

Probióticos e a Otite Média nas Crianças

*Leena Niittynen, Liisa Lehtoranta,
Anne Pitkäranta e Riitta Korpela*

A otite média (OM) é a infecção bacteriana mais comum na infância. Uma alternativa para a profilaxia e tratamento da OM é a utilização de probióticos, que são conhecidos por estabilizar a flora intestinal e estimular a função imunitária. Este capítulo analisa a literatura relevante e publicações sobre probióticos e a OM em crianças (com base em Niittynen *et al.* 2012¹). Embora os resultados sejam promissores, faltam estudos mais elaborados, que permitam tirar conclusões mais aprofundadas. Mais estudos são necessários para identificar as cepas probióticas mais promissoras e estudar as populações e avaliar os mecanismos por trás dos possíveis efeitos dos probióticos na OM.

Introdução

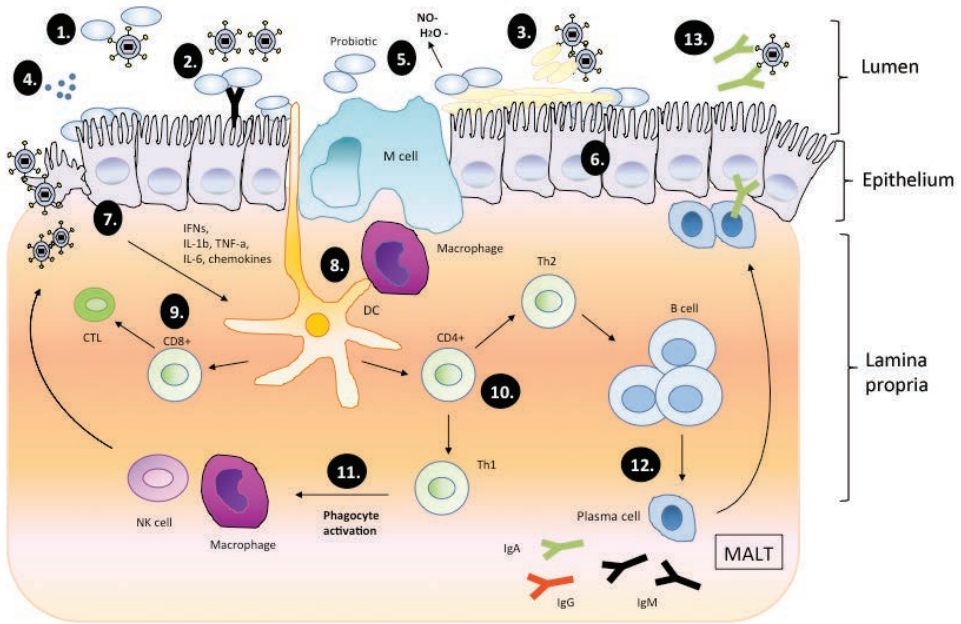
Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas². Vários mecanismos, tais como a estabilização da microbiota intestinal e a modulação da função imunológica podem explicar os efeitos benéficos dos probióticos. Para ser eficaz, o microrganismo probiótico deve ser capaz de sobreviver a passagem através do trato gastrointestinal superior e, pelo menos, temporariamente colonizar o intestino. Cepas probióticas diferem em seus efeitos, e as cepas mais utilizadas são do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*³. Além disso, a levedura *Saccharomyces boulardii* não patogênica é usada como probiótico⁴.

Os efeitos dos probióticos na saúde, a maioria dos quais estão relacionados com problemas gastrointestinais, foram descritas em várias revisões e meta-análises. Probióticos reduzem o risco de diarreia associada a antibióticos e diarreia infecciosa aguda. Probióticos também podem aliviar os sintomas da síndrome do intestino irritável e evitam enterocolite necrosante em recém-nascidos. Além disso, estudos recentes têm sugerido que os probióticos podem reduzir o risco de vários sintomas de infecções do trato respiratório superior (ITR)⁴⁻⁶. Os possíveis mecanismos pelos quais os probióticos podem prevenir infecções causadas por microrganismos patogênicos são mostrados na **Figura 1**⁷.

ITR superior e inferior agudas são as doenças mais comuns em crianças. Essas infecções representam uma considerável demanda para o sistema de saúde e causa significativo impacto econômico em termos de internações, despesas médicas, consultas médicas e absenteísmo no trabalho e escola⁸. Em crianças, a complicação mais comum da ITR aguda é a otite média aguda (OMA), que é a razão mais comum para o tratamento com antibiótico na infância⁹. Uma evidência crescente sugere que a OMA pode ser uma doença multimicrobiana onde as bactérias e os vírus respiratórios estão envolvidos na patogênese⁹⁻¹⁰. Na maioria dos casos, a ITR viral ocorre antes e / ou concorrentemente com a otite média aguda (OMA)¹¹⁻¹³. Aproximadamente 20-30% das crianças apresentam OMA recorrente

¹⁴. O uso repetido de antibióticos leva ao desenvolvimento de microorganismos resistentes a antibióticos ¹⁵ e distúrbios do equilíbrio da microbiota normal¹⁶. A microbiota protege o hospedeiro de patógenos. As alterações na microbiota devido ao tratamento com antibióticos pode levar à desregulação da homeostase imunológica e aumento da susceptibilidade à doença. ¹⁷ Recentemente, tem havido uma discussão sobre a necessidade do uso de antibióticos em crianças com OMA não complicada. Como os vírus respiratórios podem também contribuir para o desenvolvimento da OMA, a terapia antibiótica não oferece benefícios para infecções por vírus. Além de aumentar o cuidado na prescrição de agentes antimicrobianos, novas alternativas para reduzir o risco de OMA são necessárias⁹.

Figura 1. Probióticos podem prevenir infecções por microorganismos patogênicos através de muitos mecanismos. (Based on Lehtoranta).⁷



1. As bactérias probióticas podem ligar-se diretamente ao agente patogênico e inibir a ligação ao receptor da célula hospedeira.
2. Adesão de probióticos sobre a superfície epitelial pode bloquear a fixação do patógeno, cobrindo locais do receptor de uma forma não específica, ou competindo por receptores de hidrato de carbono específicos.
3. Os probióticos podem induzir a regeneração das mucosas: mucinas intestinais podem se ligar aos patógenos, inibindo sua adesão às células epiteliais e também inibindo a replicação do patógeno / proliferação.
4. Os probióticos também mostram atividade antimicrobiana direta contra patógenos através da produção de substâncias antimicrobianas.
5. Indução da produção de Óxido Nítrico e produção de desidrogenase pode ter atividade antiviral.

6. Os probióticos promovem a normalização da barreira da mucosa e aumentam a integridade das células mucosas.
7. A modulação da resposta imune através das células epiteliais.
8. Modulação e ativação da resposta imune através de macrófagos e CDs.
9. Após a ativação, os linfócitos T CD8 + diferenciam-se em CTLs, que destroem as células infectadas por vírus.
10. Os linfócitos T CD4 + diferenciam-se em células Th1 e Th2.
11. Th1 ativa fagócitos promovendo morte do vírus.
12. Th2 induzem a proliferação de células B, que irão para os órgãos linfáticos secundários, no tecido linfóide associado à mucosa (MALT), e se diferenciam em células plasmáticas produtora de Imunoglobulinas, que podem migrar de volta para o local da infecção.
13. Os anticorpos secretores neutralizam o agente patogênico.

Evidência clínica dos probióticos na OM

Ingestão oral de probióticos

Seis estudos controlados com placebo, randomizados, duplo-cego investigaram os efeitos da ingestão oral de probióticos na OMA em crianças ²¹⁻²⁷ (**Tabela 1**).

As crianças que frequentam creches têm consideravelmente maior risco de infecções respiratórias quando comparadas com crianças cuidadas em casa. O contato físico entre as crianças em creches favorece a transmissão de doenças infecciosas. Assim, a prevenção de infecções em creches é de grande importância ^{19, 20}. Hatakka *et al.* ²¹ estudaram se o consumo diário de leite enriquecido com *L. rhamnosus* GG poderia reduzir as infecções em creches durante o inverno. Observou-se a redução da ocorrência de OMA em 21% nas crianças que receberam leite com probióticos, mas a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa. No grupo de *L. rhamnosus* GG, as crianças tiveram menos dias de ausência na creche devido à doença e o número de crianças com infecção respiratória ou tratamento com antibióticos foi significativamente menor. No entanto, o efeito diminuiu após ajuste por idade. Em outro estudo, o consumo de leite suplementado com *L. rhamnosus* LB21 e flúor reduziu os dias com OM em 50% em crianças pré-escolares. Além disso, as crianças do grupo probiótico tiveram 60% menos dias com antibioticoterapia e significativamente menos cáries ²². Hojsak *et al.* ²³ relataram que a ingestão de *L. rhamnosus* GG reduziu significativamente o risco de infecções do trato respiratório superior, incluindo OM, em crianças que frequentam creches na Croácia. Apenas 8 crianças no grupo *L. rhamnosus* GG contra 13 no grupo de placebo foram tratadas com antibióticos, devido à OM aguda, mas a diferença entre os dois grupos não foi estatisticamente significativa.

Crianças com tendência à otite consumiram uma cápsula contendo *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* 99 e *Propionibacterium freudenreichii* JS ou placebo diariamente durante 24 semanas ²⁴. Os critérios de inclusão foram pelo menos quatro episódios de OMA durante os últimos 12 meses ou, pelo menos, três episódios durante os seis meses anteriores. Os resultados mostraram que a intervenção com probiótico não reduziu a ocorrência, a recorrência de episódios de OMA, ou a duração média de episódios de OMA. No entanto, houve uma tendência a exibir uma redução na recorrência de ITR no grupo que

usou o probiótico. Quando foram estudados os efeitos dos probióticos na relação da nasofaringe com patógenos bacterianos, os probióticos não afetaram o transporte de *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*, mas observou-se o aumento da prevalência da *Moraxella catarrhalis*. Os autores sugerem que, nas crianças propensas à OM, o efeito dos probióticos não é suficiente para prevenir a OMA, uma vez que crianças com tendência para desenvolver a OMA são tratadas com vários cursos de antibióticos, e tal situação aumenta a colonização por patógenos. No entanto, o número de bocavírus humano foi significativamente reduzido na nasofaringe de crianças, tal como descrito por Lehtoranta *et al.* 2012²⁵, indicando que os probióticos podem ser mais eficazes contra as ITRs de origem viral.

Tabela 1. Estudos representativos dos probióticos e a otite média (based on Niittynen *et al.* 2012)¹

Pacientes	Duração do estudo	Probióticos	Resultados: probióticos vs. placebo
Ingestão oral			
571 crianças saudáveis nas creches (1-6 anos) na Finlândia Hatakka <i>et al.</i> 2001 ²¹	R DB PC paralelo 7 meses	<i>L. rhamnosus</i> GG	OM ↔ Infecções respiratórias com complicações ↓ Tratamentos com Antibióticos ↓ (Resultados ajustado para a idade: ↔)
281 crianças saudáveis nas creches (1-7 anos) na Croácia Hojsak <i>et al.</i> 2010 ²³	R DB PC paralelo 3 meses	<i>L. rhamnosus</i> GG	Risco de ITR ↓ Risco para a OM ↓ Tratamentos com Antibióticos ↔
309 crianças com tendência à OM (10 meses-6 anos) na Finlândia Hatakka <i>et al.</i> 2007 ²⁴	R DB PC paralelo 6 meses	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>B. breve</i> 99, <i>P. freudenreichii</i> JS	Episódios de OMA ↔ Flora da nasofaringe: <i>S. pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> ↔ <i>Moraxella catarrhalis</i> ↑
72 recém nascidos saudáveis (< 2 meses) na Finlândia	R DB PC paralelo 10-12 meses	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>B. lactis</i>	Durante os 7 primeiros meses de vida : Incidência de OMA ↓ Tratamentos com Antibióticos ↓ Durante os 7 primeiros meses de vida: Infecções respiratórias recorrentes ↓
248 crianças saudáveis nas creches (1-5 anos) na Suécia Stecksén-Blicks <i>et al.</i> 2009 ²²	R DB PC paralelo 21 meses	<i>L. rhamnosus</i> LB21	Dias com OM ↓ * Tratamentos com Antibióticos ↔ Cáries dentárias ↓
109 recém nascidos saudáveis (1-2 meses) na Finlândia Taipale <i>et al.</i> 2010 ²⁷	R DB PC paralelo 6-7 meses	<i>B. animalis ssp. lactis</i> BB-12	OM ↔ Tratamentos com Antibióticos ↔ Infecções gastrointestinais ↔ Infecções respiratórias ↓

R= randomizado / PC= controlado por placebo / DB= duplo cego/ OM= otite média ↓ = diminuição significativa/ ↑= aumento significativo / ↔= sem efeito estatisticamente significativo * Diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa, somente naquelas crianças que haviam participado durante todo o intervalo de tempo de 21-meses do período de intervenção ITR: infecções do trato respiratório

Recém nascidos saudáveis requerendo fórmula láctea antes dos 2 meses de idade foram distribuídos aleatoriamente para receber uma fórmula suplementada com *L. rhamnosus* GG e *B. lactis* Bb - 12 ou com placebo²⁶. Durante os primeiros 7 meses de vida, verificou-se uma redução significativa na incidência de OMA e na utilização de antibióticos no grupo probiótico. Além disso, os probióticos reduziram a incidência da recorrência ITR durante o primeiro ano de vida. No entanto, Taipale *et al.*²⁷ não encontraram diferenças na incidência de OMA em crianças que receberam *B. lactis* Bb - 12 ou placebo até a idade de 8 meses. No final do estudo, o aleitamento materno foi ainda continuado em 44% das crianças no grupo de probiótico e 63 % das crianças no grupo de placebo. A longa duração do aleitamento materno pode explicar a baixa incidência de doenças infecciosas e de falta de diferenças na OMA entre os grupos.

Tratamento com spray nasal

Uma alternativa interessante para a ingestão oral para o tratamento da OMA é o uso de *sprays* nasais com probióticos. Três estudos controlados com placebo, randomizados, duplo-cego investigaram os efeitos da pulverização contendo *Streptococcus- a* sobre as infecções de ouvido²⁸⁻³⁰ (**Tabela 2**).

Tabela 2. Tratamento com *spray* nasal

Tratamento com <i>spray</i> nasal			
130 crianças com tendência à OM (6 meses-6 anos) na Suécia Roos <i>et al.</i> 2001 ²⁸	R DB PC paralelo 10 dias+10 dias	<i>S. mitis</i> <i>S. sanguis</i> <i>S. oralis</i>	OMA durante o estudo ↓ Membrana timpânica normal ↑
43 crianças com OMR (< 4 anos) na Suécia Tano <i>et al.</i> 2002 ³⁰	R DB PC paralelo 4 meses	<i>S. sanguis</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i>	Episódios de OM ↔ Flora nasofaríngea ↔
60 crianças com OME (1-8 anos) na Suécia Skovbjerg <i>et al.</i> 2009 ²⁹	R DB PC paralelo 10 dias	<i>S. sanguinis</i> ou <i>L. rhamnosus</i>	Recuperação clínica da OME com ambas cepas ↑ Flora nasofaríngea ↔ IL-8 ↑ no grupo <i>L. rhamnosus</i>

Em dois estudos, a melhora clínica foi observada após o tratamento de curto prazo com *spray* nasal com probiótico. Roos *et al.* avaliaram 28 crianças ao acaso, com otites recorrentes, com pulverização contendo *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* e *S. oralis*, ou placebo por 10 dias após o tratamento com antibióticos. No dia 60, a mesma pulverização foi administrada durante mais 10 dias, e feita a avaliação clínica. Quando comparado com o grupo placebo, as crianças do grupo probiótico eram mais saudáveis e tiveram menos recorrências tanto de OMA quanto OM secretora. Também, um estudo realizado por Skovbjerg *et al.*²⁹ demonstrou que o tratamento de pulverização nasal com probiótico é eficaz contra a otite média com efusão (OME). Solução contendo *S. sanguinis*, *L. rhamnosus*, ou placebo foi pulverizada no nariz de crianças com OME 10 dias antes da inserção de tubo de ventilação e o exame clínico foi realizado antes e após o tratamento. A recuperação completa ou significativa foi observada em um terço dos pacientes tratados com *S. sanguinis*, e um modesto efeito benéfico foi também observado com *L. rhamnosus*.

Ao contrário, Tano *et al*³⁰ relataram que o tratamento em longo prazo com o pulverizador nasal contendo *S. sanguis*, *S. mitis* e *S. oralis* não teve efeito sobre os episódios de OMA. No entanto, houve uma tendência de declínio da frequência de episódios de OM no final do tratamento no grupo de probióticos, enquanto o grupo placebo apresentou tendência oposta, mas os números eram muito pequenos para os cálculos estatísticos.

Mecanismos possíveis

Os mecanismos que explicam o possível efeito benéfico dos probióticos orais na OM não são claros. Tem sido sugerido que o mecanismo subjacente pode ser a estimulação da resposta imune^{21,26}, uma vez que vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os probióticos estimulam a resposta humoral, celular e imunidade não específica³¹. No entanto, nenhum dos estudos que investigaram os efeitos dos probióticos na OM e apenas alguns estudos que investigaram os efeitos dos probióticos sobre outras infecções do trato respiratório têm avaliado os seus efeitos sobre biomarcadores da imunidade. Nestes estudos, ao mesmo tempo quando os sintomas diminuem, os probióticos aumentam o número de células CD4 + e CD8 + e 32 níveis de IFN-gama 33 em adultos, e estimulam a imunidade inespecífica em crianças.³⁴

Os portadores de otopatógenos na nasofaringe se associam ao aumento do risco de OMA³⁵. O efeito benéfico dos probióticos em infecções da OM podem ser mediados através de redução destas bactérias patogênicas. Em voluntários saudáveis, a ingestão de *L. rhamnosus* GG, *B. sp* B420, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* reduziu a colonização nasal de potenciais bactérias patogênicas. Como nenhuma colonização de *L. rhamnosus* GG na flora nasal foi encontrada, foi sugerido um possível mecanismo para a estimulação do sistema imunológico³⁶. Por outro lado, em crianças propensas à otite, a redução da incidência de portadores patogênicos não foi notada após a ingestão de *L. rhamnosus* GG, *L. rhamonosus* LC 705, *B. breve* 99, e *P. freudenreichii* JS²². Diferentes cepas probióticas utilizadas e as populações do estudo podem explicar esses resultados conflitantes. Os estudos atuais fornecem alguma orientação sobre os mecanismos de ação, mas mais estudos que investigam os efeitos dos probióticos na otite média e biomarcadores relacionados com efeitos clínicos são necessários.

Postula-se que o tratamento com pulverização nasal de probiótico leva à recolonização de bactérias que interferem na nasofaringe, podendo inibir o crescimento de otopatógenos e proteger contra a OM²⁸⁻³⁰. No entanto, após a pulverização, a presença de bactérias instiladas na flora nasal foi curta³⁰, e nenhuma alteração foi observada nos patógenos nasofaríngeos após períodos de tratamento^{29,30}. Por outro lado, o aumento dos níveis de IL-8, e uma tendência para o aumento de IL-1β e níveis de PGE2 foram observados após o tratamento de pulverização contendo *L. rhamnosus* GG²⁹. Parece ser possível que o mecanismo por trás do efeito preventivo da pulverização com probiótico possa ser a estimulação do mecanismo inato de defesa.

A segurança dos probióticos

A segurança dos probióticos tem sido bem documentada em diversos estudos experimentais e clínicos.^{37,38} Vários probióticos, como cepas de *Lactobacillus* e

Bifidobacterium, são de origem humana e têm uma longa história de uso seguro.³⁹ Por exemplo, o *L. rhamnosus* GG foi utilizado em alimentos desde 1990, e grandes estudos epidemiológicos têm mostrado que o aumento rápido do uso de lactobacilos não aumentou a bacteremia por *Lactobacillus*.^{40,41} Os probióticos podem ser usados com segurança em pacientes que receberam suporte nutricional, bem como, embora alguns cuidados devem ser tomados, em pacientes criticamente doentes, devido ao risco de septicemia, embora muito raro.³⁹ Não existem interações conhecidas com medicamentos e, os efeitos adversos, tais como desconforto abdominal, são raros.⁴

Conclusões

A terapia com probiótico oferece uma alternativa interessante no tratamento da OM, que é uma doença comum na infância, com consequências para a saúde pública e impactos econômicos óbvios. Evidências crescentes mostram que os probióticos orais reduzem a incidência da OMA em crianças atendidas em creches e em recém-nascidos saudáveis. Além disso, as crianças podem se beneficiar, ao tratar da OMA e da OME, com uso de pulverização nasal contendo estreptococos. No entanto, o número limitado de estudos faz com que seja impossível tirar quaisquer conclusões mais definitivas. Além disso, resultados contraditórios destacam que os efeitos dos probióticos são dependentes das cepas. É também possível que o efeito de probióticos não seja suficientemente forte para impedir a OM em todas as populações dos estudos, tal como em crianças com tendência à otite. Mais estudos são necessários para identificar as cepas probióticas mais promissoras e as populações de estudo.

Mecanismos relacionados ao efeito potencial de probióticos na OM estão possivelmente relacionados à interferência microbiana com patógenos e estimulação do mecanismo de defesa inata. Estudos investigando os mecanismos de ação e identificação de estrutura do genoma de probióticos irá revelar uma compreensão mais profunda dos mecanismos dos efeitos benéficos dos probióticos.

Conflito de interesse

Não existem conflitos de interesse

Fonte patrocinadora

Universidade de Helsinki, Finlândia

Referências bibliográficas

1. Niittynen L, Pitkäranta A, Korpela R. Probiotics and Otitis Media in Children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76(4):465-70.2012.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina 2001. http://www.who.int/food-safety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
3. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* 27(3):202-209. 2009.
4. Kligler B, Cohn A. Probiotics. *Am Fam Physician* 78(9):1073-1078. 2008.
5. Hatakka K, Saxelin M. Probiotics in Intestinal and Non-Intestinal Infectious Diseases-Clinical Evidence. *Curr Pharm Des* 14(14):1351-1367. 2008.

6. Wolvers D, Antoine JM, Myllyluoma E, Schrezenmeir J, Szajewska H, Rijkers GT. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Prevention and Management of Infections by Probiotics. *J Nutr* 140(3):698S-712S. 2010.
7. Lehtoranta L. Probiotics and Virus Infections: The Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on Respiratory and Gastrointestinal Virus Infections. Ph.D. Thesis. Helsinki: University of Helsinki. 2012. <http://ethesis.helsinki.fi>
8. Waterer, G, Wunderink, R. Respiratory Infections: a Current and Future Threat. *Respirology*, 14 (5):651-655. 2009.
9. Vergison A, Dagan R, Arguedas A, Bonhoeffer J, Cohen R, Dhooge I, et al. Otitis Media and Its Consequences: Beyond the Earache. *Lancet Infect Dis* 10(3):195-203. 2010.
10. Chonmaitree T, Ruohola A, Hendley JO. Presence of Viral Nucleic Acids in the Middle Ear: Acute Otitis Media Pathogen or Bystander? *Pediatr Infect Dis J* 31(4):325-30.2012.
11. Marom T, Nokso-Koivisto J, Chonmaitree T. Viral-Bacterial Interactions in Acute Otitis Media. *Curr Allergy Asthma Rep* Sep 12. 2012. [Epub ahead of print]
12. Vesa S, Kleemola M, Blomqvist S, et al. Epidemiology of Documented Viral Respiratory Infections and Acute Otitis Media in a Cohort of Children Followed from Two to Twenty-Four Months of Age. *Pediatr Infect Dis J* 20:574-81. 2001.
13. Henderson FW, Collier AM, Sanyal MA, et al. A Longitudinal Study of Respiratory Viruses and Bacteria in the Etiology of Acute Otitis Media with Effusion. *N Engl J Med* 306:1377-83. 1982.
14. Chonmaitree T, Owen MJ, Howie VM. Respiratory Viruses Interfere with Bacteriologic Response to Antibiotic in Children with Acute Otitis Media. *J Infect Dis*. 162:546-9. 1990.
15. Pichichero ME. Recurrent and Persistent Otitis Media. *Pediatr Infect Dis J* 19(9):911-916. 2000.
16. Brook I, Gober AE. Antimicrobial Resistance in the Nasopharyngeal Flora of Children with Acute Otitis Media and Otitis Media Recurring After Amoxicillin Therapy. *J Med Microbiol* 54(Pt 1):83-85. 2005.
17. Nord CE, Sillerström E, Wahlund E. Effect of Tigecycline on Normal Oropharyngeal and Intestinal Microflora. *Antimicrob Agents Chemother* 50(10):3375-3380. 2006.
18. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the Balance: Antibiotic Effects on Host-Microbiota Mutualism. *Nat Rev Microbiol* 9(4):233-243. 2011.
19. Collet JP, Ducruet T, Floret D, Cogan-Collet J, Honneger D, Boissel JP. Daycare Attendance and Risk of First Infectious Disease. *Eur J Pediatr* 150(3):214-216. 1991.
20. Louhiala PJ, Jaakkola N, Ruotsalainen R, Jaakkola JJ. Form of Day Care and Respiratory Infections Among Finnish Children. *Am J Public Health* 85(8 Pt 1):1109-1112. 1995.
21. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, et al. Effect of Long Term Consumption of Probiotic Milk on Infections in Children Attending Day Care Centres: Double Blind, Randomised Trial. *BMJ* 322:1327-1329. 2001.
22. Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of Long-term Consumption of Milk Supplemented with Probiotic Lactobacilli and Fluoride on Dental Caries and General Health in Preschool Children: a Cluster-randomized Study. *Caries Res* 43(5):374-381. 2009.
23. Hojsak I, Snovak N, Abdović S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. Lactobacillus GG in the Prevention of Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections in Children who Attend Day Care Centers: a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Clin Nutr* 29(3):312-316. 2010.
24. Hatakka K, Blomgren K, Pohjavuori S, Kajjalainen T, Poussa T, Leinonen M, et al. Treatment of Acute Otitis Media with Probiotics in Otitis-prone Children-a Double-Blind, Placebo-controlled Randomised Study. *Clin Nutr* 26(3):314-321.2001.
25. Lehtoranta L, Söderlund-Venermo M, Nokso-Koivisto J, Toivola H, Blomgren K, Hatakka K, Poussa T, Korpela R, Pitkäranta A. Human Bocavirus in the Nasopharynx of Otitis-prone Children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76(2):206-11. 2012.
26. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific Probiotics in Reducing the Risk of Acute Infections in Infancy-a Randomised, Double-blind, Placebo-controlled Ttudy. *Br J Nutr* 101(11):1722-1726. 2009.

27. Taipale T, Pienihäkkinen K, Isolauri E, Larsen C, Brockmann E, Alanen P, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in Reducing the Risk of Infections in Infancy. *Br J Nutr* 105(3):409-416. 2011.
28. Roos K, Håkansson 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* 322(7280):210-212. 2001.
29. Skovbjerg S, Roos K, Holm SE, Grahn Håkansson E, Nowrouzian F, Ivarsson M, et al. Spray Bacteriotherapy Decreases Middle Ear Fluid in Children with Secretory Otitis Media. *Arch Dis Child* 94(2):92-98. 2009.
30. Tano K, Grahn Håkansson E, Holm SE, Hellström S. A Nasal Spray with Alpha-haemolytic Streptococci as Long Term Prophylaxis Against Recurrent Otitis Media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 62(1):17-23. 2002.
31. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *J Nutr* 130(2S Suppl):403S-409S. 2000.
32. de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, et al. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on Common cold Episodes: a Double Blind, Randomized, Controlled Trial. *Clin Nutr* 24(4):481-491. 2005.
33. Cox AJ, Pyne DB, Saunders PU, Fricker PA. Oral Administration of the Probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and Mucosal Immunity in Endurance Athletes. *Br J Sports Med* 44(4):222-226. 2010.
34. Collet JP, Ducruet T, Kramer MS, Haggerty J, Floret D, Chomel JJ, et al. Stimulation of Nonspecific Immunity to Reduce the Risk of Recurrent Infections in Children Attending Day-care Centers. The Epicrèche Research Group. *Pediatr Infect Dis J* 12(8):648-652. 1993.
35. Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. Relationship Between Nasopharyngeal Colonization and the Development of Otitis Media in Children. Tonawanda/Williamsville Pediatrics. *J Infect Dis* 175(6):1440-1445. 1997.
36. Glück U, Gebbers JO. Ingested Probiotics Reduce Nasal Colonization with Pathogenic Bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 77(2):517-520. 2003.
37. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, et al. Safety Assessment of Probiotics for Human Use. *Gut Microbes* 1(3):164-185. 2010.
38. Salminen S, von Wright A. Probiotics: Safety and Efficacy. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A, Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *CRC Press* fourth edition 689-705. 2011.
39. Whelan K, Myers CE. Safety of Probiotics in Patients Receiving Nutritional Support: a Systematic Review of Case Reports, Randomized Controlled Trials, and Nonrandomized Trials. *Am J Clin Nutr* 91(3):687-703. 2010.
40. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, et al. Lactobacillus Bacteremia During a Rapid Increase in Probiotic Use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35: 1155-1160. 2002.
41. Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP. Beneficial Lactobacilli in Food and Feed: Long-term Use, Biodiversity and Proposals for Specific and Realistic Safety Assessments. *FEMS Microbiol Rev* 30(4):487-513. 2006.