

# Årsrapport 2004-24

## Probiotikas effekt vid sekretorisk otit - kliniska, bakteriella och immunologiska aspekter.

Susann Johansson<sup>1</sup>, Kristian Roos<sup>2</sup>, Stig E Holm<sup>3</sup>,  
Eva Grahn Håkansson<sup>4</sup>, Magnus Ivarsson<sup>5</sup>,  
Ia Adlerberth<sup>1</sup>, Agnes E Wold<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Avd för klin bakteriologi, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg, <sup>2</sup>Öronmottagningen, Lundby Sjukhus, Göteborg, <sup>3</sup>Inst för medicinsk mikrobiologi och immunologi, Sahlgrenska akademien, Göteborg, <sup>4</sup>ESSUM och Inst för klinisk mikrobiologi, Umeå, <sup>5</sup>Öron-, näsa- och halskliniken, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg.

### Kontaktperson:

Susann Johansson, Tel: 031 – 342 46 70, Email: susann.m.johansson@vgregion.se

### Specifika mål:

Studera hur sprayning av alfa-streptokocker resp laktobaciller genom näsan påverkar kliniska symtom, bakteriellt status samt cytokiner hos barn med sekretorisk otit. Visionen är att utveckla en biologisk metod för behandling av sekretorisk otit och på så vis minska antibiotikaförbrukningen i patientgruppen.

### Hypotes:

Vår hypotes är att sprayning med alfa-streptokocker resp laktobaciller genom näsan stimulerar immunförsvaret i nasopharynx att bekämpa den kroniska infektion/inflammation som uppstått i mellanörat. Vi tror även att tillförsel av bakterier hämmar patogenerna och återrestaurerar den störda normalfloran i nasopharynx. På så vis får barnen ett naturligt skydd mot övre luftvägsinfektioner.

### Bakgrund:

Bakteriella övre luftvägsinfektioner är mycket vanliga hos barn och behandlas ofta med antibakteriella medel. Hög antibiotikakonsumtion innebär risk för resistensutveckling och spridning av resistensgener i samhället. Antibiotikabehandling eradikerar inte bara patogener, utan reducerar även normalfloran (1, 2). Då normalfloran störs tycks risken för bakteriella infektioner öka. Barn med sekretorisk otit samt barn med återkommande akuta otiter har färre antal alfa-streptokocker än friska barn (3-5). Patienter med återkommande streptokock tonsilliter har mindre antal alfa-streptokocker som interfererar med hemolytiska beta-streptokocker jämfört med friska individer (6, 7). Alfa-streptokockers inhiberande aktivitet mot patogener är mindre uttalad hos barn med rekurrent mediaotit resp sekretorisk otit jämfört med friska barn (8, 9).

Vi har visat att sprayning med alfa-streptokocker efter antibiotikabehandling skyddar mot såväl återkommande streptokock tonsillit som akut resp sekretorisk otit (10, 11). I en studie med daglig konsumtion av laktobaciller såg man en liten minskning av luftvägsinfektioner och antibiotikabehandling hos barn mellan 1-6 år (12).

Vanligaste agens vid akut mediaotit är *Haemophilus influenzae* och *Streptococcus pneumoniae*, men även *Moraxella catarrhalis* och grupp A streptokocker förekommer. Vid sekretorisk otit kan bakterier framodlas i 20-30% av fallen, medan detektionsgraden ökar till 75-95% med PCR (13-16). Med amplifiering av den universella 16S rRNA genen öppnas nya möjligheter att detektera svårödlade bakterier (17).

Bakteriers påverkan på immunförsvaret har rönt allt större intresse. Mer IL-1 beta och TNF-alfa detekterades vid sekretorisk otit när patogener samtidigt kunde framodlas än vid negativa odlingsfynd (18). Övriga cytokiner som påvisats vid sekretorisk otit är bl a IL-6, IL-10, TNF-alfa och IFN-gamma (19-21).

Tidigare studier har visat att streptokocker och laktobaciller inducerar höga nivåer av IL-12 från perifera mononucleära blodceller (PBMC)(24, 25). *Haemophilus influenzae* å andra sidan inducerar mycket mer IL-10 (26). Vi har visat att gram-positiva bakterier generellt stimulerar produktion av IL-12 från blodmonocyter, medan gram-negativa bakterier inducerar mycket mer IL-10 (27). Gram-negativer inducerar högre nivåer av IL-6 och IL-8 än gram-positiva bakterier, medan gram-positiverna stimulerar till mer TNF-alfa produktion. IL-1beta produktionen skiljer sig inte mellan de båda grupperna (28). Om antigenpresenterande celler lokalt i slemhinnan reagerar på samma sätt är inte känt.

### Projektbeskrivning:

Barn mellan 2-5 år med sekretorisk otit och som ska genomgå operation för insättande av plaströr inkluderas i studien. De får inte ha haft någon infektion veckan före studiestarten. Barn med hjärtklaffsdefekter, nedsatt immunförsvaret eller sår i näsa, nasopharynx eller mun exkluderas. Även antibiotikabehandlade patienter exkluderas. 20 barn erhåller spraybehandling med *S sanguis* (Alfa 89), 20 barn behandlas med *L rhamnosus* (LB 21), medan 20 patienter sprayas med placebo. Studien genomförs dubbel-blindt. 20 friska barn odlas och provtas från nasopharynx.

Spraybehandling pågår 14 dagar med sista dosen operationsdagens morgon. Föräldrarna sprayar 3 puffar i vardera näsborren två gånger dagligen. Bakteriestammarna tillverkas och frystorkas av ESSUM AB, Umeå (Eva Grahn-Håkansson). Vid studiestart löses bakterierna i 10 ml fys NaCl i sprayflaskan till koncentrationen  $10^9$  cfu/ml varvid flaskan sedan förvaras i kylskåp.

Dag 1 tas en semi-kvantitativ nasopharynxodling och antalet patogener registreras. Samtidigt tas sekret från nasopharynx för analys av cytokinerna IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF-alfa och IFN-gamma med enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Kliniskt öronstatus noteras.

Dag 14 noteras återigen kliniskt öronstatus. Under narkos tas ytterligare en nasopharynxodling samt sekret för ELISA analys av cytokiner enligt ovan. I samband med plaströrsinläggning sugas sekret från mellanörat. Sekretet odlas semi-kvantitativt samt analyseras med Multiplex PCR för detektion av *H influenzae*, *S pneumoniae* och *M catarrhalis*.

Sekretet analyseras även med cytokin ELISA. Ett prov tas från tubarostiet för att med pulsfältanalys identifiera insprayade stammar. Bakterierna odlas fram och artbestämmer. Därefter utförs stamidentifiering med pulsfält gelelektrofores.

Klinisk uppföljning sker efter 3 mån samt efter 1 år.

Odling: Odlingen utförs på Streptokock-Gbg-platta (anaerobt 2 dygn), HI-platta (CO<sub>2</sub> 2 dygn), Hästblod-platta (CO<sub>2</sub> 2 dygn), Rogosa-SL-platta (anaerobt 2 dygn) samt Brucella-platta (anaerobt 4 dygn). Växande kolonier räknas, gram-färgas, renodlas och nedfrysas. Sedvanliga bakteriologiska tester utförs för identifiering av *H influenzae*, *S pneumoniae*, *M catarrhalis* samt beta-hemolytiska streptokocker. Övriga bakterier artbestämmer med API (streptokocker, neisseria m fl arter) alternativt med PCR analys av 16S rRNA genen och efterföljande sekvensering.

### Genomfört arbete och delresultat:

Fram till dags dato har 50 patienter behandlats med nässpray. Odlingar har genomförts före och efter behandlingen och sekret har tagits för analys av cytokiner. Totalt har 32 patienter opererats. Öronsekret har odlats och sparats för cytokinanalys. 9 patienter har förbättrats efter behandlingen, men det är ännu okänt om patienterna fått aktiv substans och vilken bakterie det i så fall har varit. Av de 9 förbättrade patienterna har vätskan i örat helt försvunnit i 5 fall och operationen därför inställts.

17 friska individer har odlats och sekret är taget för cytokinanalys.

En metod för detektion av bakteriellt DNA i öronsekret med PCR håller på att utvecklas på laboratoriet. Hittills har vi sett att primers för *S. pneumoniae*, *H. influenzae* och *M. catarrhalis* tycks fungera, men det återstår en del arbete med att undersöka metodens känslighet.

*S. pneumoniae*, *H. influenzae* och *M. catarrhalis* bland framodlade bakterier har fortlöpande identifierats med bakteriologiska metoder som används i rutindiagnostiken.

### Plan för kommande år:

Målet är att inkludera resterande patienter under våren, men det beror givetvis på tillströmningen av patienter.

Framodlade bakterier kommer vidare att identifieras med bakteriologiska metoder såsom APIer. För identifiering av mer ovanliga bakterier anlitas CCUG för hjälp med typning.

Cytokinanalysen kommer att genomföras efter att den sista patienten opererats. PCR metoden förväntas bli färdigutvecklad under våren och sommaren och därefter analyseras öronsekretet. Det finns gott hopp om att projektet kommer att vara genomfört inom ett år.

### Referenser:

1. Agren K, Lundberg C, Nord CE. Effect of amoxycillin/clavulanic acid on the aerobic and anaerobic tonsillar microflora in the treatment of recurrent tonsillitis. Scand J Infect Dis 1990;22(6):691-7.
2. Brook I, Gober AE. Bacterial interference in the nasopharynx following antimicrobial therapy of acute otitis media. J Antimicrob Chemother 1998;41(4):489-92.

3. Bernstein JM, Faden HF, Dryja DM, Wactawski-Wende J. Micro-ecology of the nasopharyngeal bacterial flora in otitis-prone and non-otitis-prone children. *Acta Otolaryngol* 1993;113(1):88-92.
4. Brook I, Yocum P. Bacterial interference in the adenoids of otitis media-prone children. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18(9):835-7.
5. Fujimori I, Hisamatsu K, Kikushima K, Goto R, Murakami Y, Yamada T. The nasopharyngeal bacterial flora in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;253(4-5):260-3.
6. Roos K, Grahn E, Holm SE. Evaluation of beta-lactamase activity and microbial interference in treatment failures of acute streptococcal tonsillitis. *Scand J Infect Dis* 1986;18(4):313-9.
7. Fujimori I, Kikushima K, Hisamatsu K, Nozawa I, Goto R, Murakami Y. Interaction between oral alpha-streptococci and group A streptococci in patients with tonsillitis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106(7 Pt 1):571-4.
8. Tano K, Grahn-Hakansson E, Holm SE, Hellstrom S. Inhibition of OM pathogens by alpha-hemolytic streptococci from healthy children, children with SOM and children with rAOM. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2000;56(3):185-90.
9. Brook I, Gober AE. In vitro bacterial interference in the nasopharynx of otitis media-prone and non-otitis media-prone children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126(8):1011-3.
10. Roos K, Grahn E, Holm SE, Johansson H, Lind L. Interfering alpha-streptococci as a protection against recurrent streptococcal tonsillitis in children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1993;25(1-3):141-8.
11. Roos K, Hakansson EG, Holm S. Effect of recolonisation with "interfering" alpha streptococci on recurrences of acute and secretory otitis media in children: randomised placebo controlled trial. *Bmj* 2001;322(7280):210-2.
12. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *Bmj* 2001;322(7298):1327.
13. Hendolin PH, Markkanen A, Ylikoski J, Wahlfors JJ. Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2854-8.
14. Matar GM, Sidani N, Fayad M, Hadi U. Two-step PCR-based assay for identification of bacterial etiology of otitis media with effusion in infected Lebanese children. *J Clin Microbiol* 1998;36(5):1185-8.
15. Gok U, Bulut Y, Keles E, Yalcin S, Doymaz MZ. Bacteriological and PCR analysis of clinical material aspirated from otitis media with effusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001;60(1):49-54.
16. Post JC, Preston RA, Aul JJ, Larkins-Pettigrew M, Rydquist-White J, Anderson KW, et al. Molecular analysis of bacterial pathogens in otitis media with effusion. *Jama* 1995;273(20):1598-604.
17. Beswick AJ, Lawley B, Fraise AP, Pahor AL, Brown NL. Detection of *Alloiococcus otitis* in mixed bacterial populations from middle-ear effusions of patients with otitis media. *Lancet* 1999;354(9176):386-9.
18. Schousboe LP, Ovesen T, Eckhardt L, Rasmussen LM, Pedersen CB. How does endotoxin trigger inflammation in otitis media with effusion? *Laryngoscope* 2001;111(2):297-300.
19. Skotnicka B, Hassmann E. Cytokines in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(6):323-6.

20. Yellon RF, Doyle WJ, Whiteside TL, Diven WF, March AR, Fireman P. Cytokines, immunoglobulins, and bacterial pathogens in middle ear effusions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121(8):865-9.
21. Yellon RF, Leonard G, Marucha P, Sidman J, Carpenter R, Burleson J, et al. Demonstration of interleukin 6 in middle ear effusions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992;118(7):745-8.
22. Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol* 1998;10(5):399-415.
23. Abbas AK L, AH, Pober, JS. *Cellular and Molecular Immunology*. Fourth Edition ed; 2000.
24. Arva E, Andersson B. Induction of phagocyte-stimulating and Th1-promoting cytokines by in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with *Streptococcus pneumoniae*. *Scand J Immunol* 1999;49(4):417-23.
25. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, et al. Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1998;66(12):6058-62.
26. Arva E, Andersson B. Induction of phagocyte-stimulating cytokines by in vitro stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with *Haemophilus influenzae*. *Scand J Immunol* 1999;49(4):411-6.
27. Hessle C, Andersson B, Wold AE. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 2000;68(6):3581-6.
28. Hessle C AB, Wold AE. Differential induction of pro-inflammatory cytokines by Gram-positive and Gram-negative bacteria.