

# 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). Alfa-streptokockers inhiberande aktivitet mot patogener är mindre uttalad hos barn med rekurrent mediaotit resp sekretorisk otit jämfört med friska barn (6, 7).

Vi har visat att sprayning med alfa-streptokocker efter antibiotikabehandling skyddar mot såväl återkommande streptokock tonsillit som akut resp sekretorisk otit (8, 9). I en studie med

daglig konsumtion av laktobaciller såg man en liten minskning av luftvägsinfektioner och antibiotikabehandling hos barn mellan 1-6 år (10).

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 (11-14).

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 (15). Övriga cytokiner som påvisats vid sekretorisk otit är bl a IL-6, IL-10, TNF och IFN-gamma (16-18).

### **Projektbeskrivning:**

Barn mellan 2-5 år med sekretorisk otit där operation för insättande av plaströr i öronen planerades inkluderades i studien. De fick inte ha haft någon infektion veckan före studiestarten. Barn med hjärtklaffsdefekter, nedsatt immunförsvaret eller sår i näsa, nasopharynx eller mun exkluderades. Även antibiotikabehandlade patienter exkluderades. 20 barn erhöll spraybehandling med *S. sanguis* (Alfa 89), 20 barn behandlades med *L. rhamnosus* (LB 21), medan 20 patienter sprayades med placebo. Studien genomfördes dubbel-blindt. 20 friska barn odlades och provtog från nasopharynx.

Spraybehandling pågick 10-12 dagar med sista dosen operationsdagens morgon. Bakteriestammarna tillverkades och frystorkades av ESSUM AB, Umeå (Eva Grahn-Håkansson).

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

Dag 14 noterades återigen kliniskt öronstatus. Under narkos togs ytterligare en nasopharynxodling samt sekret för ELISA analys av cytokiner enligt ovan. I samband med plaströrsinläggning sögs sekret från mellanörat. Sekretet odlades semi-kvantitativt samt analyseras med PCR för detektion av *H. influenzae*, *S. pneumoniae* och *M. catarrhalis*. Sekretet analyserades även med cytokin ELISA.

### **Genomfört arbete och delresultat:**

Det kliniska arbetet är nu avslutat och resultaten håller på att sammanställas och bearbetas. Samtliga cytokinanalyser av nasopharynx- och öronsekreten är gjorda. PCR analyserna av öronsekreten är också klara. De kliniska resultaten är mycket spännande. I gruppen som behandlades med alfa-streptokocker var klart fler patienter botade eller mycket förbättrade vad gäller vätskan i mellanörat jämfört med barnen i placebogruppen. Fler barn i gruppen som behandlades med laktobaciller hade någon förbättring jämfört med placebogruppen. Preliminärt blev det ingen förändring i nasopharynx vad gäller antalet bakteriella patogener efter spraybehandlingen. Inte heller cytokinerna i nasopharynx förändrades i någon större omfattning; endast nivåerna av IL-8 ökade efter laktobacillbehandlingen. De insprayed bakterierna kunde inte heller framodlas i högre grad hos någon av patientgrupperna. Däremot

såg vi att cytokinerna var kraftigt förhöjda i öronsekret där bakterier samtidigt kunde odlas fram. Vi såg även en tendens att patienter utan behandlingseffekt i större omfattning verkade ha levande bakterier i sina öronsekret än patienter som blivit förbättrade oavsett behandling. Bakterier kunde framodlas i 35% av öronsekreten, medan PCR detekterade 75%, vilket är i nivå med tidigare studier.

Resultaten visar att en kort behandling med probiotika har goda effekter på den sekretoriska otiten, men att mekanismerna bakom denna förbättring är oklara.

### **Plan för kommande år:**

Ett första utkast till manus håller som bäst på att skrivas. Ett antal kompletterande bakteriologiska analyser ska utföras under sommaren för att säkerställa artidentifiering i odlingarna. Vi ska även jämföra funna laktobaciller i nasopharynx med dem som fanns i sprayberedningen för att säkerställa att det rör sig om samma bakteriestam. Detta är svårare för alfa-streptokocker, men vi ska även försöka jämföra dessa. Arbetet torde vara klart under innevarande 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. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Skotnicka B, Hassmann E. Cytokines in children with otitis media with effusion. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(6):323-6.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Hessle C AB, Wold AE. Differential induction of pro-inflammatory cytokines by Gram-positive and Gram-negative bacteria.