
Genetiska markörer vid återkommande mellanöreinflammationer och sekretorisk otit hos barn

LENA HAFRÉN, PETRI MATTILA OCH ELISABET EINARSDOTTIR

Mellanöreinflammationer är en av de vanligaste infektionerna hos barn och den vanligaste orsaken till att barn ordineras antibiotika. Långvarig vätska i mellanörat som en följd av mellanöreinflammation är den vanligaste orsaken till hörselnedsättning hos barn. I tvilling- och familjestudier har man påvisat att ärftlighet är en viktig riskfaktor för mellanöreinflammationer. Kandidatgenstudier har främst gällt gener som är involverade i de inflammatoriska processerna. Som vid många andra komplexa sjukdomar har resultaten varit magra och svåra att replikera. Ett fåtal helgenomstudier har gjorts på rätt små kohorter, men vägen att hitta flera riskgener för mellanöreinflammationer har bara börjat. Genom riskgenerna kunde man i framtiden hitta högriskpatienterna, förebygga mellanöreinflammationer och hitta nya behandlingar.

Mellanöreinflammationer är en av de vanligaste sjukdomarna bland barn och den vanligaste orsaken till antibiotikabehandling hos barn (1). De uppkommer oftast som en följsjukdom av virala övre luftvägsinfektioner, då mikrober kommer till mellanörat via örontrumpeten, som förenar nässvalget till mellanörat. Om symptomen är kraftiga behandlas de med antibiotika för att förhindra allvarliga komplikationer och för att lindra symtomen. När mellanöreinflammationerna är återkommande eller förorsakar långvarig

vätska i mellanörat (sekretorisk mellanöreinflammation, limöra) kan de behandlas kirurgiskt med insättning av trumhinnerör och eventuellt adenotomi (skrapning av nässvalgtonsillen)(2). Dessa ingrepp är bland de vanligaste orsakerna till narkos av barn.

Det finns olika överlappande fenotyper av mellanöreinflammationer. De vanligaste är akut mellanöreinflammation (AOM, acute otitis media), återkommande akut mellanöreinflammation (RAOM, recurrent acute otitis media) och sekretorisk otit (limöra, COME, chronic otitis media with effusion). Vid AOM har man vätska i mellanöra samt akuta infektionssymtom. Om AOM återkommer fler än tre gånger på sex månader eller fler än fyra gånger på ett år talar man om RAOM. Som definition på COME används ofta vätska i mellanöra i mer än tre månader.

Riskfaktorerna för mellanöreinflammationer beror både på faktorer hos värden och på miljöfaktorer. En vanlig riskfaktor är exponering för mikrober i stora familjer eller i stora dagvårdsgrupper. På samma sätt påverkar klimatet och årstiden exponeringen för mikrober. Passiv rökning är en annan riskfaktor; antagligen medför det irritation på svalgets slemhinna och påverkar eventuellt mikrobfloran i svalget. Amning kan vara en skyddande faktor, medan överdriven användningen av

SKRIBENTERNA

Lena Hafrén, ML, är otorinolaryngolog vid HUCS. Vid sidan av kliniskt arbete forskar hon i genetiska associationer vid mellanöreinflammationer hos barn.

Petri Mattila, docent, är otorinolaryngolog och klinisk mikrobiolog vid HUCS samt klinisk lärare vid HU.

Elisabet Einarsdottir, docent, är genetiker vid Karolinska Institutet i Sverige och Folkhälsans forskningscentrum i Helsingfors. Hon arbetar med olika genetiska projekt både i Sverige och i Finland.

napp har visat sig vara en riskfaktor. AOM och RAOM är vanligast hos barn under två år, vilket antagligen beror på att immunförsvaret inte är fullt utvecklat, och även på anatomiska faktorer så som att örontrumpeten är kort och oftare öppen hos småbarn.

De flesta barn har sporadiska mellanöreinflammationer, men ungefär 20 procent av barn har återkommande akuta mellanöreinflammationer eller sekretorisk mellanöreinflammation. Ärftlighet är en viktig riskfaktor för mellanöreinflammationer (3).

Genetiska studier kan förbättra den kliniska behandlingen av sjukdomar. Om man kan finna de genetiska riskfaktorerna för mellanöreinflammationer kan man förbättra förståelsen av patofysiologin av denna högprevalenta entitet och på så sätt eventuellt utveckla nya behandlingsformer. Information om riskgenerna kunde även användas för att upptäcka högriskpatienterna och för att sätta in preventiva åtgärder och behandlingar i rätt patientgrupp.

Forskningsmetoder

Tvilling- och familjestudier

Tvillingstudier är det klassiska sättet att studera ärftlighet. I genetiska termer är ärftlighet (h^2 , heritability) variansen av fenotypens variation som beror på genotyp. Identiska tvillingar har samma genom, medan icke-identiska tvillingar har samma genom till ungefär 50 procent. Tvillingar har emellertid samma miljöfaktorer, varvid det är möjligt att beräkna h^2 . Tvillingstudier på mellanöreinflammationer har gjorts i Norge, USA och Storbritannien (4–8).

I den norska frågeformulärbaserade studien med 4 247 tvillingar var ärftligheten 66–72 procent (8). I den prospektiva tvillingstudien i Pittsburg, Pennsylvania, där det deltog 168 par tvillingar och sju trillinggrupper, var ärftligheten 72–73 procent (5, 7). I Storbritannien samlade man in information om 1 689 tvillingar och beräknade att ärftligheten för akuta mellanöreinflammationer var 57 procent (6).

Ärftligheten kan även beräknas från släktträd, vilket har gjorts i vår familjekohort på Öron-, näs- och Halskliniken på HUCS (Helsingfors universitetscentralsjukhus). Ärftligheten för RAOM var 39 procent ($p = 7,3 \times 10^{-9}$), för COME 22 procent ($p = 4,6 \times 10^{-3}$) och för alla mellanöreinflammationer 48 procent ($p = 1,5 \times 10^{-11}$) (9).

Kopplingsanalyser

Kopplingsanalyser kan användas för att hitta genetiska regioner som disponerar för ett

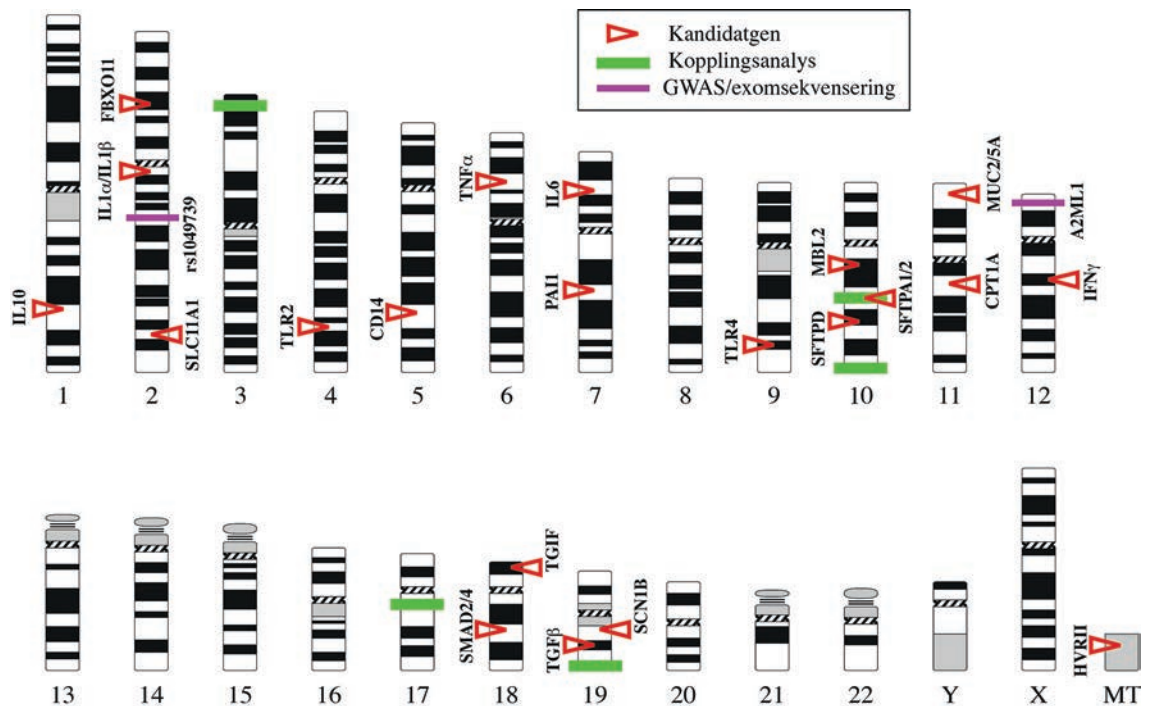
anlag. Regionerna hittas genom att genotypa markörer i släkter med åtminstone två individer med det undersökta anlaget. Traditionellt beräknar man att ett LOD-värde (logarithm of odds) på 3 eller högre är signifikant (10). Kopplingsanalyser är särskilt väl lämpade för identifiering av ovanliga eller ytterst ovanliga riskanlag (< 5% frekvens). Kopplingsanalyser på mellanöreinflammationer har gjorts i USA på två familjekohorter. I Minnesotakohorten upptäcktes koppling till COME och/eller RAOM på kromosom 10q26.3 (LOD 3,78) och 19q13.42-q13.43 (LOD 2,61) (11,12). I Pittsburgkohorten hittade man koppling till 17q12 (LOD 2,85) och 10q22.3 ($p = 2,6 \times 10^{-4}$) (13).

Kandidatgener

I kandidatgenstudier jämförs allelfrekvenserna bland patienter med ett visst anlag med friska kontroller. Ofta jämför man enskilda nukleotidpolymorfier (SNP, single nucleotide polymorphism). Valet av kandidatgen eller region baserar sig på en hypotes om dess roll i patogenesen av det undersökta anlaget eller sjukdomen. Det har gjorts ett antal kandidatgenstudier för mellanöreinflammationer och de positiva resultaten finns samlade i Figur 1. De flesta av studierna har koncentrerat sig dels på det ospecifika immunförsvaret, dels på cytokiner. Det ospecifika, dvs. medfödda, immunförsvaret är kroppens första försvar mot patogener och det är fullt utvecklat vid födseln. Det har en viktig immunfunktion innan det adaptiva immunsystemet har utvecklats. Till det ospecifika immunförsvaret hör att fungera som barriär, identifiera främmande material, aktivera komplementsystemet och starta inflammatoriska reaktioner. Cytokiner däremot är intercellulära signaleringsmolekyler som bland annat reglerar immunsvaret.

Generna MBL (Mannose-binding lectin), TLR (Toll-like receptor), CD14, och surfaktanter från det ospecifika immunförsvaret har associerats med benägenhet för återkommande mellanöreinflammationer och sekretorisk otit. Bland cytokinerna har man påvisat association mellan OM och flera interleukiner (IL), nämligen IL6, IL10, IL1 α , IL1 β , samt TGF β 1 (Transforming growth factor beta-1), IFN γ (interferon gamma), TNF α (Tumor necrosis factor alpha), och cytokinreceptorn CX3CR1 (Chemokine, CX3C motif, receptor 1) (14). Dessutom har också FBXO11 (F-box only protein 11), SMAD2 och SMAD4 i TGF β 1-banan associerats till RAOM samt COME.

Andra gener som har associerats till benägenheten för mellanöreinflammationer är



Figur 1. Ett sammandrag av riskgener och riskregioner inom genomet för mellanöreinflammationer (modifierad efter referens 18).

muciner (MUC), vissa HLA-typer (Human leukocyte antigen), SCN1B (Sodium channel subunit beta-1), SERPINE1 (Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1, även PAI1), SLC11A1 (Solute carrier family 11, Member 1) (15), CPT1A (Carnitine palmitoyltransferase I, lever) (16), TGIF (Transforming growth factor-beta-induced factor) (17) och HVR1I-regionen i mitokondriellt DNA. (18)

De flesta kandidatgenstudierna har bestått av rätt små kohorter, vilket riskerar att ge otillräcklig kraft för att hitta signifikanta resultat i denna högfrekventa fenotyp. Resultaten har inte alltid kunnat replikeras i andra kohorter och populationer, vilket gör att resultaten är osäkra. Studier på FBXO11 och TLR4 har dock varit väl genomförda med tillräckligt stora kohorter och med finkamning av regionen och positiva replikationer i andra kohorter och populationer (17, 19).

GWAS

Associationsstudier på helgenom (GWAS, genome-wide association study) utgår inte från en hypotes om kandidatgen, utan man genotyper hundratusentals till miljontals polymorfier (SNP) på hundra- till tusentals patienter och kontroller. GWAS-studier är väl lämpade för att identifiera relativt vanliga

riskanlag för komplexa sjukdomar (> 5 % frekvens). För mellanöreinflammationer finns det två publicerade GWAS-studier.

Den första GWAS-studien på mellanöreinflammationer publicerades 2012 av Rye et al. Studien gjordes på 416 australiska patienter med mellanöreinflammationer och 1 075 kontrollpatienter. Inga signifikanta resultat ($p < 10^{-8}$) uppnåddes, och när toppresultaten undersöktes i en annan australiensisk, och i en nordamerikansk kohort, kunde resultaten inte replikeras. (20)

I den andra GWAS-studien på mellanöreinflammationer, som var en nordamerikansk familjestudie på 143 familjer med totalt 373 patienter med besvärliga mellanöreinflammationer, fick man inte heller helgenomsignifikanta resultat. Genom att ytterligare studera de bästa resultaten i en annan nordamerikansk kohort uppnådde man ändå ett helgenomsignifikant resultat för SNP rs10497394 i en intergenisk region på kromosom 2 (21, 22).

Sekvensering

Exomsekvensering och helgenomsekvensering har de senaste åren använts mer och mer inom genetisk forskning i och med att kostnaderna har sjunkit. Med hjälp av dem

Termer	
<i>Nukleotid</i>	Organisk molekyl som är en byggsten i exempelvis DNA. Den består av en kvävebas (adenin, guanin, cytosin eller tymin i DNA), en sockermolekyl (dextoribos i DNA) och en (i DNA) eller flera fosfatgrupper.
<i>SNP (Single-nucleotide polymorphism)</i>	Enbaspolymorfi, en variation i DNA-sekvensen av en nukleotid (adenin, guanin, cytosin eller tymin). Största delen av variationerna är normala variationer, påverkar inte det protein som kodas och är inte orsaker till sjukdomar.
<i>Genotyp, genotypning</i>	Genotyp är en människas karakteristiska genetiska kod (DNA-sekvens) i en viss genetisk variant. Ofta används genotyp som referens för en specifik gen eller genetisk markör (till exempel SNP). Vid genotypning bestämmer man genotypen.
<i>Kopplingsanalys</i>	Kopplingsanalyser kan användas för att hitta genetiska regioner som disponerar för ett anlag. Regionerna hittas genom att man genotyper markörer i släkter med åtminstone två individer som har det undersökta anlaget och identifierar regioner som de drabbade delar.
<i>Sekvensering</i>	En genetisk forskningsmetod för att bestämma nukleotidsekvensen i DNA eller RNA. Vid <i>exomsekvensering</i> bestäms endast nukleotidsekvensen i de proteinkodande delarna av DNA, medan man i <i>helgenomsekvensering</i> även bestämmer sekvensen i övriga delar av genomet.

kan man även upptäcka mycket ovanliga, nya genetiska varianter. Än så länge har denna storskaliga sekvensering mestadels bara använts i ovanliga, icke-komplexa sjukdomar och till dags dato har bara en studie med denna slags DNA sekvensering publicerats inom mellanöreinflammationer. Genom att exomsekvensera två syslingar från ett filippinskt isolat, där prevalensen av mellanöreinflammationer är nästan 50 procent, hittade man en variant av A2ML1 (α -macroblobulin-like 1) som kandidatvariant för mellanöreinflammationer. Resultaten kunde bekräftas i 51 andra personer i samma isolat (LOD 7,5) och variationen visade sig bero på en duplikation (p.Ser829Trpfs*9). A2ML1 uttrycks i mellanörat hos möss, och den sjukdomsassocierade varianten är ovanlig, men den består i bärare med starkt ökad risk för mellanöreinflammationer (23).

Kohorter för mellanöreinflammation

HUCS har samlat in en kohort med familjer av finsk härkomst, där det finns barn med RAOM och/eller COME. Kohorten omfattar cirka 700 familjer, bestående av indexpatienter, deras syskon och föräldrar, cirka 2 500 patienter. Finländare är genetiskt rätt homogena, vilket förväntas göra det lättare att hitta riskgener i genetiska studier. Övriga stora kohorter med mellanöreinflammationer finns i USA (Minnesota och Pittsburg), Australien (Western Australian Family Study of OM och Western Australian Pregnancy Cohort (Raine) Study) och i Storbritannien (Oxford).

För andra komplexa sjukdomar har det inrättats internationella konsortier för att det ska gå att mer effektivt hitta riskvarianter och inom mellanöreinflammationer finns ett inofficiellt samarbete genom organisationen Otigen. HUCS-gruppen samarbetar med de andra europeiska och nordamerikanska grupperna. För att kunna uppnå entydiga resultat i konsortier är det viktigt att kriterierna för fenotypen är lika. Detta har delvis försumrats i studierna om mellanöreinflammationer och det är eventuellt en av orsakerna till att resultaten i en kohort inte har kunnat replikeras i en annan kohort. Ett annat tillvägagångssätt att undersöka komplexa sjukdomar är att studera isolerade populationer där en viss fenotyp är överrepresenterad. Genom att hitta genetiska varianter där kan man hitta genetiska riskfaktorer som även påverkar benägenheten för fenotypen i andra populationer.

Sammanfattning

Mellanöreinflammationer är komplexa sjukdomar och tvilling- och familjestudier har bevisat att den genetiska uppsättningen är en riskfaktor. Den genetiska riskfaktorn är komplex och består sannolikt av både vanliga varianter med låg risk effekt (till exempel varianter inom TLR4) och ovanliga varianter med hög risk (till exempel varianter inom A2ML1). I kandidatgenstudier har man hittat en del riskgener med hjälp av associationsanalys, men resultaten har inte alltid kunna replikeras. GWAS-studierna har än så länge

inte uppnått helgenomsignifikans ($p < 10^{-8}$). De kända genetiska riskfaktorerna varierar mellan olika kohorter och populationer. De flesta genetiska studier på mellanöreinflammationer har gjorts på RAOM och COME. I utvecklingsländer är kronisk suppurativ mellanöreinflammation vanlig (CSOM, chronic suppurative otitis media). Trots det finns det väldigt få studier om dessa. Målet med de genetiska studierna om mellanöreinflammationer är att hitta riskvarianter och att använda dem för att karakterisera högriskpatienter med effektivare prevention och behandling som mål.

Lena Hafrén
lena.hafrén@hus.fi

Petri Mattila
petri.mattila@hus.fi

Elisabet Einarsdottir
elisabet.einarsdottir@ki.se

Inga bindningar

Referenser

- Freid VM, Makuc DM, Rooks RN. Ambulatory health care visits by children: Principal diagnosis and place of visit. *Vital Health Stat* 1998;13:137:1–23.
- Mellanöreinflammationer (akuta) (online). God medicinsk praxis-rekommendationerna. Arbetsgrupp stiftad av Finska Läkarföreningen Duodecim, Barnläkarföreningen i Finland r.f., Finsk förening för otorhinolaryngologi, huvud- och halskirurgi r.f., och Allmänmedicinska föreningen i Finland rf. Helsingfors: Finska Läkarföreningen Duodecim, 2010 (citerad 26.11.2015). Tillgång via webbplatsen: www.käypähoito.fi
- Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosenfeld RM. Otitis media. *Lancet* 2004;363:465–473.
- Kvaerner KJ, Tambs K, Harris JR, Magnus P. Distribution and heritability of recurrent ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:624–632.
- Casselbrant ML, Mandel EM, Fall PA, Rockette HE, Kurs-Lasky M, et al. (The heritability of otitis media: A twin and triplet study. *JAMA* 1999;282:2125–30.
- Rovers M, Haggard M, Gannon M, Koeppen-Schomerus G, Plomin R. Heritability of symptom domains in otitis media: A longitudinal study of 1,373 twin pairs. *Am J Epidemiol* 2002;155:958–964.
- Casselbrant ML, Mandel EM, Rockette HE, Kurs-Lasky M, Fall PA, et al. The genetic component of middle ear disease in the first 5 years of life. *Archives of Otolaryngology -- Head & Neck Surgery* 2004;130:273–278.
- Kvestad E, Kvaerner KJ, Roysamb E, Tambs K, Harris JR, et al. Otitis media: Genetic factors and sex differences. *Twin Research* 2004;7:239–244.
- Hafren L, Kentala E, Jarvinen TM, Leinonen E, Onkamo P, et al. Genetic background and the risk of otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;76:41–44.
- Dawn Teare M, Barrett JH. Genetic linkage studies. *Lancet* 2005;366:1036–44.
- Daly KA, Brown WM, Segade F, Bowden DW, Keats BJ, et al. Chronic and recurrent otitis media: A genome scan for susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2004;75:988–997.
- Chen WM, Allen EK, Mychaleckyj JC, Chen F, Hou X, et al. Significant linkage at chromosome 19q for otitis media with effusion and/or recurrent otitis media (COME/ROM). *BMC Med Genet* 2011;12:124.
- Casselbrant ML, Mandel EM, Jung J, Ferrell RE, Tekely K, et al. Otitis media: A genome-wide linkage scan with evidence of susceptibility loci within the 17q12 and 10q22.3 regions. *BMC Med Genet* 2009;10:85.
- Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T, Jennings K, Matalon R, Block S, et al. Polymorphisms of immunity genes and susceptibility to otitis media in children. *PLoS One* 2014;9:e93930.
- Rye MS, Wiertsema SP, Scaman ES, Thornton R, Francis RW, et al. Genetic and functional evidence for a role for SLC11A1 in susceptibility to otitis media in early childhood in a western Australian population. *Infect Genet Evol* 2013;16:411–418.
- Gessner BD, Gillingham MB, Wood T, Koeller DM. (2013) Association of a genetic variant of carnitine palmitoyltransferase 1A with infections in Alaska native children. *J Pediatr* 163:1716–21.
- Rye MS, Wiertsema SP, Scaman ES, Oommen J, Sun W, et al. FBXO11, a regulator of the TGFbeta pathway, is associated with severe otitis media in western Australian children. *Genes Immun* 2011;12:352–359.
- Hafren L, Kentala E, Einarsdottir E, Kere J, Mattila PS. Current knowledge of the genetics of otitis media. *Curr Allergy Asthma Rep* 2012;12:582–589.
- Hafren L, Einarsdottir E, Kentala E, Hammaren-Malmi S, Bhutta MF, et al. Predisposition to childhood otitis media and genetic polymorphisms within the toll-like receptor 4 (TLR4) locus. *PLoS One* 2015;10:e0132551.
- Rye MS, Warrington NM, Scaman ES, Vijayasekaran S, Coates HL, et al. Genome-wide association study to identify the genetic determinants of otitis media susceptibility in childhood. *PLoS One* 2012;7:e48215.
- Allen EK, Manichaikul A, Chen WM, Rich SS, Daly KA, et al. Evaluation of replication of variants associated with genetic risk of otitis media. *PLoS One* 2014;9:e104212.
- Allen EK, Chen WM, Weeks DE, Chen F, Hou X, et al. A genome-wide association study of chronic otitis media with effusion and recurrent otitis media identifies a novel susceptibility locus on chromosome 2. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2013;14:791–800.
- Santos-Cortez RL, Chiong CM, Reyes-Quintos MR, Tantoco ML, Wang X, et al. Rare A2ML1 variants confer susceptibility to otitis media. *Nat Genet* 2015;47:917–920.

Summary

Genetic markers in recurrent and secretory otitis media in children

Otitis media (OM) is a complex disease with strong heritability. Its genetic background is complex and likely to be a mix of common risk variants of low effect size and rare variants of high-risk effect. A number of risk genes have been proposed as risk factors for OM through candidate-gene association studies, although published GWAS studies have failed to achieve genome-wide significance ($p < 10^{-8}$). The aim of genetic studies of OM is to gain deeper understanding of the genetic variants and thus to identify and characterize those at high risk; this allows development of optimal treatment strategies.