

# **Probiotyki z witaminą C w profilaktyce objawów górnych dróg oddechowych u dzieci w wieku 3-10 lat: randomizowane badanie kontrolowane**

## **Streszczenie**

W podwójnie ślepych, randomizowanym, równoległym, kontrolowanym placebo badaniu zdrowe dzieci w wieku szkolnym 3-10 lat otrzymywały codziennie przez 6 miesięcy suplement oparty na probiotykach, aby ocenić wpływ na występowanie i czas trwania objawów infekcji górnych dróg oddechowych (URTI). Interwencja obejmowała probiotyk Lab4 (*Lactobacillus acidophilus* CUL21 i CUL60, *Bifidobacterium bifidum* CUL20 i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CUL34) w ilości 12,5 miliarda jtk/dzień plus 50 mg witaminy C lub dopasowane placebo. Do analizy włączono 171 dzieci (85 w grupie placebo i 86 w grupie aktywnej). Częstość występowania kaszlu była o 16% ( $P=0,0300$ ) istotnie niższa u dzieci otrzymujących aktywną interwencję w porównaniu z placebo. Nie stwierdzono istotnych różnic w częstości występowania innych objawów URTI. Istniało znacząco niższe ryzyko wystąpienia pięciu różnych objawów związanych z URTI w ciągu jednego dnia faworyzujące grupę aktywną (współczynnik ryzyka: 0.31, 95% przedział ufności: 0.12, 0.81,  $P=0.0163$ ). Absencja w szkole i stosowanie antybiotyków było również znacząco zmniejszone dla osób z grupy aktywnej (odpowiednio -16%,  $P=0.0060$  i -27%,  $P=0.0203$ ). Nasze wyniki wskazują, że sześciomiesięczna codzienna suplementacja kombinacją probiotyku Lab4 i witaminy C zmniejsza częstość występowania kaszlu, absencji w szkole i stosowania antybiotyków u dzieci w wieku od 3 do 10 lat.

**Słowa kluczowe:** kaszel, szkoła, lactobacilli, bifidobacteria, witamina C

## **1. Wstęp**

Znaczenie związku między mikrobiomem jelitowym a rozwojem układu odpornościowego jest dobrze rozpoznane (Zheng *i in.*, 2020) i istnieją dowody wskazujące na dwustronną komunikację między mikrobiotą jelitową a płucami (Angurana i Bansal, 2020). Probiotyki wykazały aktywność przeciwwirusową wobec powszechnych wirusów układu oddechowego, w tym grypy, rinowirusa, oddechowego wirusa syncytialnego i koronawirusa, a ich rola w zarządzaniu COVID-19 zyskuje uwagę (Baud *i in.*, 2020; d'Ettorre *i in.*, 2020; Tiwari *i in.*, 2020). W badaniu prognostycznym oszacowano, że suplementacja probiotykami całej populacji USA mogłaby zapobiec nawet 54,5 mln dni chorobowych z infekcją dróg oddechowych, 4,2 mln opuszczonych dni pracy, wydatkom w wysokości ponad miliarda dolarów i nawet 2,2 mln recept na antybiotyki rocznie (Lenoir-Wijnkoop *i in.*, 2019).

Zakażenia górnych dróg oddechowych (URTI) są w większości wirusowe i stanowią około 90% wszystkich zakażeń układu oddechowego (Marengo *i in.*, 2017). Dzieci są szczególnie podatne ze względu na niedojrzałość immunologiczną (Feleszko *i in.*, 2019) i istnieje coraz więcej dowodów sugerujących, że codzienna suplementacja probiotykami lub witaminą C może odgrywać rolę w zarządzaniu URTI u dzieci (Emre *i in.*, 2020; Hao *i in.*, 2015; Hemilä i Chalker, 2013; King *i in.*, 2014; Vorilhon *i in.*, 2019). Nasze własne badanie pilotażowe z udziałem małych dzieci (3 do 6 lat) podkreśliło potencjalne korzyści z 6-miesięcznej codziennej suplementacji probiotykami Lab4 plus 50 mg witaminy C (Garaiova *i in.*, 2015). Celem tego badania było zbadanie wpływu tej samej interwencji opartej na probiotykach na zapobieganie objawom górnych dróg oddechowych w szerszej populacji dzieci szkolnych w wieku od 3 do 10 lat.

## **2. Materiały i metody**

### **Projekt i zatwierdzenie badania**

Było to eksploracyjne, wielośrodkowe, podwójnie zaślepienie, randomizowane, równoległe badanie grupowe, kontrolowane placebo (PROCHILD-2). Badanie przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej, a protokół

został zatwierdzony przez Komitet Etyczny regionu samorządowego Bratysławy, Słowacja (Ref: 07878/2016-HF). Badanie zostało zarejestrowane w rejestrze ISRCTN (ISRCTN26587549).

### **Populacja badana, rekrutacja i randomizacja**

Łącznie 234 dzieci (w wieku 3-10 lat) zostało zrekrutowanych z czterech pediatrycznych ośrodków zdrowia/praktyk ogólnych na Słowacji. Rekrutacja rozpoczęła się w grudniu 2016 roku i trwała do marca 2017 roku (n=90), następnie została wstrzymana w okresie późnej wiosny i sezonu letniego, ponownie rozpoczęta w październiku 2017 roku i trwała do marca 2018 roku (n=144). Lekarze pediatrzy rekrutowali dzieci albo podczas rutynowych wizyt profilaktycznych w uczestniczącym ośrodku badawczym, albo poprzez ogłoszenia plakatowe wyświetlane w poczekalniach ośrodków badawczych. Dzieci zostały wykluczone, jeśli nie uczęszczały do szkoły, były chore lub otrzymywały antybiotyki w czasie rekrutacji, regularnie otrzymywały produkty probiotyczne lub jakiegokolwiek leki stymulujące układ odpornościowy; jeśli były wrażliwe na ksylitol/sorbitol. Żadne z dzieci nie otrzymało szczepionki przeciwko grypie przed lub w trakcie trwania badania. Przed udziałem w badaniu uzyskano pisemną świadomą zgodę od rodziców lub opiekunów prawnych. Kwalifikujące się dzieci zostały kolejno przydzielone do badania przez lekarza pediatrę i przydzielone w stosunku 1:1 do jednego z dwóch ramion badania zgodnie z wygenerowaną komputerowo sekwencją losową przy użyciu randomizacji blokowej o wielkości bloku czterech i stratyfikacji według ośrodka. Randomizacja została przeprowadzona przez niezależnego statystyka, który nie miał kontaktu z uczestnikami. Sekwencja przydziału nie była dostępna dla żadnego członka zespołu badawczego, dopóki bazy danych nie zostały wypełnione i zablokowane.

### **Interwencja badawcza**

Dzieci otrzymywały codziennie jedną tabletkę do żucia zawierającą *Lactobacillus acidophilus* CUL21 (NCIMB 30156) i CUL60 (NCIMB 30157), *Bifidobacterium bifidum* CUL20 (NCIMB 30153) i *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CUL34 (NCIMB 30172) (Lab4) w ilości  $1,25 \times 10^{10}$  cfu w połączeniu z 50 mg witaminy C lub identycznie wyglądającą tabletkę placebo bez składników aktywnych przez 6 miesięcy. Interwencje zostały przygotowane przez firmę Cultech Ltd., Port Talbot, Wielka Brytania. Rodzice/opiekunowie zostali poinstruowani, aby podawać swoim dzieciom jedną tabletkę do żucia rano po śniadaniu i unikać podawania w ciągu 2 h od przyjęcia jakiegokolwiek antybiotyku. Ponadto rodzicom zalecono utrzymanie normalnej diety i stylu życia dzieci w trakcie badania, unikając spożywania jakichkolwiek innych napojów probiotycznych i suplementów. Zgodność z interwencją oceniano poprzez monitorowanie liczby niewykorzystanych tabletek do żucia lub na podstawie dzienniczek zdrowia.

### **Gromadzenie danych**

Na początku wszystkie dzieci zostały zbadane przez lekarza pediatrę i odnotowano informacje ogólne, w tym historię alergii i wszelkie antybiotyki i/lub regularne stosowanie leków. Masa ciała i wzrost były mierzone przy użyciu cyfrowej stacji ważąco-pomiarowej z automatycznym obliczaniem wskaźnika masy ciała ( $\text{kg/m}^2$ , SECA 764, SECA Deutschland, Hamburg, Niemcy). W okresie badania dzieci były badane przez pediatrę na zaplanowanych wcześniej wizytach 2-, 4- i 6-miesięcznych, kiedy to rodzice/opiekunowie zostali poinstruowani, jak wypełniać dzienniczki zdrowia monitorujące następujące objawy URTI (na podstawie wskazówek od pediatry prowadzącego badanie): kichanie, ból gardła, kaszel, wydzielina z nosa i zatkanie nosa. Ponadto rodzice/opiekunowie dziecka odnotowywali gorączkę, ból ucha, świszczący oddech, absencję, stosowanie antybiotyków i/lub innych leków, objawy żołądkowo-jelitowe (konsystencja stolca, ból brzucha i wymioty), wizyty lekarskie, hospitalizację oraz przestrzeganie zasad interwencji. Wypełnione dzienniczki zdrowia i niewykorzystane tabletki były zbierane, a interwencja na kolejne dwa miesiące była przekazywana podczas zaplanowanych wizyt.

### **Punkty końcowe badania**

Pierwotnymi punktami końcowymi były częstość występowania i czas trwania objawów URTI w ciągu 6-miesięcznego okresu badania. Objawy wybrane do włączenia jako reprezentujące całkowite objawy URTI to: kaszel, ból gardła, przekrwienie nosa, wydzielina z nosa i kichanie. Drugorzędne punkty końcowe obejmowały częstość występowania nieobecności w szkole, stosowanie antybiotyków i objawy żołądkowo-jelitowe.

## Analiza statystyczna

Wskaźnik zachorowalności reprezentuje liczbę epizodów każdego objawu, absencji lub użycia antybiotyku podzieloną przez liczbę dni w badaniu i jest wyrażony na 100 osobodni. Każdy odrębny epizod obejmował liczbę kolejnych dni z danym objawem, a każdy odrębny epizod był oddzielony od innego epizodu minimalnym czasem trwania 24 godzin bez objawów. Całkowita liczba objawów URTI jest definiowana jako częstość występowania epizodów objawów obejmujących jeden lub więcej pojedynczych objawów. Czas trwania (średnia różnica) przedstawia całkowitą liczbę dni z objawem lub nieobecnością w grupie podzieloną przez liczbę uczestników w tej grupie. Wskaźniki zapadalności i czasu trwania wraz z 95% przedziałami ufności (CI) zostały obliczone przy użyciu uogólnionego modelu liniowego (GLM), który uwzględniał leczenie jako pojedynczy predyktor. Do analizy GLM ciągłego punktu końcowego, takiego jak czas trwania objawów URTI, zastosowano rozkład normalny i funkcje związku tożsamości; do analizy GLM zdarzeń nawracających (takich jak liczba epizodów objawów URTI) zastosowano rozkład Poissona i funkcje związku log link4. Zmienne ciągłe podsumowano za pomocą liczby obserwacji, średniej (odchylenia standardowego), natomiast zmienne kategoryczne podsumowano za pomocą liczby i odsetka zdarzeń. Analiza post-hoc skorygowana o kowariancję została przeprowadzona z leczeniem jako zmienną badaną oraz wiekiem, płcią i historią alergii jako kowariantami. Do analizy skorygowanej o te zmienne zastosowano uogólniony model liniowy (GLM). Czas do wystąpienia pierwszego objawu w grupach analizowano metodą Kaplana-Meiera, a istotność oceniano testem Log-rank Mantela-Coxa (GraphPad Prism, wersja 8.2.2, La Jolla, CA, USA). Wartości *P* uznano za statystycznie istotne, gdy były mniejsze niż 0,05. Analizy danych przeprowadzono za pomocą SAS® w wersji 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 3. Wyniki

### Rekrutacja, charakterystyka wyjściowa i zgodność z przepisami

Schemat przepływu uczestników przedstawiono na *Rycinie 1*. Z 260 potencjalnych uczestników, 234 zostało zapisanych między grudniem 2016 a marcem 2018 roku. Sześć dzieci w grupie placebo i pięć dzieci w grupie aktywnej zostało nieprawidłowo włączonych do randomizacji (nie spełniały kryteriów włączenia) i zostały wykluczone. Piętnaście dzieci wycofało się krótko po randomizacji (*Rycina 1*). Łącznie 37 dzieci zostało wykluczonych z analizy; 4 z powodu zagubienia dokumentacji, 2 z powodu nieprzestrzegania protokołu, 21 z powodu nieautoryzowanego stosowania leczenia (witamina C/ immunostymulanty) i 10 z powodu nieprzestrzegania przyjmowania interwencji (<80%). Proporcje wykluczonych/wycofanych dzieci były podobne w obu ramionach; 31 dzieci w grupie aktywnej (26,5%) i 32 dzieci w grupie placebo (27,3%). W związku z tym założono, że utrata kontroli występuje w sposób losowy i nie dokonywano korekty analizy pod kątem utraty kontroli. Badanie ukończyło 171 uczestników (85 w grupie placebo i 86 w grupie aktywnej).

Zgodność z interwencjami przez osoby, które zostały włączone do badania, wynosiła 96,1% i była porównywalna między grupami. Charakterystyka wyjściowa uczestników została zawarta w *Tabeli 1*.

### Objawy zakażenia górnych dróg oddechowych

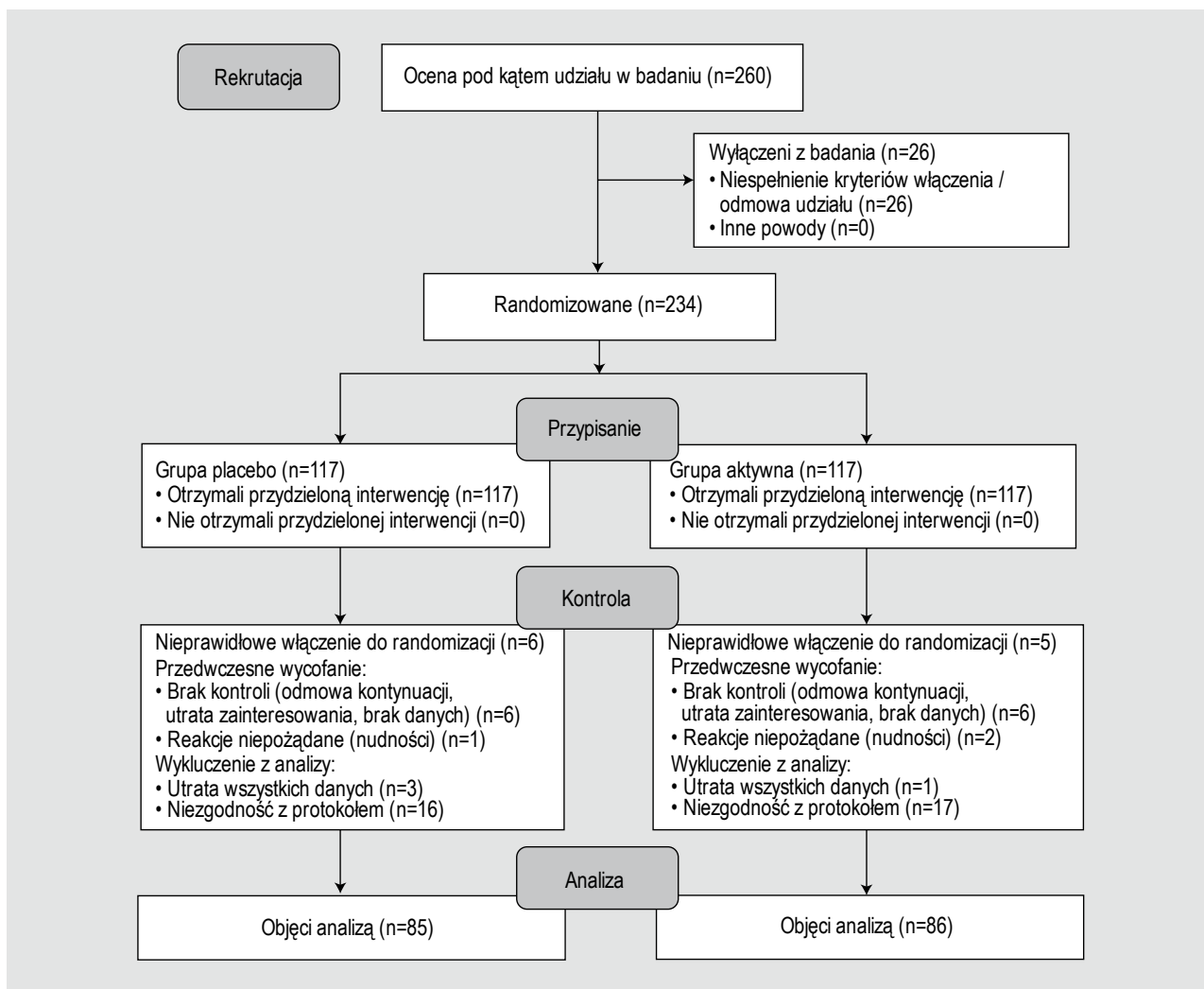
- **Częstość występowania**

Wskaźniki zapadalności na poszczególne i całkowite objawy URTI przedstawiono w *Tabeli 2*. Codzienna suplementacja probiotykiem Lab4 plus witaminą C znacząco zmniejszyła częstość występowania kaszlu (-16%,  $P=0,0300$ ) i bólu gardła (-20%,  $P=0,0373$ ) w porównaniu z placebo. Nie było istotnych różnic między grupami w częstości występowania jakichkolwiek innych objawów URTI. Objawy URTI nie zostały zgłoszone dla sześciorga dzieci (3 w każdej grupie) w okresie badania. Częstość występowania gorączki, świszczącego oddechu i bólu ucha nie różniła się między grupami (*Tabela 2*). Wyniki analizy *post-hoc* z korektą kowariancyjną przedstawiono w tabelach uzupełniających S1 i S4. Wyniki pozostają podobne do analizy nieskorygowanej, z jedynym wyjątkiem bólu gardła.

Krzywe czasu do pierwszego epizodu dla objawów URTI przedstawiono na *Rycinie 2*. Nie było różnic między grupami w czasie do pierwszego epizodu objawu URTI niezależnie od rodzaju objawu (*Rycina 2A*). Jednak po około 10 dniach suplementacji czas do pierwszego epizodu kaszlu dla osób z grupy aktywnej był dłuższy niż dla uczestników z grupy placebo i to opóźnienie w wystąpieniu objawów utrzymywało się przez cały czas trwania badania (*Rycina 2B*). Mediana

czasu potrzebnego 50% dzieci do wystąpienia pierwszego epizodu kaszlu wynosiła 53,5 dnia w grupie aktywnej - dwukrotnie więcej niż 27 dni w przypadku placebo (*Rysunek 2B*). W przypadku bólu gardła różnica w czasie wynosiła 115 dni w grupie aktywnej w porównaniu do 125 dni w placebo (*Rycina 2C*).

Określono liczbę łącznych objawów URTI (kaszel, ból gardła, kichanie, wydzielina z nosa i przekrwienie nosa) odnotowanych dziennie dla każdego uczestnika w grupie aktywnej i placebo od 1 objawu do 5 objawów, a wskaźniki częstości występowania przedstawiono w *Tabeli 3*. W grupie aktywnej częstość występowania tych epizodów obejmujących cztery lub pięć różnych objawów w jednym dniu była znacząco niższa niż w grupie placebo (odpowiednio -29%,  $P=0,0278$  i -79%,  $P<0,0001$ ). W ciągu 6-miesięcznego okresu badania tylko 5,8% dzieci (5/86) w grupie aktywnej miało wszystkie pięć objawów jednego dnia w porównaniu z 18,8% dzieci (16/85) w grupie placebo (wskaźnik ryzyka: 0,31, 95% CI: 0,12, 0,81,  $P=0,0163$ ). Stwierdzono istotnie większą częstość występowania epizodów z jednym objawem (przeważnie wydzielina z nosa) w grupie aktywnej w porównaniu z placebo ( $P=0,0234$ ). Wyniki z analizy post-hoc dostosowanej do kowariancji są podobne (tabele uzupełniające S2 i S5).



**Rycina 1.** Schemat przepływu badania

**Tabela 1. Charakterystyka wyjściowa uczestników badania.**

<b>Cecha<sup>1</sup></b>		<b>Placebo (n=85)</b>	<b>Badanie (n=86)</b>	<b>Razem (n=171)</b>
Wiek, lata		6,7±2,0	6,5±2,1	6,6±2,0
Płeć, n (%)	Dziewczyny	48 (56,5%)	35 (40,7%)	83 (48,5%)
	Chłopcy	37 (43,5%)	51 (59,3%)	88 (51,5%)
BMI, kg/m <sup>2</sup>		16,1±2,5	16,4±2,5	16,3±2,5
	Dziewczyny	15,9±2,1	16,3±2,3	16,1±2,2
	Chłopcy	16,4±2,9	16,4±2,7	16,4±2,8
Ośrodek, n (%)	Ośrodek 1	47 (55,3%)	46 (53,5%)	93 (54,4%)
	Ośrodek 2	19 (22,4%)	13 (15,1%)	32 (18,7%)
	Ośrodek 3	12 (14,1%)	17 (19,8%)	29 (17,0%)
	Ośrodek 4	7 (8,2%)	10 (11,6%)	17 (9,9%)
Alergia, n (%)	Żywność	0 (0%)	11 (12,8%)	11 (6,4%)
	Astma	3 (3,5%)	2 (2,3%)	5 (2,9%)
	Egzema atopowa	2 (2,4%)	4 (4,7%)	6 (3,5%)
	Katar sienny	5 (5,9%)	9 (10,5%)	14 (8,2%)
	Inne	5 (5,9%)	4 (4,7%)	9 (5,3%)

<sup>1</sup> Dane przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe. BMI = wskaźnik masy ciała.

**Tabela 2. Częstość występowania objawów ze strony górnych dróg oddechowych (URTI) i innych<sup>1</sup>**

	Placebo (n=85)	Badanie (n=86)		Placebo (n=85)	Badanie (n=86)
Objawy URTI					
Kaszel			Objawy URTI ogółem <sup>3</sup>		
Liczba epizodów	178	152	Liczba epizodów	313	330
Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	1,18	1,0	Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	2,07	2,16
IRR (95% CI)	0,84 (0,72, 0,98)		IRR (95% CI)	1,04 (0,93, 1,16)	
Wartość P	0,0300		Wartość P	0,4592	
Ból gardła			Inne objawy		
Liczba epizodów	102	83	Gorączka <sup>4</sup>		
Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,68	0,54	Liczba epizodów	70	64
IRR (95% CI)	0,80 (0,66, 0,99)		Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,46	0,42
Wartość P	0,0373		IRR (95% CI)	0,90 (0,71, 1,15)	
Przekrwienie nosa			Wartość P	0,4079	
Liczba epizodów	138	144	Duszność		
Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,91	0,94	Liczba epizodów	8	5
IRR (95% CI)	1,03 (0,87, 1,22)		Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,05	0,03
Wartość P	0,7132		IRR (95% CI)	0,62 (0,28, 1,36)	
Wydzielina z nosa			Wartość P	0,2322	
Liczba epizodów	208	206	Ból ucha		
Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	1,38	1,35	Liczba epizodów	13	15
IRR (95% CI)	0,98 (0,85, 1,12)		Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,09	0,10
Wartość P	0,7597		IRR (95% CI)	1,14 (0,67, 1,93)	
Kichanie			Wartość P	0,6236	
Liczba epizodów	138	148			
Częstotliwość występowania <sup>2</sup>	0,91	0,97			
IRR (95% CI)	1,06 (0,90, 1,25)				
Wartość P	0,4855				

<sup>1</sup> IRR = współczynnik zachorowalności; CI = przedział ufności.

<sup>2</sup> Współczynnik zachorowalności na 100 osobodni.

<sup>3</sup> Całkowita liczba objawów URTI jest definiowana jako częstość występowania epizodów objawowych obejmujących dowolny jeden lub więcej pojedynczych objawów.

<sup>4</sup> Temperatura 38 °C lub wyższa.

	Badanie	Placebo
Odsetek uczestników bez objawów URTI		
	Dzień pierwszego zdarzenia	

**Rycina 2.** Czas Kaplana-Meiera do zdarzenia dla pierwszego objawu infekcji górnych dróg oddechowych (URTI): (A) jakkolwiek objaw URTI,  $\chi^2=0,0094$ ,  $P=0,9227$ ; (B) kaszel,  $\chi^2=1,915$ ,  $P=0,1664$ ; (C) ból gardła,  $\chi^2=0,3054$ ,  $P=0,5805$ . Mediana czasu do wystąpienia objawu (linia przerywana) wynosiła (A) 15 dni dla pierwszego objawu URTI w grupie aktywnej i 17 dni w grupie placebo; (B) 53,5 dnia dla kaszlu w grupie aktywnej i 27 dni w grupie placebo; (C) 115 dni dla bólu gardła w grupie aktywnej i 125 dni w grupie placebo. Istotność statystyczną obliczono za pomocą testu Log-rank Mantel-Cox.

**Tabela 3. Częstość występowania liczby pięciu powszechnych objawów zakażenia górnych dróg oddechowych (URTI)<sup>1,2</sup>**

Liczba objawów	Placebo (n=85)	Badanie (n=86)
<b>1 objaw</b>		
Liczba epizodów	269	311
Częstotliwość występowania <sup>3</sup>	1,78	2,04
IRR (95% CI)	1,14 (1,02, 1,28)	
Wartość P	0,0234	
<b>2 objawy</b>		
Liczba epizodów	194	211
Częstotliwość występowania <sup>3</sup>	1,29	1,38
IRR (95% CI)	1,08 (0,94, 1,23)	
Wartość P	0,3033	
<b>3 objawy</b>		
Liczba epizodów	102	94
Częstotliwość występowania <sup>3</sup>	0,68	0,62
IRR (95% CI)	0,91 (0,75, 1,11)	
Wartość P	0,3562	
<b>4 objawy</b>		
Liczba epizodów	50	36
Częstotliwość występowania <sup>3</sup>	0,33	0,24
IRR (95% CI)	0,71 (0,53, 0,96)	
Wartość P	0,0278	
<b>5 objawów</b>		
Liczba epizodów	24	5
Częstotliwość występowania <sup>3</sup>	0,16	0,03
IRR (95% CI)	0,21 (0,10, 0,41)	
Wartość P	<0,0001	

<sup>1</sup> IRR = współczynnik zachorowalności; CI = przedział ufności.

<sup>2</sup> Objawy URTI obejmowały (kaszel, ból gardła, przekrwienie nosa, wydzielina z nosa i kichanie).

<sup>3</sup> Wskaźnik zapadalności na 100 osobodni.

	Widoczne bardziej w grupie badanej	Widoczne bardziej w grupie placebo	IRR	95% CI	Wartość P
Absencja					
Antybiotyki					

**Rycina 3. Wykres leśny współczynnika zapadalności (IRR) dla absencji i stosowania antybiotyków. CI = przedział ufności.**

- **Czas trwania**

Wyniki dotyczące bólu gardła wskazują na 33% zmniejszenie średniej liczby dni z bólem gardła u dzieci w grupie aktywnej w porównaniu z placebo (3,0 vs 4,5 dni na dziecko, średnia różnica: -1,4 dnia, 95% CI: -3,0, 0,1,  $P=0,0717$ ). Nie zaobserwowano istotnych zmian w czasie trwania całkowitego URTI i innych poszczególnych objawów pomiędzy grupami.

Średnia liczba dni na epizod (długość epizodu) łącznych objawów URTI wynosiła 5,5 dnia dla grupy aktywnej; istotnie krótsza niż 6,1 dnia obserwowana dla placebo (średnia różnica: -0,66 dnia, 95% CI: -1,29, -0,04;  $P=0,0371$ ). Średnia liczba dni na epizod kaszlu była również istotnie krótsza w grupie aktywnej w porównaniu z placebo (4,1 vs 5,3 dni na epizod, średnia różnica: -1,2 dnia, 95% CI: -2,0, -0,3;  $P=0,0083$ ). Długość epizodu dla innych poszczególnych objawów nie wykazywała różnic między grupami.

## **Absencja**

Ogólnie rzecz biorąc, nastąpiło 16% istotne zmniejszenie wskaźnika absencji w szkole u dzieci suplementowanych probiotykiem Lab4 / witaminą C w porównaniu z placebo (0,0145 vs 0,0174, odpowiednio,  $P = 0,0060$ , Figura 3). Wynik z analizy post-hoc skorygowanej na kowarianty były podobne (Ryc. uzupełniająca S1). Średnia liczba dni nieobecności w szkole na dziecko wynosiła 8,3 dni w grupie aktywnej w porównaniu z 9,4 dniami w placebo (średnia różnica: -1,1 dni, 95% CI: -4,2, 1,9;  $P=0,4570$ ).

## **Stosowanie antybiotyków**

Wykres leśny na rycinie 3 przedstawia wskaźnik częstości występowania stosowania antybiotyków (niezależnie od liczby lub rodzaju antybiotyku). Wskaźnik częstości występowania całkowitego stosowania antybiotyków w grupie aktywnej był o 27% niższy niż w grupie kontrolnej ( $P = 0,0203$ ). Wynik z analizy *post-hoc* dostosowanej do kowariancji jest podobny do analizy nieskorygowanej (-29%,  $P = 0,0121$ , Ryc. uzupełniająca S1).

## **Parametry dodatkowe**

W grupie aktywnej częstość występowania całkowitych wizyt u lekarza pediatry (planowych/nieplanowanych) była zmniejszona w porównaniu z placebo (IRR: 0,81, 95% CI: 0,69, 0,95,  $P=0,0077$ ). W grupie aktywnej wystąpiło znacznie mniej zmian w normalnej konsystencji stolca w porównaniu z placebo (IRR: 1,12, 95% CI: 1,07, 1,18,  $P < 0,0001$ ) wraz ze znacznym zmniejszeniem częstości występowania epizodów wodnistych stolców (IRR: 0,56, 95% CI: 0,45, 0,71,  $P < 0,0001$ ).

Wyniki z analizy post-hoc skorygowanej o kowariancję są podobne (Tabela uzupełniająca S3 i S6). Nie było różnic między grupami w częstości występowania bólu brzucha lub wymiotów. Czworo dzieci było hospitalizowanych w okresie badania (2 placebo/2 aktywne) z powodu choroby/przyczyn niezwiązanych z zakażeniami górnych dróg oddechowych.

## **4. Omówienie**

Codzienne przyjmowanie suplementu na bazie probiotyków spowodowało znaczące zmniejszenie wskaźnika występowania kaszlu, absencji w pracy i zużycia antybiotyków w ciągu 6-miesięcznego okresu badania. Dzieci przyjmujące interwencję miały o 69% niższe ryzyko wystąpienia wszystkich pięciu objawów URTI (kaszel, ból gardła, kichanie, wydzielina z nosa i zatkanie nosa) jednego dnia w porównaniu z dziećmi przyjmującymi placebo.

Wykazano, że zarówno probiotyki, jak i witamina C posiadają zdolność immunomodulacyjną (Baud *i in.*, 2020; Carr i Maggini, 2017; Maldonado Galdeano *i in.*, 2019). Wrodzony układ odpornościowy zapewnia pierwszą linię obrony gospodarza przed wyzwaniem wirusowym i obejmuje częściowo produkcję interleukiny (IL)-12 i IL-1 $\beta$  przez komórki odpornościowe rezydujące w tkankach, takie jak makrofagi (Arango Duque i Descoteaux, 2014). Te cytokiny prozapalne odgrywają kluczowe role w rozwiązywaniu infekcji poprzez regulację wydzielania chemokin i innych cytokin oraz promowanie różnicowania, rekrutacji i aktywacji komórek odpornościowych (Guo *i in.*, 2019; Rathinam i Fitzgerald, 2010). Prace *in vitro* z konsorcjum probiotycznym Lab4 wykazały zwiększoną produkcję IL-12 i IL-1 $\beta$  przez makrofagi poddane symulowanemu wyzwaniu wirusowemu, wskazując w ten sposób na możliwość zwiększenia



odpowiedzi immunologicznej na infekcję (Davies *et al.*, 2018). Podobne wyniki *in vitro* w makrofagach zaobserwowano w odpowiedzi na stymulację *Lactobacillus rhamnosus* GG (Miettinen *i in.*, 2012). Uważa się, że witamina C posiada właściwości wirusobójcze i wykazano, że indukuje ekspresję interferonów przeciwwirusowych podczas wczesnych etapów infekcji wirusowej (Colunga Biancatelli *i in.*, 2020). Korzyści z połączenia probiotyku Lab4 i niskiej dawki witaminy C na występowanie i czas trwania objawów URTI zostały po raz pierwszy wykazane w naszym badaniu PROCHILD z udziałem dzieci w wieku od 3 do 6 lat, jednak nie wykryto różnic między grupami w poziomie cytokin w osoczu, mimo że próbki krwi nie były pobierane, gdy dzieci były objawowe (Garaiova *i in.*, 2015).

W innych badaniach kombinacji probiotyków wieloszczepowych korzystny wpływ na URTI u dzieci zaobserwowano przy zastosowaniu *L. acidophilus* NCFM/*B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 (1×10<sup>10</sup> jtk/dzień) (Leyer *i wsp.*, 2009), a także *L. acidophilus*/*B. bifidum* (4×10<sup>9</sup> jtk/dzień) (Rerksuppaphol i Rerksuppaphol, 2012). Niewielkie lub żadne efekty odnotowano w przypadku *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 w połączeniu z *L. rhamnosus* GG (2×10<sup>9</sup> jtk/dzień) (Laursen *i wsp.*, 2017) lub *Lactobacillus plantarum* HEAL9/*Lactobacillus paracasei* 8700:2 (1×10<sup>9</sup> jtk/dzień) (Lazou Ahren *i wsp.*, 2020).

Metaanaliza badań interwencyjnych dotyczących witaminy C wykazała, że u dzieci suplementowanych witaminą C w dawce 200 mg/dobę lub większej czas trwania URTI został skrócony o 14%, a przy wyższych dawkach witaminy C (1 do 2 g/dobę) uzyskano redukcję o 18%. Istnieją ograniczone dowody na poparcie jakiegokolwiek korzystnego wpływu niskiej dawki witaminy C (<200 mg dziennie) na URTI (Hemilä i Chalker, 2013). Według naszej najlepszej wiedzy, nie ma opublikowanych dowodów przez inne grupy badawcze wykazujących korzystne działanie dla probiotyków z witaminą C (poniżej 100 mg/dzień) w zapobieganiu lub postępowaniu w zakażeniu górnych dróg oddechowych u dzieci. W jednym badaniu wykazano korzystny efekt przy zastosowaniu preparatu ziołowego zawierającego echinacę, propolis i witaminę C (100 mg do 150 mg/dzień) w postępowaniu w zakażeniach dróg oddechowych u dzieci w wieku 1-5 lat (Cohen *i wsp.*, 2004). Niskie dawki witaminy C (10-50 mg) zostały włączone jako składnik placebo w niektórych wczesnych badaniach nad witaminą C (Vorilhon *i in.*, 2019).

Kaszel jest powszechny u dzieci i najczęściej spowodowany jest ostrą infekcją układu oddechowego. W dużym populacyjnym prospektywnym badaniu kohortowym u 69% dzieci w wieku od 1 do 18 lat odnotowano kaszel z przeziębieniem niezależnie od wieku (Jurca *i wsp.*, 2017). U chińskich dzieci (w wieku od 3 do 5 lat) uczęszczających do żłobka suplementacja *L. acidophilus* NCFM w połączeniu z *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 w dawce 10<sup>10</sup> jtk/dzień przez 6 miesięcy spowodowała znaczące zmniejszenie częstości występowania kaszlu (Leyer *i wsp.*, 2009). Kaszel został również zmniejszony u tajskich dzieci w wieku 8-13 lat suplementowanych kombinacją *L. acidophilus*/*B. bifidum* w dawce 4×10<sup>9</sup> cfu/dzień przez 3 miesiące (Rerksuppaphol i Rerksuppaphol, 2012). W naszym badaniu z udziałem dzieci w wieku od 3 do 10 lat zaobserwowaliśmy znaczące zmniejszenie częstości występowania i długości epizodów kaszlu wraz ze wskazaniem na opóźnienie początku pierwszego zdarzenia kaszlowego, co sugeruje, że aktywna interwencja może zmniejszyć podatność tych dzieci na kaszel.

Ponadto zaobserwowaliśmy poprawę w zakresie bólu gardła z aktywną interwencją, ale nie w zakresie gorączki, przekrwienia nosa / wydzieliny, kichania, świszczącego oddechu lub bólu ucha. Inne badania z wieloszczepowymi interwencjami probiotycznymi odnotowały redukcje gorączki i kataru obok kaszlu (Leyer *et al.*, 2009; Rerksuppaphol i Rerksuppaphol, 2012). Autorzy nie oceniali wpływu probiotyku na występowanie bólu gardła.

Zmniejszona częstość występowania URTI może przyczynić się do mniejszej absencji dziecka w szkole i mniejszego zapotrzebowania na rodziców/opiekunów i świadczeniodawców opieki zdrowotnej. Nasze badanie wykazało znaczne zmniejszenie wskaźnika zapadalności na absencję przy aktywnej interwencji zgodnie z innymi badaniami dotyczącymi probiotyków (Hatakka *i in.*, 2001; Hojsak *i in.*, 2010; Leyer *i in.*, 2009; Rerksuppaphol i Rerksuppaphol, 2012).

Niewłaściwe stosowanie antybiotyków w przypadku URTI u dzieci jest problemem globalnym (Holstiege *i in.*, 2014) i wymagane są strategie, aby zminimalizować zwiększone rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki związane z niewłaściwym stosowaniem i wszelkimi potencjalnymi szkodliwymi wpływami na długoterminowe zdrowie. Stwierdzono, że niemowlęta i dzieci uzupełnione probiotykami w celu zapobiegania ostrym infekcjom układu oddechowego i przewodu pokarmowego miały 29% niższe względne ryzyko przepisania antybiotyków (King *i in.*, 2019). Zaobserwowaliśmy również znaczące 27% zmniejszenie częstości stosowania antybiotyków obok znacznie zmniejszonej częstości wizyt u lekarza pediatry.

Jedną z mocnych stron naszego badania jest to, że jest to nasze drugie długoterminowe badanie z tą samą interwencją opartą na probiotykach, skupiającą się na zapobieganiu objawom URTI i absencji u dzieci, ale w tym przypadku zakres wiekowy został poszerzony. Ponadto rekrutacja uczestników została przeprowadzona w czterech odrębnych ośrodkach pediatrycznych w dwóch różnych miastach południowo-zachodniej Słowacji, aby zminimalizować wszelkie ograniczenia związane z jednym ośrodkiem i umożliwić lepszą generalizację naszych wyników. Z drugiej strony,

jesteśmy świadomi braku formalnego obliczenia mocy ze względu na eksploracyjny charakter badania z szerszym zakresem wiekowym dzieci. Nie uwzględniliśmy samych probiotyków ani samej witaminy C, ponieważ naszym celem było zastosowanie protokołu z naszego pierwszego badania, w którym niska dawka witaminy C została dołączona do interwencji probiotycznej w odpowiedzi na sugestie pediatrów, którzy mieli rekrutować dzieci do badania (spodziewali się oni lepszej akceptacji rodziców dla udziału w badaniu z witaminą C jako składnikiem interwencji). W przyszłych badaniach przydatne byłoby włączenie oceny nasilenia objawów jako dodatkowego wyniku. Interesujące byłoby również przyjrzenie się zależności pomiędzy objawami URTI a występowaniem i nasileniem gorączki.

Nasze wyniki sugerują korzystny wpływ suplementacji konsorcjum probiotyków Lab4 w połączeniu z niską dawką witaminy C na częstość występowania kaszlu, absencji w pracy i stosowania antybiotyków u dzieci w wieku od 3 do 10 lat.

### ***Materiał uzupełniający***

Materiały uzupełniające można znaleźć online na stronie <https://doi.org/10.3920/BM2020.0185>.

**Tabela S1.** Analiza *post-hoc* skorygowana o zmienne dla częstości występowania infekcji górnych dróg oddechowych i innych objawów z leczeniem jako zmienną badaną i wiekiem, płcią i historią alergii jako zmiennymi.

**Tabela S2.** Analiza *post-hoc* skorygowana o zmienne dla częstości występowania liczby pięciu wspólnych objawów infekcji górnych dróg oddechowych z leczeniem jako zmienną badaną i wiekiem, płcią i historią alergii jako zmiennymi.

**Tabela S3.** Analiza *post-hoc* skorygowana o zmienne dla częstości występowania wizyt u lekarza pediatry i konsystencji stolca z leczeniem jako zmiennej badawczej oraz wieku, płci i historii alergii jako zmiennych.

**Tabela S4.** Analiza *post-hoc* skorygowana o zmienne dla częstości występowania infekcji górnych dróg oddechowych i innych objawów z leczeniem jako zmienną badaną i wiekiem, płcią i historią alergii jako zmiennymi (wartości b i 95% CI).

**Tabela S5.** Skorygowana *post-hoc* analiza kowariancyjna dla częstości występowania liczby pięciu wspólnych objawów infekcji górnych dróg oddechowych z leczeniem jako zmienną badaną i wiekiem, płcią i historią alergii jako kowariantami (wartości b i 95% CI).

**Tabela S6.** Skorygowana *post-hoc* analiza kowariancyjna dla częstości występowania wizyt u lekarza pediatry, konsystencji stolca, absencji i stosowania antybiotyków z leczeniem jako zmienną badawczą i wiekiem, płcią i historią alergii jako kowariantami (wartości b i 95% CI).

**Rycina S1.** Analiza *post-hoc* dostosowana do kowariancji dla współczynnika zapadalności wykres leśny absencji i stosowania antybiotyków z wiekiem, płcią i historią alergii jako kowariantami.

### ***Podziękowania***

Dziękujemy P. Lukács MD, G. Miškejeová MD, I. Macuchová MD, D. Kollárová MD, L. Chandogová, D. Opalená, A. Kissová, B. Kocsisová, L. Zámečnicková, M. Bohmerová i K. Turner za doskonałą pomoc kliniczną i techniczną oraz wszystkim dzieciom i rodzicom, którzy uczestniczyli w badaniu.

### ***Konflikty interesów***

Firma Cultech Limited dostarczyła produkty do badań i zapewniła finansowanie. I.G., D.R.M. i S.F.P. są pracownikami Cultech Ltd i nie mieli udziału w rekrutacji, zbieraniu danych i analizie. Z.P., Z.N., D.W., J.R.M., Z.Ď. i J.M. są/byli zaangażowani w inne projekty współpracy z Cultech Limited.

## Bibliografia

1. Angurana, S.K. and Bansal, A., 2020. Probiotics and COVID-19: think about the link. *British Journal of Nutrition*: 1-26. <https://doi.org/10.1017/S000711452000361X.2>.
2. Arango Duque, G. and Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* 5: 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
3. Baud, D., Dimopoulou Agri, V., Gibson, G.R., Reid, G. and Giannoni, E., 2020. Using probiotics to flatten the curve of coronavirus disease COVID-2019 pandemic. *Front Public Health* 8: 186. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00186>
4. Carr, A.C. and Maggini, S., 2017. Vitamin C and immune function. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9112111.5>.
5. Cohen, H.A., Varsano, I., Kahan, E., Sarrell, E.M. and Uziel, Y., 2004. Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis, and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine* 158: 217-221. <https://doi.org/10.1001/archpedi.158.3.217>
6. Colunga Biancatelli, R.M.L., Berrill, M. and Marik, P.E., 2020. The antiviral properties of vitamin C. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 18: 99-101. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1706483>
7. d'Ettorre, G., Ceccarelli, G., Marazzato, M., Campagna, G., Pinacchio, C., Alessandri, F., Ruberto, F., Rossi, G., Celani, L., Scagnolari, C., Mastropietro, C., Trinchieri, V., Recchia, G.E., Mauro, V., Antonelli, G., Pugliese, F. and Mastroianni, C.M., 2020. Challenges in the management of SARS-CoV2 infection: the role of oral bacteriotherapy as complementary therapeutic strategy to avoid the progression of COVID-19. *Frontiers in Medicine* 7: 389. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00389>
8. Davies, T., Plummer, S., Jack, A., Allen, M. and Michael, D., 2018. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* promote antibacterial and antiviral immune response in human macrophages. *Journal of Probiotics and Health* 6: 195. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000195>
9. Emre, I.E., Eroglu, Y., Kara, A., Dinleyici, E.C. and Ozen, M., 2020. The effect of probiotics on prevention of upper respiratory tract infections in the paediatric community – a systematic review. *Beneficial Microbes* 11: 201-211. <https://doi.org/10.3920/BM2019.0119>
10. Feleszko, W., Marengo, R., Vieira, A.S., Ratajczak, K. and Mayorga Butron, J.L., 2019. Immunity-targeted approaches to the management of chronic and recurrent upper respiratory tract disorders in children. *Clinical Otolaryngology* 44: 502-510. <https://doi.org/10.1111/coa.13335>
11. Garaiova, I., Muchova, J., Nagyova, Z., Wang, D., Li, J.V., Orszaghova, Z., Michael, D.R., Plummer, S.F. and Ďuračková, Z., 2015. Probiotics and vitamin C for the prevention of respiratory tract infections in children attending preschool: a randomised controlled pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition* 69: 373-379. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.174>
12. Guo, Y., Cao, W. and Zhu, Y., 2019. Immunoregulatory functions of the IL-12 family of cytokines in antiviral systems. *Viruses* 11: 772. <https://doi.org/10.3390/v11090772>
13. Hao, Q., Dong, B.R. and Wu, T., 2015. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*: CD006895. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006895.pub3>
14. Hatakka, K., Savilahti, E., Ponka, A., Meurman, J.H., Poussa, T., Nase, L., Saxelin, M. and Korpela, R., 2001. Effect of long-term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 322: 1327.
15. Hemila, H. and Chalker, E., 2013. Vitamin C for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1: CD000980. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000980.pub4>
16. Hojsak, I., Snovak, N., Abdović, S., Szajewska, H., Misak, Z. and Kolacek, S., 2010. *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. *Clinical Nutrition* 29: 312-316. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.09.008>
17. Holstiege, J., Schink, T., Molokhia, M., Mazzaglia, G., Innocenti, F., Oteri, A., Bezemer, I., Poluzzi, E., Puccini, A., Ulrichsen, S.P., Sturkenboom, M.C., Trifiro, G. and Garbe, E., 2014. Systemic antibiotic prescribing to paediatric outpatients in 5 European countries: a population-based cohort study. *BMC Pediatrics* 14: 174. <https://doi.org/10.1186/1471-2431-14-174>
18. Jurca, M., Ramette, A., Dogaru, C.M., Goutaki, M., Spycher, B.D., Latzin, P., Gaillard, E.A. and Kuehni, C.E., 2017. Prevalence of cough throughout childhood: a cohort study. *PLoS ONE* 12: e0177485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177485>
19. King, S., Glanville, J., Sanders, M.E., Fitzgerald, A. and Varley, D., 2014. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition* 112: 41-54. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000075>
20. King, S., Tancredi, D., Lenoir-Wijnkoop, I., Gould, K., Vann, H., Connors, G., Sanders, M.E., Linder, J.A., Shane, A.L. and Merenstein, D., 2019. Does probiotic consumption reduce antibiotic utilization for common acute infections? A systematic review and metaanalysis. *European Journal of Public Health* 29: 494-499. <https://doi.org/10.1093/eurpub/cky185>
21. Laursen, R.P., Larnkjaer, A., Ritz, C., Hauger, H., Michaelsen, K.F. and Molgaard, C., 2017. Probiotics and childcare absence due to infections: a randomized controlled trial. *Pediatrics* 140: e20170735. <https://doi.org/10.1542/peds.2017-0735>
22. Lazou Ahren, I., Berggren, A., Teixeira, C., Martinsson Niskanen, T. and Larsson, N., 2020. Evaluation of the efficacy of *Lactobacillus plantarum* HEAL9 and *Lactobacillus paracasei* 8700:2 on aspects of common cold infections in children attending day care: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical study. *European Journal of Nutrition* 59: 409-417. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02137-8>
23. Lenoir-Wijnkoop, I., Merenstein, D., Korchagina, D., Broholm, C., Sanders, M.E. and Tancredi, D., 2019. Probiotics reduce health care cost and societal impact of flu-like respiratory tract infections in the USA: an economic modeling study. *Frontiers in Pharmacology* 10: 980. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00980>
24. Leyer, G.J., Li, S., Mubasher, M.E., Reifer, C. and Uwehand, A.C., 2009. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. *Pediatrics* 124: e172-e179. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2666>
25. Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S.I., Lemme Dumit, J.M., Velez, E. and Perdigon, G., 2019. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *annals of nutrition and metabolism* 74: 115-124. <https://doi.org/10.1159/000496426>
26. Marengo, R.L., Ciceran, A. and Del Río Navarro, B.E., 2017. Upper respiratory tract infections in children and adults: burden and management. A narrative summary of selected presentations that took place on 11th-12th May 2017, as part of the Encuentro Latinoamericano de Infecciones Respiratorias Recurrentes (ELAIR) educational event in Mexico City, Mexico. *EMJ Respiratory* 5: 22-28.
27. Miettinen, M., Pietila, T.E., Kekkonen, R.A., Kankainen, M., Latvala, S., Pirhonen, J., Osterlund, P., Korpela, R. and Julkunen, I., 2012. Nonpathogenic *Lactobacillus rhamnosus* activates the inflammasome and antiviral responses in human macrophages. *Gut Microbes* 3: 510-522. <https://doi.org/10.4161/gmic.21736>
28. Rathinam, V.A. and Fitzgerald, K.A., 2010. Inflammasomes and anti-viral immunity. *Journal of Clinical Immunology* 30: 632-637. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9431-4>
29. Rerksuppaphol, S. and Rerksuppaphol, L., 2012. Randomized controlled trial of probiotics to reduce common cold in schoolchildren. *Pediatrics International* 54: 682-687. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2012.03647.x>
30. Tiwari, S.K., Dicks, L.M.T., Popov, I.V., Karaseva, A., Ermakov, A.M., Suvorov, A., Tagg, J.R., Weeks, R. and Chikindas, M.L., 2020. Probiotics at war against viruses: what is missing from the picture? *Frontiers in Microbiology* 11: 1877. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01877>
31. Vorilhon, P., Arpajou, B., Vaillant Roussel, H., Merlin, E., Pereira, B. and Cabaillet, A., 2019. Efficacy of vitamin C for the prevention and treatment of upper respiratory tract infection. A meta-analysis in children. *European Journal of Clinical Pharmacology* 75: 303-311. <https://doi.org/10.1007/s00228-018-2601-7>
32. Zheng, D., Liwinski, T. and Elinav, E., 2020. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Research*