundersøgelser, udstyr og intervention (abonnement til brug af sauna). Efterhånden som støtte opnås vil Videnskabetisk Komité og forsøgsparticipanterne blive oplyst om hvem støttegiverne er, hvor stort et beløb de hver bidrager med, hvordan støtten indgår i forsøget f.eks. i form af aflønning af personale eller undersøgelser mm. Derudover oplyses det også, om støtten udbetales direkte til forsøgsansvarlige, deres afdeling/institut eller andet, og om de forsøgsansvarlige har økonomisk tilknytning til støttegiverne.

De forsøgsansvarlige er ikke økonomisk knyttet til private virksomheder, fonde m.v., med interesser i det pågældende forskningsprojekt.

Vederlag/ydelser

Der ydes vederlag på 1000 kr til forsøgspatienter pr. bronkoskopiundersøgelse for ulempegodtgørelse, da der i projektet ikke er nogen mulig behandlingsgevinst for forsøgspatienterne. Altså ydes 2000 kr til hver forsøgspatient i løbet af projektet, hvis de får udført bronkoskopiundersøgelser.

Offentliggørelse af resultater

Forsøget er registreret på clinicaltrials.gov (ID: NCT05351242). Resultaterne fra projektet vil publiceres i et tidsskrift uanset om de er positive, negative eller inkonklusive med forfatterskab iht. Vancouver bestemmelserne. Medforfatterskab

tildeles de personer, der har stået for studiedesign samt rekrutteringssites tildeles min. ét medforfatterskab, og for hver 15 patienter der rekrutteres, tildeles ét ekstra medforfatterskab. Såfremt publikation i videnskabeligt tidsskrift ikke er muligt, vil forsøgets resultater blive offentliggjort i rapportformat, som vil blive gjort tilgængelig via internettet.

Videnskabsetisk redegørelse

Studiet udføres efter Helsinki-deklarationen og gennemføres efter reglerne i lov om personoplysninger og Sundhedsloven. Databeskyttelsesforordningen og databeskyttelsesloven vil overholdes. Der søges godkendelse af Videnscenter for Dataanmeldelser. Hvervning og inklusion vil foregå som tidligere beskrevet. Deltagelse forudsætter en underskrevet samtykkeerklæring. Patienterne kan til enhver tid trække sit deltagelsessamtykke tilbage og træde ud af forskningsprojektet, uden at dette påvirker deres ret til nuværende eller fremtidig behandling. Patienter, der ikke ønsker at deltage i forsøget, vil få tilbudt behandling efter gældende retningslinjer. Patienten har endvidere ret at medbringe en bisidder til informationssamtalen og har krav på betænkningstid inden evt. samtykkeerklæring underskrives. Hvis der under forsøget fremkommer væsentlige oplysninger om den enkeltes helbredstilstand, vil dette oplyses såvel skriftligt som mundtligt overfor patienten, medmindre vedkommende har frabedt sig dette på forhånd i den underskrevne samtykkeerklæring.

Patienter med persisterende lungeinfektioner frygter akutte svære lungebetændelser, da det øger dyspnø, hoste, opspyt og er associeret med betydelig morbiditet og mortalitet. Indtil videre har eradikation af særligt patogene bakterier i lungerne vist sig at være udfordrende, efter kolonisation. Det potentielle gavn af dette projekt er at kunne forhindre akutte forværringer og derved kunne reducere logistik og omkostninger ved indlæggelser og langtidsbehandling af sygdommen. Derudover kan projektet potentielt gavne ved at øge livskvaliteten og livstiden af patienter med persisterende lungeinfektion og mindske behovet for langvarig antibiotikabehandling, der også er associeret med bivirkninger. Procedurerne i studiet udføres af professionelle, og saunabadning anses for at være meget sikkert. Vi mener på baggrund af dette, at forsøget er videnskabsetisk forsvarligt og at forsøgsparticipanterne ikke vil blive udsat for uforsvarlige risici.

Udelukkelse fra eller afbrydelse af forsøg

Hvis lægen, der er ansvarlig for undersøgelsen, skønner det nødvendigt, kan den pågældende på hvilket som helst tidspunkt afslutte undersøgelsen, hvis der foreligger en medicinsk begrundelse, en sikkerhedsrisiko, eller andre omstændigheder. Det skal dog ske efter aftale med den koordinerende investigator. Forsøgspersonen kan også når som helst, som nævnt i ovenstående afsnit, tilbagetrække sit informerede samtykke og træde ud af undersøgelsen. Det vil ikke få konsekvenser for den videre behandling.

Oplysning om erstatning- eller godtgørelsesordninger

Forsøget er omfattet af patienterstatningen.

Referencer

1. Pragman AA, Berger JP, and Williams BJ. Understanding persistent bacterial lung infections: clinical implications informed by the biology of the microbiota and biofilms. *Clin Pulm Med*. 2016 Mar;23(2):57-66.
2. Ryu, J.H. and P.D. Scanlon, Obstructive lung diseases: COPD, asthma, and many imitators. *Mayo Clin Proc*, 2001. 76(11): p. 1144-53.
3. Polverino, E., et al., The overlap between bronchiectasis and chronic airway diseases: state of the art and future directions. *Eur Respir J*, 2018. 52(3).
4. Redondo, M., et al., Global impact of bronchiectasis and cystic fibrosis. *Breathe (Sheff)*, 2016. 12(3): p. 222-235.
5. Chai, Y.H. and J.F. Xu, How does *Pseudomonas aeruginosa* affect the progression of bronchiectasis? *Clin Microbiol Infect*, 2020. 26(3): p. 313-318.
6. Loebinger, M.R., et al., Mortality in bronchiectasis: a long-term study assessing the factors influencing survival. *Eur Respir J*, 2009. 34(4): p. 843-9.
7. Berdah, L., et al., *Stenotrophomonas maltophilia*: A marker of lung disease severity. *Pediatr Pulmonol*, 2018. 53(4): p. 426-430.
8. Marsac, C., et al., airway infection is associated with lung disease severity in children with cystic fibrosis. *ERJ Open Res*, 2021. 7(2).
9. Martins, K.B., et al., and its Effects on the Prognosis of Bronchiectasis. *Microb Drug Resist*, 2021. 27(6): p. 823-834.
10. Amorim, A., et al., Chronic Bacterial Infection Prevalence, Risk Factors, and Characteristics: A Bronchiectasis Population-Based Prospective Study. *J Clin Med*, 2019. 8(3).
11. Martins, K.B., et al., and its Effects on the Prognosis of Bronchiectasis. *Microb Drug Resist*, 2021. 27(6): p. 823-834.
12. Amorim, A., et al., Chronic Bacterial Infection Prevalence, Risk Factors, and Characteristics: A Bronchiectasis Population-Based Prospective Study. *J Clin Med*, 2019. 8(3).
13. Kwok, W.C., et al., Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* colonization in non-cystic fibrosis bronchiectasis and clinical implications. *Respir Res*, 2021. 22(1): p. 132.
14. Langton Hewer, S.C. and A.R. Smyth, Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017. 4: p. CD004197.
15. Quan, K., et al., Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage and transport functions. *Crit Rev Microbiol*, 2021: p. 1-20.

16. Costa, O.Y.A., J.M. Raaijmakers, and E.E. Kuramae, Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front Microbiol*, 2018. 9: p. 1636.
17. Ricker, E.B. and E. Nuxoll, Synergistic effects of heat and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, 2017. 33(10): p. 855-866.
18. Pinel, I., et al., Assessment of the Impact of Temperature on Biofilm Composition with a Laboratory Heat Exchanger Module. *Microorganisms*, 2021. 9(6).
19. O'Toole, A., E.B. Ricker, and E. Nuxoll, Thermal mitigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, 2015. 31(8): p. 665-75.
20. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N: Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol* 2017, 35:833-844.
21. Sharpton TJ: An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci* 2014, 5:209.
22. Ho J, Yeoh YK, Barua N, Chen Z, Lui G, Wong SH, Yang X, Chan MC, Chan PK, Hawkey PM, Ip M: Systematic review of human gut resistome studies revealed variable definitions and approaches. *Gut Microbes* 2020:1-12.
23. Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, Pan Y, Li J, Zhu L, Wang X, et al: Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. *Nature Communications* 2013, 4:2151.
24. Abubucker S, Segata N, Goll J, Schubert AM, Izard J, Cantarel BL, Rodriguez-Mueller B, Zucker J, Thiagarajan M, Henrissat B, et al: Metabolic reconstruction for metagenomic data and its application to the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012, 8:e1002358.
25. Gillespie JJ, Wattam AR, Cammer SA, Gabbard JL, Shukla MP, Dalay O, Driscoll T, Hix D, Mane SP, Mao C, et al: PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infect Immun* 2011, 79:4286-4298.
26. Qi C, Hountras P, Pickens CO, Walter JM, Kruser JM, Singer BD, Seed P, Green SJ, Wunderink RG. Detection of respiratory pathogens in clinical samples using metagenomic shotgun sequencing. *J Med Microbiol*. 2019 Jul;68(7):996-1002. Epub 2019 May 28. Erratum in: *J Med Microbiol*. 2020 Jan;69(1):146.
27. Ratkowsky, D.A., et al., Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol*, 1982. 149(1): p. 1-5.
28. Tsuji, A., et al., The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. *Microbiol Immunol*, 1982. 26(1): p. 15-24.
29. Valero, A., et al., Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol*, 2009. 133(1-2): p. 186-94.
30. Spinks, A.T., et al., Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. *Water Res*, 2006. 40(6): p. 1326-32.
31. Papagianeli, S.D., et al., Dynamic modelling of *Legionella pneumophila* thermal inactivation in water. *Water Res*, 2021. 190: p. 116743.
32. Hannuksela, M.L. and S. Ellahham, Benefits and risks of sauna bathing. *Am J Med*, 2001. 110(2): p. 118-26.
33. Kunutsor, S.K., T. Laukkanen, and J.A. Laukkanen, Frequent sauna bathing may reduce the risk of pneumonia in middle-aged Caucasian men: The KIH prospective cohort study. *Respir Med*, 2017. 132: p. 161-163.
34. Laukkanen, J.A., T. Laukkanen, and S.K. Kunutsor, Cardiovascular and Other Health Benefits of Sauna Bathing: A Review of the Evidence. *Mayo Clin Proc*, 2018. 93(8): p. 1111-1121.
35. Ernst, E., et al., Regular sauna bathing and the incidence of common colds. *Ann Med*, 1990. 22(4): p. 225-7.
36. Herlev-Gentofte-Hospital. *Invasive undersøgelser: bronkoskopi, EUS, EBUS, EUS-B, Radialprobe, percutan biopsi, cryobiopsi og medicinsk thorakoskopi*. [cited 2022 March 24]; Available from:

- <https://vip.regionh.dk/VIP/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://vip.regionh.dk/VIP/Slutbruger/Portal.nsf/Main.html?open&unid=XC1257EEA0043551FC1257EDD004D03DA&dbpath=/VIP/Redaktoer/1501X8.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>.
37. Nordsjællands Hospital. *Trachealsekret, procedure for trachealsugning*. [cited 2022 August 6]; Available from: <https://vip.regionh.dk/VIP/Admin/GUI.nsf/Desktop.html?open&openlink=https://vip.regionh.dk/VIP/Slutbruger/Portal.nsf/Main.html?open&unid=XC125793A002CEEC1C1257936006CA1D7&dbpath=/VIP/Redaktoer/200021.nsf/&windowwidth=1100&windowheight=600&windowtitle=S%F8g>
 38. *Sauna Health Benefits: Are saunas healthy or harmful?* [cited 2022 March 3rd]; Available from: <https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/saunas-and-your-health>.
 39. Radtke, T., et al., *Acute effects of Finnish sauna and cold-water immersion on haemodynamic variables and autonomic nervous system activity in patients with heart failure*. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2016. **23**(6): p. 593-601.
 40. Hussain, J. and M. Cohen, *Clinical Effects of Regular Dry Sauna Bathing: A Systematic Review*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018. **2018**: p. 1857413.
 41. Pilch, W., et al., *Comparison of physiological reactions and physiological strain in healthy men under heat stress in dry and steam heat saunas*. *Biol Sport*, 2014. **31**(2): p. 145-9.
 42. Facciolongo, N., et al., *Incidence of complications in bronchoscopy. Multicentre prospective study of 20,986 bronchoscopies*. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2009. **71**(1): p. 8-14.

Appendix

Kontraindikationer til bronkoskopi

Kontraindikationer til bronkoskopi er beskrevet på Dansk Lungemedicinsk Selskabs hjemmeside: <https://lungemedicin.dk/bronkoskopi-med-biopsitagning/> (tilgået 11/03-22) og består af følgende: Venstre ventrikel ejection fraction $\leq 30\%$, hjertearytmi (sinus bradykardi med puls < 40 bpm, atrieflimren med puls > 120 bpm, supraventrikulær takykardi med puls > 140 bpm, akut koronar syndrom inden for de seneste 6 uger, dysreguleret diabetes (plasma-glukose $> 11,0$ mmol/L), ustabil astma bronkiale (bronkial hyperaktivitet, der ikke er kontrolleret med medicin), svært nedsat lungefunktion (forceret ekspiratorisk volumen i første sekund $< 1,0$ L), hypoksæmi (iltmætning $< 87\%$ trods ilttilskud), systolisk blodtryk > 200 mmHg, diastolisk blodtryk > 110 mmHg, trombocytal < 50 mia/L, International Normalized Ratio $> 1,5$