Probiotyki i witamina C w profilaktyce zakażeń dróg oddechowych u dzieci uczęszczających do przedszkola: randomizowane kontrolowane badanie pilotażowe

KONTEKST: W tym pilotażowym badaniu badano skuteczność konsorcjum probiotyków (Lab4) w połączeniu z witaminą C w profilaktyce zakażeń dróg oddechowych u dzieci uczęszczających do placówek przedszkolnych.

PODMIOTY/METODY: W podwójnie ślepym, randomizowanym, badaniu pilotażowym kontrolowanym placebo z udziałem dzieci w wieku 3-6 lat, 57 uczestników otrzymywało 1.25×10^{10} jednostek tworzących kolonie *Lactobacillus acidophilus* CUL21 (NCIMB 30156), *Lactobacillus acidophilus* CUL60 (NCIMB 30157), *Bifidobacterium bifidum* CUL20 (NCIMB 30153) i *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* CUL34 (NCIMB 30172) plus 50 mg witaminy C albo placebo codziennie przez 6 miesięcy.

WYNIKI: Istotne zmniejszenie częstości występowania infekcji górnych dróg oddechowych (URTI; 33%, *P* = 0,002), liczby dni z objawami URTI (średnia różnica: -21,0, 95% przedział ufności (CI): -35,9, -6,0, *P* = 0,006) oraz częstość występowania nieobecności w przedszkolu (30%, *P* = 0,007) obserwowano w grupie aktywnej w porównaniu z placebo. Liczba dni stosowania antybiotyków, leków przeciwbólowych, leków na kaszel lub sprayów do nosa była niższa w grupie aktywnej i osiągnęła istotność dla stosowania leków na kaszel (średnia różnica: -6,6, 95% CI: -12,9, -0,3, P = 0,040). Nie zaobserwowano istotnych różnic w współczynniku zapadalności lub czasie trwania infekcji dolnych dróg oddechowych ani w poziomach cytokin w osoczu, immunoglobuliny A w ślinie lub metabolitów w moczu.

WNIOSKI: Suplementacja kombinacją probiotyku/witaminy C może być korzystna w zapobieganiu i zarządzaniu URTI.

European Journal of Clinical Nutrition (2015) 69, 373-379; doi:10.1038/ejcn.2014.174; opublikowano online 10 września 2014 r.

1. Wprowadzenie

Infekcje dróg oddechowych (respiratory tract infection - rti) u dzieci stanowią znaczne obciążenie dla służby zdrowia, obejmujące nie tylko koszty bezpośredniej opieki medycznej, ale także koszty związane z nieobecnością rodziców w pracy.[1] Dzieci uczęszczające do przedszkola są trzykrotnie bardziej narażone na zakażenie niż te pozostające w domu, ze względu na wysoki wskaźnik transmisji w takich placówkach.[2] RTI może wystąpić w górnych lub dolnych drogach oddechowych, dotykając zatok, gardła, dróg oddechowych lub płuc. Antybiotyki są podawane w przypadku zakażeń bakteryjnych, ale ich stosowanie w przypadku zakażeń wirusowych jest nieskuteczne i może przyczynić się do nadużywania antybiotyków i wzrostu oporności na nie.[3] Potrzebne są alternatywne strategie zapobiegania RTI u dzieci uczęszczających do przedszkola.[4]

Dowody wskazują, że suplementacja probiotykami może zapobiegać zakażeniom górnych dróg oddechowych (URTI).[5] Probiotyki definiuje się jako „żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiedniej ilości przynoszą gospodarzowi korzyści zdrowotne".[6] Niektóre badania z zastosowaniem samych probiotyków u dzieci uczęszczających do placówek przedszkolnych wykazały znaczące zmniejszenie częstości występowania i/lub czasu trwania URTI[7–11], podczas gdy w innych obserwowano niewielki efekt lub jego brak.[12,13] Metaanaliza wyników suplementacji witaminą C również sugeruje korzystny wpływ na czas trwania objawów przeziębienia u dzieci.[14]

Podawanie *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 lub *Lactobacillus reuteri* F275 zapobiegało ciężkiemu RTI u zdrowych myszy poprzez zmniejszenie ekspresji cytokin prozapalnych w błonie śluzowej układu oddechowego,[15] a w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej pobranych od zdrowych ludzi suplementowanych probiotykiem Lab4 zaobserwowano „przeciwzapalne wzbudzenie" odporności.[16] Wykazano również, że witamina C hamuje odpowiedź cytokin prozapalnych w monocytach i limfocytach pobranych od zdrowych dorosłych,[17] ale do tej pory żadne badania nie badały wpływu połączenia probiotyku i witaminy C na RTI u dzieci w wieku przedszkolnym. Celem tego badania było zbadanie wpływu konsorcjum probiotyków w połączeniu z witaminą C zarówno na częstość występowania, jak i czas trwania RTI oraz ocena wszelkich związanych z tym zmian immunologicznych i metabolicznych u dzieci.

2. Materiały i metody

Uczestnicy

Do badania przyjęto 69 zdrowych dzieci (3-6 lat) uczęszczających do przedszkola na Słowacji. Przed udziałem w badaniu uzyskano pisemną świadomą zgodę od rodziców lub opiekunów prawnych. Dzieci zostały wykluczone jeśli przyjmowały leki lub produkty immunostymulujące lub jakąkolwiek formę probiotyku przed lub w czasie rekrutacji lub jeśli były wrażliwe na ksylitol/sorbitol. Żadne z dzieci nie otrzymało szczepionki przeciwko grypie w okresie badania.

Projekt badania i interwencja

Przeprowadzono podwójnie zaślepione, randomizowane, kontrolowane placebo badanie. Protokół został zatwierdzony przez Komitet Etyczny Wydziału Opieki Zdrowotnej i Farmacji Ludzkiej, Trnava, Słowacja (16/09/2010) i zarejestrowany w Current Controlled Trials (ISRCTN28722693). W trakcie 6-miesięcznego okresu badania interwencyjnego dzieci otrzymywały codziennie albo jedną tabletkę do żucia zawierającą konsorcjum probiotyczne Lab4 składające się z dwóch szczepów *Lactobacillus acidophilus* CUL21 (NCIMB 30156) i CUL60 (NCIMB 30157), *Bifidobacterium bifidum* CUL20 (NCIMB 30153) i *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* CUL34 (NCIMB 30172) w łącznej ilości $1{,}25 \times 10^{10}$ jednostek tworzących kolonie (*Lactobacillus* sp. 1×10^{10} i *Bifidobacterium sp.* $0{,}25 \times 10^{10}$) oraz 50 mg witaminy C na podłożu ksylitolu lub identycznie wyglądającej tabletki placebo zawierającej ksylitol (Cultech Ltd, Port Talbot, Wielka Brytania). Zgodność z przepisami była oceniana poprzez monitorowanie ilości zwróconych tabletek.

Gromadzenie danych

Dzieci zostały zbadane przez lekarza pediatrę i zapisano informacje ogólne, w tym historię alergii. Masa ciała i wzrost były mierzone przy użyciu cyfrowej stacji ważąco-pomiarowej z automatycznym obliczaniem wskaźnika masy ciała (kg/m^2, SECA 764, SECA Deutschland, Hamburg, Niemcy). Dwunastogodzinne próbki krwi żylnej na czczo zostały zebrane do probówek z EDTA-vacutainer, a osocze zostało wyekstrahowane przez wirowanie (1200 *g,* 10 min) przed przechowywaniem w temperaturze -80 °C. Próbki moczu były zbierane z pierwszego porannego oddania moczu i przechowywane w temperaturze -80 °C przed analizą ^{1}H magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Przed zebraniem śliny dzieci wypłukały usta zimną wodą, a ślina została zebrana do plastikowych probówek i przechowywana w temperaturze -20 °C. Rodzice/opiekunowie wypełniali tygodniowe dzienniczki objawów monitorujące temperaturę, katar, ból gardła, kaszel, świszczący oddech w klatce piersiowej, ból ucha, biegunkę, wymioty, bóle brzucha, nieobecność w przedszkolu, recepty na antybiotyki, wizyty lekarskie, hospitalizację i wszelkie leki przyjmowane w okresie interwencji. Na początku i na końcu badania wypełniali opracowany przez dietetyka kwestionariusz nawyków żywieniowych i wzoru aktywności fizycznej składający się z 3 pytań dotyczących wzorów posiłków i napojów, 12 pytań dotyczących spożycia różnych pokarmów i 3 pytań odnoszących się do aktywności fizycznej. Kwestionariusze zostały ocenione przy użyciu systemu punktowego, a sumaryczne wyniki na początku i po zakończeniu badania zostały porównane.

W okresie interwencji dzieci były badane przez lekarza pediatrę podczas zaplanowanych wizyt w 2, 4 i 6 miesiącu lub podczas nieplanowanych wizyt wynikających z URTI, LRTI lub innej choroby. W wieku 6 miesięcy pobrano krew, mocz i ślinę. Nie wszystkie dzieci dostarczyły próbki śliny lub krwi w dniach pobierania, co zmniejszyło liczebność grupy aktywnej i placebo.

Pomiar poziomu cytokin w osoczu

Kwantyfikację interferonu-γ (IFN-γ), interleukiny (IL)-10, IL-12p70, IL-13, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8 oraz czynnika martwicy nowotworow-α (TNF-α) przeprowadzono przy użyciu tablicy elektrochemiluminescencji MULTI-SPOT (technologia MSD) zgodnie z protokołem producenta (CBS, Cardiff University, Cardiff, UK).

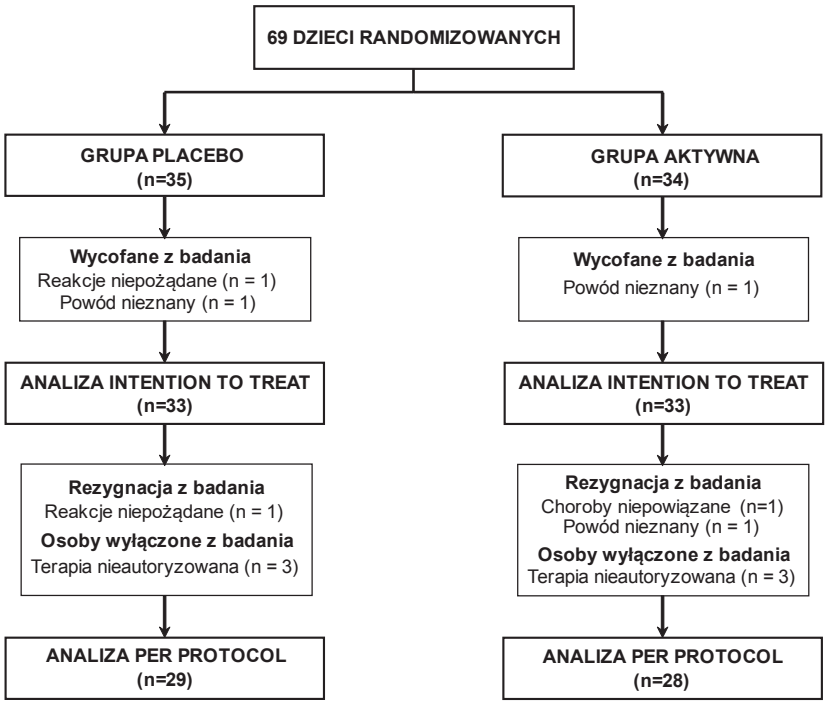
Pomiar całkowitej immunoglobuliny A (IgA) w ślinie

Próbki śliny odwirowywano przy 800 *g* przez 15 minut, a poziom IgA oznaczano testem immunoenzymatycznym (E80-102, Bethyl Laboratories, Montgomery, AL, USA).

Analiza spektroskopowa ^{1}H NMR próbek moczu

Próbki moczu rozmrażano w temperaturze pokojowej, wirowano przez 10 s i odwirowywano przy 10 000 *g* przez 10 min, a supernatant przenoszono do 96-dołkowej płytki i przy użyciu systemu robotycznego (Bruker, Rheinstetten, Niemcy). W sumie 540 µl próbki moczu zmieszano z 60 µl 1,5 M buforu fosforanu potasu w D_2 O, pH = 7,4, 0,1% soli sodowej kwasu 3-(trimetylosilil)-[2,2,3,3-^{2} H_4] propionowego (TSP) oraz 2 mM azydku sodu i przeniesiono do probówki NMR. Widma ^{1}H NMR uzyskano przy użyciu spektrometru Bruker 600 MHz (BrukerGermany) przy częstotliwości roboczej ^{1} H wynoszącej 600,13 MHz w temperaturze 300 K. Standardowa sekwencja impulsów NMR (recycle delay-90°-t_1 -90°-t_m -90°-acquisition) dostarczyła standardowych jednowymiarowych danych spektralnych ^{1}H NMR (t_1 wynosił 3 ms, a t_m (czas mieszania) wynosił 10 ms). Tłumienie piku wody uzyskano stosując selektywne napromieniowanie podczas opóźnienia cyklu 4 s i t_m. Impuls o kącie 90 stopni dostosowano do 10 µs. Łącznie 32 skany zostały zebrane w 64 k punktów danych o szerokości spektralnej 20 p.p.m.

Rycina 1. Schemat rekrutacji uczestników.



Randomizacja

Kwalifikujący się uczestnicy zostali przydzieleni w stosunku 1:1 do dwóch ramion badania zgodnie z wygenerowaną komputerowo sekwencją losową przy użyciu randomizacji blokowej z wielkością bloku wynoszącą cztery. Randomizacja została przeprowadzona przez statystyka badania, który nie miał kontaktu z uczestnikami. Uczestnicy byli zapisywani i przydzielani kolejno do interwencji przez lekarza pediatrę. Sekwencja przydziału nie była dostępna dla żadnego członka zespołu badawczego, dopóki bazy danych nie zostały wypełnione i zablokowane.

Środki dotyczące punktów końcowych

Pierwotnymi miarami punktu końcowego była częstość występowania i czas trwania URTI i infekcji dolnych dróg oddechowych (LRTI), nieobecność w przedszkolu i liczba wizyt w centrum pediatrycznym z powodu RTI. Objawy URTI obejmowały kichanie, ból gardła, kaszel, katar i zatkany nos. Każdy odrębny epizod był okresem czasu (w dniach) obejmującym ciągłe występowanie objawów, oddzielonych od innego epizodu o minimum 24 godziny. LRTI był potwierdzony przez lekarza pediatrę, a czas trwania LRTI był liczbą dni pomiędzy potwierdzonym przez lekarza początkiem i brakiem objawów. Drugorzędowymi punktami końcowymi były zmiany w cytokinach osocza, ślinie IgA i metabolitach moczu. Wskaźniki zgłaszane przez rodziców obejmowały biegunkę (≥ 3 luźne stolce w ciągu 24 godzin), wymioty i bóle brzucha.

Zarządzanie danymi i ich analiza

Jako badanie pilotażowe nie przeprowadzono formalnego obliczenia wielkości próby. Dla analizy pierwszorzędowego punktu końcowego obliczono współczynnik zapadalności (liczba epizodów podzielona przez liczbę dni w badaniu) oraz średnią różnicę w czasie trwania URTI i LRTI, nieobecności w przedszkolu i liczbę wizyt w ośrodku pediatrycznym z powodu RTI w okresie interwencji wraz z 95% przedziałami ufności (CI) przy użyciu uogólnionego modelu liniowego (GLM), który uwzględniał leczenie jako pojedynczy predyktor. Wtórne immunologiczne punkty końcowe analizowano podobnie. Do analizy GLM ciągłego punktu końcowego, takiego jak czas trwania URTI i LRTI, zastosowano rozkład normalny i funkcje powiązania tożsamości. Do analizy GLM nawrotów zdarzeń (takich jak liczba epizodów objawów URTI) wykorzystano rozkład Poissona i funkcje powiązania logarytmicznego. Analizy *post-hoc* skorygowane o kowariancję w ramach GLM przeprowadzono dla pierwszorzędowych punktów końcowych z leczeniem jako zmienną badaną oraz ośrodkiem, wiekiem, płcią i wskaźnikiem masy ciała jako zmiennymi. Analizę podgrup przeprowadzono według płci. Zmienne ciągłe podsumowano za pomocą liczby obserwacji, średniej (s.d.), natomiast zmienne kategoryczne podsumowano za pomocą liczby i odsetka zdarzeń.

Analizę punktów końcowych przeprowadzono w analizie per protocol (PP) oraz w zmodyfikowanej populacji intention-to-treat (ITT) z wyłączeniem uczestników, którzy wycofali się z badania krótko po randomizacji. Analizę danych z kwestionariusza nawyków żywieniowych i ćwiczeń fizycznych przeprowadzono przy użyciu modelu GLM, z leczeniem jako zmienną badaną i pomiarem wyjściowym jako kowariantem. Analizę danych przeprowadzono przy użyciu programu SAS w wersji 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Analiza danych ^{1}H NMR

Automatyczne fazowanie, korekcja linii bazowej i odniesienie do sygnału TSP przy δ1H 0,00 zostały wykonane na widmach moczu 1H NMR. Przetworzone dane widmowe NMR (δ1H 0,25-10) importowano do programu MATLAB (R2012a, 7.14.0.739, MathWorks) i digitalizowano na 20 k punktów danych z rozdzielczością 0,0005 p.p.m. przy użyciu skryptu MATLAB opracowanego w ramach Sekcji Medycyny Obliczeniowej i Systemowej. Region piku wody (δ1H 4.7-4.9) został usunięty ze względu na nieuporządkowany kształt piku spowodowany tłumieniem wody. Dodatkowo, zmiany intensywności sygnału mocznika (δ1H 5.4-6.1) mogą być spowodowane wymianą chemiczną z rozpuszczalnikiem, dlatego region ten został również usunięty. Na pozostałych danych spektralnych przeprowadzono probabilistyczną normalizację ilorazową w celu uwzględnienia rozcieńczenia złożonych mieszanin biologicznych. Analiza składowych głównych i ortogonalna analiza dyskryminacyjna metodą częściowych najmniejszych kwadratów zostały przeprowadzone na danych skalowanych z wariancją jednostkową w oprogramowaniu THE SIMCA (P+13.0) i MATLAB. W celu skorelowania danych metabolicznych z pomiarami cytokin przeprowadzono ortogonalne analizy regresji częściowych najmniejszych kwadratów.

3. Wyniki

Rekrutacja i charakterystyka podstawowa

69 dzieci zostało zapisanych między październikiem 2010 a marcem 2011; 35 do grupy placebo i 34 do aktywnej. Troje dzieci nie dostarczyło żadnych zapisów i wycofało się z badania. Dziewięć dzieci zostało wykluczonych z analizy PP;

sześć z powodu nieautoryzowanego stosowania leczenia i trzy z powodu nieukończenia okresu obserwacji *(Rycina 1*). Jak widać w *Tabeli 1*, dane wyjściowe dla obu grup wydają się porównywalne. Kohorta składa się z 16 dziewczynek i 17 chłopców na grupę, a średni wiek wynosi 5 lat. W sumie 12% dzieci w grupie placebo i 6% w grupie aktywnej miało choroby atopowe.

Pierwotne punkty końcowe

Stwierdzono istotne skrócenie czasu trwania całkowitych objawów URTI (dni) w grupie aktywnej w porównaniu z placebo (analiza PP; średnia różnica: -21,0, 95% CI: -35,9, -6,0, *P* = 0,006, analiza ITT; średnia różnica: -17,9, 95% CI: -31,6, -4,2, *P* = 0,011; *Tabela 2*). Wskaźnik częstości występowania objawów URTI w grupie aktywnej wynosił 0,0196 w porównaniu z 0,0293 w grupie placebo (redukcja o 33%, 95% CI w redukcji: 14%, -48%, *P* = 0,002, analiza PP; *Tabela 3*). Podobny wynik zaobserwowano, gdy przeprowadzono analizę ITT.

W sumie 35,7% dzieci w grupie aktywnej doświadczyło $\geq$ 3 różnych objawów URTI na epizod URTI w porównaniu z 51,7% dzieci w grupie placebo (różnica ryzyka: 16%, 95% CI: -9,4%, 41,4%, *P* = 0,217, analiza PP). Nie było istotnych różnic w czasie trwania lub współczynniku zapadalności na LRTI *(Tabela 4*).

Częstość występowania nieobecności w przedszkolu w grupie aktywnej wynosiła 0,0198; o 30% mniej niż w grupie placebo (0,0282, *P* = 0,007, analiza PP), a w grupie aktywnej w porównaniu z grupą placebo wystąpił trend w kierunku istotności dla liczby dni nieobecności w przedszkolu i liczby wizyt u lekarza pediatry z powodu objawów URTI (odpowiednio *P* = 0,070 i *P* = 0,082, *Tabela 2*, analiza PP). Nie zaobserwowano istotnych różnic w liczbie dni nieobecności w przedszkolu lub wizyt u lekarza z powodu LRTI, a w trakcie trwania badania nie było hospitalizacji z powodu RTI. Wyniki z analizy *post-hoc* skorygowanej o kowariancję są podobne do wyników z analizy nieskorygowanej (Supplementary Tables S3-S5).

***Tabela 1**. Podstawowe dane demograficzne*

	Placebo (N = 33)	*Grupa aktywna* (N = 33)	*Wszystkie* (N = 66)
Płeć (n)			
Dziewczyny	16	16	32
Chłopcy	17	17	34
Wiek (lata)[a]	5.0 (0.7)	4.9 (0.8)	5.0 (0.9)
Dziewczyny	4.9 (0.8)	4.8 (0.9)	4.8 (0.8)
Chłopcy	5.2 (0.6)	5.0 (0.8)	5.1 (0.7)
BMI (kg/m^2)[a]	15.6 (2.5)	15.5 (2.2)	15.5 (2.3)
Dziewczyny	15.3 (2.0)	15.8 (2.4)	15.5 (2.2)
Chłopcy	15.9 (2.9)	15.2 (2.0)	15.5 (2.5)
Ośrodek, n (%)			
Ośrodek 1	21 (63.6)	21 (63.6)	42 (63.6)
Ośrodek 2	6 (18.2)	6 (18.2)	12 (18.2)
Ośrodek 3	6 (18.2)	6 (18.2)	12 (18.2)
Egzema, *n* (%)	5 (15.2)	2 (6.1)	7 (10.6)
Choroba atopowa,[b] *n* (%)	4 (12.1)	2 (6.1)	6 (9.1)
Alergia pokarmowa, *n* (%)	3 (9.1)	0 (0)	3 (4.5)
Celiakia, *n* (%)	0 (0)	1 (3.0)	1 (1.5)

Skróty: BMI, wskaźnik masy ciała.
[a] Dane przedstawiono jako średnie (s.d.), analiza intention to treat.
[b] Alergiczny nieżyt nosa, egzema atopowa lub astma.

***Tabela 2**. Czas trwania objawów URTI, absencja i wizyty u lekarza pediatry*

	Analiza PP		*Analiza ITT*	
	Placebo (N =*29)*	*Grupa aktywna* (N =*28)*	*Placebo* (N = 33)	*Grupa aktywna* (N = 33)
Objawy URTI				
Średnia (s.d.), dni	43.1 (35.4)	22.1 (21.0)	41.5 (34.5)	23.5 (21.8)
Średnia różnica (95% CI)	-21.0 (-35.9, -6.0)		17.9 (-31.6, -4.2)	
Wartość P	0.006		0.011	
Indywidualne objawy URTI				
Kichanie				
Średnia (s.d.), dni	9.6 (14.8)	2.3 (4.0)	9.0 (14.1)	3.8 (8.6)
Średnia różnica (95% CI)	-7.4 (-12.9, -1.8)		-5.1 (-10.7, 0.4)	
Wartość P	0.010		0.069	
Kaszel				
Średnia (s.d.), dni	23.5 (20.3)	11.9 (10.1)	22.3 (19.8)	14.3 (14.4)
Średnia różnica (95% CI)	-11.6 (-19.8, -3.4)		-7.9 (-16.2, 0.3)	
Wartość P	0.006		0.058	
katar				
Średnia (s.d.), dni	21.4 (25.5)	11.5 (15.6)	19.8 (24.6)	12.3 (15.8)
Średnia różnica (95% CI)	-10.0 (-20.8, 0.9)		-7.4 (-17.2, 2.4)	
Wartość P	0.072		0.138	
Zatkany nos				
Średnia (s.d.), dni	9.8 (23.8)	4.9 (7.8)	10.4 (23.0)	5.4 (8.4)
Średnia różnica (95% CI)	-5.0 (-14.1, 4.1)		-5.0 (-13.2, 3.2)	
Wartość P	0.285		0.230	
ból gardła				
Średnia (s.d.), dni	2.8 (4.2)	1.9 (2.7)	3.2 (4.3)	1.8 (2.6)
Średnia różnica (95% CI)	-0.9 (-2.7, 0.9)		-1.4 (-3.1, 0.3)	
Wartość P	0.332		0.010	
Nieobecność, wizyty lekarskie				
Nieobecność w przedszkolu z powodu URTI				
Średnia (s.d.), dni	14.2 (18.4)	7.5 (8.0)	13.9 (17.7)	7.7 (8.6)
Średnia różnica (95% CI)	-6.7 (-14.0, 0.5)		-6.1 (-12.8, 0.5)	
Wartość P	0.070		0.069	
Liczba wizyt lekarskich z powodu URTI				
Średnia (s.d.)	2.9 (3.1)	1.6 (2.2)	2.8 (3.0)	1.8 (2.4)
Średnia różnica (95% CI)	-1.2 (-2.6, 0.2)		-0.9 (-2.2, 0.4)	
Wartość P	0.082		0.164	

Skróty: CI, przedział ufności; ITT, intention to treat; PP, per protocol; URTI, zakażenie górnych dróg oddechowych.

Drugorzędne punkty końcowe

Nie było istotnych różnic w poziomach cytokin w osoczu między grupami, ale były znaczące redukcje IL-12p70, IL-13, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10 i TNF-α między wartością wyjściową a 6 miesiącami (dane nie pokazane). Poziomy IFN-γ i IL-2/IL-5 były znacząco obniżone w grupie aktywnej po 6 miesiącach (IFN-γ; *P* = 0,035, średnia różnica: -3,1; 95% CI: -6,0, -0,2 oraz IL-2/IL-5; P = 0,023; średnia różnica: -0,2; 95% CI: -0,5, -0,04, analiza PP), ale nie dla grupy placebo. Nie było istotnych różnic w poziomach IgA pomiędzy grupami (*P* = 0,438; średnia różnica: 31,2; 95% CI: -50,3, 112,8, analiza PP).

Wykresy wyników analizy składowych głównych moczu profili metabolicznych, w tym wartości odstających, przedstawiono na *Rycinie 2*, ale nie zaobserwowano istotnych zmian z lub bez wartości odstających. Ortogonalne analizy regresji częściowych najmniejszych kwadratów zostały wykorzystane do statystycznej korelacji profili metabolicznych z mierzonymi poziomami cytokin, ale nie uzyskano znaczącej korelacji. Zestaw reprezentatywnych widm ^{1}H NMR przedstawiono na rysunku uzupełniającym S1.

Dodatkowe parametry, stosowanie antybiotyków i innych leków Nie było istotnych różnic w częstości występowania ani liczbie dni z bólem ucha, świszczącym oddechem w klatce piersiowej, temperaturą >37°C, bólem brzucha, wymiotami lub biegunką pomiędzy grupami. Obserwowana liczba dni stosowania antybiotyków, leków przeciwbólowych, leków na kaszel, aerozolu/kropli do nosa lub leków przeciwhistaminowych była niższa w grupie aktywnej w porównaniu z placebo i była istotna dla stosowania leków na kaszel (średnia różnica: -6,6, 95% CI: -12,9, -0,3, *P* = 0,040, analiza PP). Siedem z 29 dzieci (24,1%) otrzymało doustne antybiotyki w grupie placebo w porównaniu z 4 z 28 dzieci (14,3%) w grupie aktywnej (*P* = 0,356, analiza PP). W trakcie trwania badania nie było hospitalizacji z powodu RTI.

Analiza podgrup ze względu na płeć

Znaczące zmniejszenie liczby dni z objawami URTI zaobserwowano u chłopców (*P* = 0,024; średnia różnica: -25,6; 95% CI: -47,7, -3,4, analiza PP) w porównaniu z grupami dziewcząt (*P* = 0,084; średnia różnica: -17,6; 95% CI: -37,5, 2,4, analiza PP) (Tabela uzupełniająca S1). Nie zaobserwowano istotnych różnic w czasie trwania lub częstości występowania objawów LRTI między płciami (Tabela uzupełniająca S2).

Znaczące spadki lub trendy w kierunku istotności zaobserwowano w IL-12p70 (*P* = 0,060, 95% CI: -0,6, 0,0), IL-12p70/IL-10 (*P* = 0,025, 95% CI: -0,3, -0.02), IL-12p70/IL-5 (*P* = 0,032, 95% CI: -2,0, -0,1) i IL-2/IL-10 (*P* = 0,025, 95% CI: -0,3, -0,02) u chłopców z grupy aktywnej w porównaniu z placebo (analiza PP). W grupie dziewcząt nie zaobserwowano istotnych zmian w parametrach immunologicznych.

***Tabela 3**. Częstość występowania objawów URTI i ich brak*

	Analiza PP		*Analiza ITT*	
	Współczynnik zapadalności (95% CI)	*Wartość P*	*Współczynnik zapadalności (95% CI)*	Wartość P
Objawy URTI	0.67 (0.52, 0.86)	0.002	0.68 (0.54, 0.86)	0.002
Indywidualne objawy URTI				
Kichanie	0.29 (0.19, 0.47)	< 0.001	0.35 (0.23, 0.53)	< 0.001
Kaszel	0.55 (0.40, 0.76)	< 0.001	0.60 (0.45, 0.81)	0.001
katar	0.64 (0.47, 0.87)	0.005	0.66 (0.50, 0.89)	0.005
Zatkany nos	1.15 (0.69, 1.91)	0.600	1.01 (0.64, 1.59)	0.966
ból gardła	0.70 (0.39, 1.26)	0.235	0.63 (0.37, 1.08)	0.095
Nieobecność				
Nieobecność w przedszkolu	0.70 (0.55, 0.91)	0.007	0.68 (0.54, 0.87)	0.002

Skróty: CI, przedział ufności; ITT, intention to treat; PP, per protocol; URTI, zakażenie górnych dróg oddechowych.

***Tabela 4**. Czas trwania i częstość występowania LRTI potwierdzonych przez lekarza pediatrę*

	Analiza PP		*Analiza ITT*	
	Placebo (N *=29)*	*Grupa aktywna* (N *=28)*	*Placebo* (N *=33)*	*Grupa aktywna* (N *=33)*
Liczba dni				
Średnia (s.d.), dni	1.0 (3.4)	0.5 (1.8)	0.9 (3.2)	0.9 (3.5)
Średnia różnica (95% CI)	-0.6 (-2.0, 0.8)		0.03 (-1.6, 1.6)	
Wartość P	0.425		0.970	
Współczynnik zapadalności (95% CI)	0.5 (0.1, 2.8)		1.0 (0.2, 4.0)	
Wartość P	0.447		0.989	

Skróty: CI, przedział ufności; ITT, do leczenia; LRTI, zakażenie dolnych dróg oddechowych; PP, per protocol.

Zgodność, ocena diety, zdarzenia niepożądane

Średnia zgodność z produktem dla całej grupy wyniosła 90,8%. Nie zaobserwowano istotnych różnic w nawykach żywieniowych i wzorcach aktywności fizycznej w okresie badania (*P* = 0,625). Dwoje dzieci otrzymujących placebo zgłosiło ból brzucha lub wymioty i wycofało się z badania.

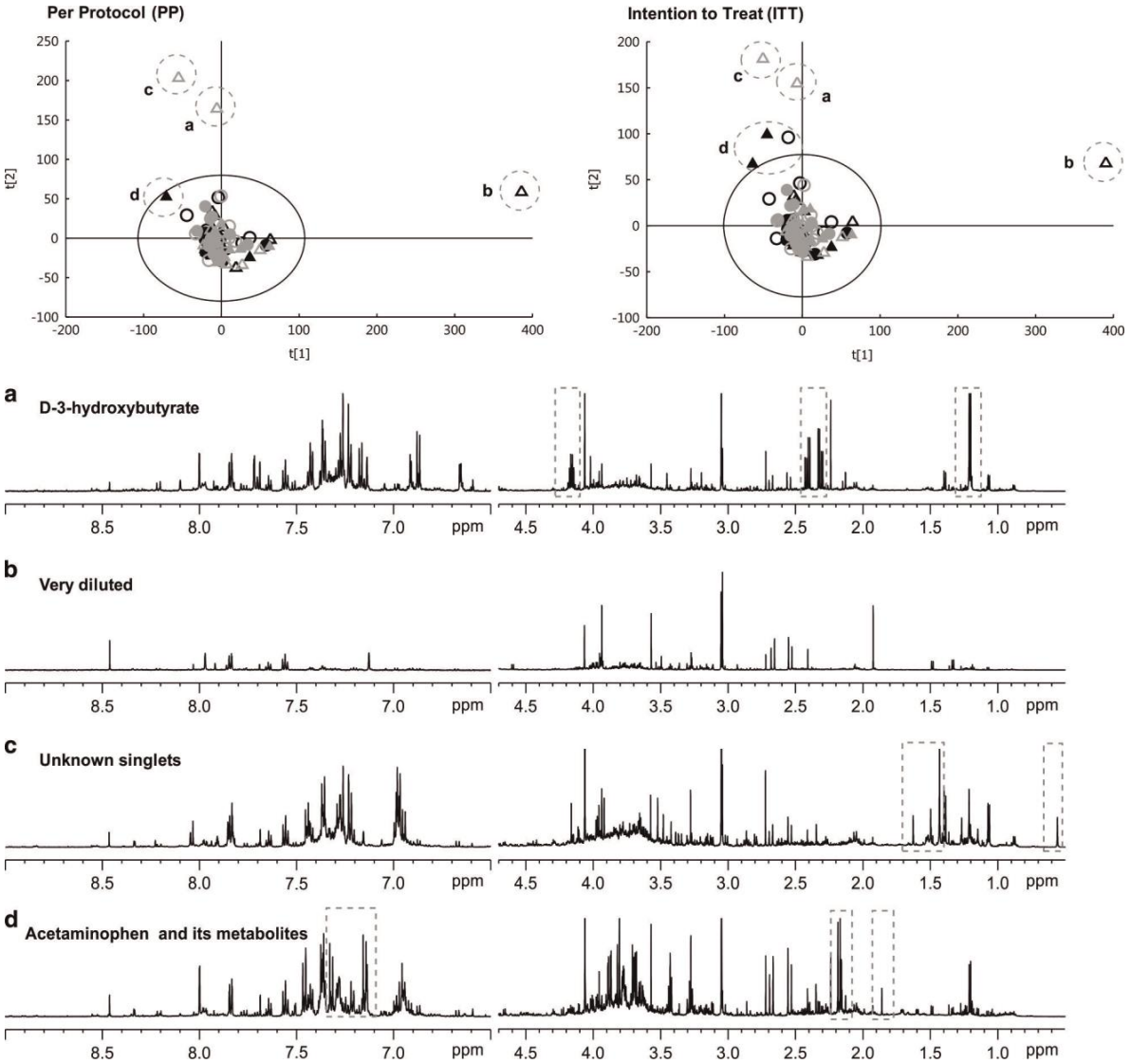
4. Omówienie

Dzieci suplementowane kombinacją konsorcjum probiotyków Lab4 i witaminy C przez 6 miesięcy uczęszczające do placówek przedszkolnych wykazały zmniejszoną częstość występowania i czas trwania objawów URTI. Badania z zastosowaniem samych probiotyków wykazały zmienne wyniki w przypadku URTI, przy czym w niektórych odnotowano znaczące zmniejszenie częstości występowania i czasu trwania[7–11] podczas gdy inne obserwowały niewielki lub żaden efekt.[12,13] Pozytywny wpływ na URTI odnotowano w odpowiedzi na *Lactobacillus casei* DN-114 001, *Lactobacillus rhamnosus* GG oraz dla *Lactobacillus acidophilus* NCFM samodzielnie lub w połączeniu z *Bifidobacterium animalis sp lactis* Bi-07 w dawkach od 10^9 do 10^{10} jednostek tworzących kolonie dziennie[7–11] podczas gdy istnieją ograniczone dowody sugerujące, że suplementacja niską dawką witaminy C (o 0,2 g dziennie) może skrócić czas trwania przeziębienia (omówione przez Hemila *i in.*[14]). Konsorcjum probiotyków w połączeniu z multiwitaminami i minerałami u dorosłych wykazało 13,6% redukcję częstości występowania połączonych objawów URTI i LRTI.[18] W tym badaniu nie stwierdzono wpływu na LRTI lub objawy żołądkowo-jelitowe, chociaż korzyści odnotowano w innych miejscach.[7,8,19,20]

Dzieci otrzymujące kombinację Lab4/witamina C miały mniej dni nieobecności w przedszkolu i nieplanowanych wizyt u lekarza pediatry, co sugeruje, że łączna suplementacja może zmniejszyć ciężkość infekcji. Zmniejszenie nieobecności w przedszkolu odnotowano w przypadku probiotyków[8–10] oraz kombinacji witaminy C (150 mg dziennie), echinacei i propolisu.[20] Mniej dzieci otrzymujących suplement było leczonych doustnymi antybiotykami, podobnymi do tych, które zaobserwowano w innych badaniach probiotyków,[8,10] i nastąpiło znaczne zmniejszenie liczby dni, w których stosowano leki na kaszel, co podkreśla potencjalne korzyści społeczno-ekonomiczne związane z suplementem kombinowanym.

Metabonomia to nowe podejście zapewniające systematyczną analizę produktów chemicznych lub metabolitów w próbkach biologicznych, takich jak mocz, krew i kał, i jest uważana za bardzo czułą miarę fenotypu organizmu.[21] W tym badaniu nie zaobserwowano zmian w profilach metabolitów w moczu zdrowych dzieci w wieku przedszkolnym pomiędzy grupą placebo i grupą aktywną. Główne metabolity zidentyfikowane w danych spektralnych ^{1}H NMR zgadzały się z tymi obserwowanymi u zdrowych dzieci.[22]

Zarówno probiotyki, jak i witamina C są znane z modulowania układu odpornościowego,[23,24] i kombinacja ta prawdopodobnie pośredniczy w odpowiedzi poprzez immunomodulację, chociaż brak istotnych zmian w poziomie cytokin pomiędzy grupą aktywną i placebo w naszym badaniu może sugerować istnienie alternatywnego mechanizmu. Chociaż nie było istotnych różnic w poziomie IgA w ślinie pomiędzy grupą aktywną a placebo, Cáceres *i in.*[13] zaobserwowali zwiększony poziom IgA w kale u dzieci suplementowanych *Lactobacillus rhamnosus* HN001, ale nie byli w stanie powiązać tego z jakąkolwiek poprawą objawów URTI. Tendencja do obniżenia poziomu IL-2/IL-5 i IFN-γ może sugerować przesunięcie w kierunku stanu przeciwzapalnego w grupie suplementowanej i jest to zgodne ze zdolnościami zarówno konsorcjum Lab4, jak i witaminy C do indukowania odpowiedzi przeciwzapalnej w komórkach odpornościowych pobranych z krwi osób zdrowych.[16,17]



***Rycina 2**. Górne wykresy ilustrują wykresy wyników PCA uzyskane z widm ^{1}H NMR próbek moczu pobranych od dzieci na poziomie podstawowym (czarny) i po 6 miesiącach interwencji (szary) w analizach per protocol (PP) i intention to treat (ITT), odpowiednio. Otwarte trójkąty dla dziewcząt z grupy placebo; zamknięte trójkąty dla dziewcząt z grupy aktywnej; otwarte koła dla chłopców z grupy placebo; zamknięte koła dla chłopców z grupy aktywnej. Obserwuje się sześć silnych wartości odstających, a ich widma NMR są pokazane w panelach a-d. Wartość odstająca (a) zawiera wysokie stężenie D-3-hydroksymaślanu. Wartość odstająca (b) wynika z ekstremalnego rozcieńczenia próbki. Wartość odstająca (c) pokazuje zestaw nieznanych singletów przy 0,54, 0,43 i 1,62 p.p.m. Grupa (d) wykazuje sygnały acetaminofenu i jego metabolitów.*

Analiza podgrup naszej populacji na podstawie płci ujawniła zmniejszone objawy URTI u chłopców, które odpowiadały zmniejszonym poziomom osoczowym IL-12p70, IL-12p70/IL-10, IL-2/IL-10 i IL-12/IL-5, wskazując na bardziej przeciwzapalny podstawowy status immunologiczny. Pozytywny wpływ zarówno probiotyków, jak i witaminy C na RTI zaobserwowano u dorastających i dorosłych mężczyzn,[25–27] i wiadomo, że geny immunomodulacyjne specyficzne dla chromosomu X pośredniczą w męskich odpowiedziach immunologicznych w okresie prepubescencji.[28]

Ponieważ było to badanie pilotażowe z małą liczbą uczestników, nie miało ono mocy pozwalającej na wykrycie wszystkich statystycznie istotnych różnic, a brak chęci oddania krwi lub śliny zmniejszył liczebność próby dla analizy drugorzędowego punktu końcowego. W badaniu tym nie oceniano również wpływu interwencji w momencie wystąpienia zakażenia.

5. Wnioski

Suplementacja konsorcjum probiotycznego składającego się z *L. acidophilus* CUL21 i CUL60, *Bifidobacterium bifidum* CUL20, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* CUL34 oraz witaminy C może stanowić strategię redukcji częstości występowania URTI u dzieci 3-6-letnich uczęszczających do placówek przedszkolnych. Wyniki te są zachęcające i wymagają potwierdzenia w większej populacji badawczej.

Konflikt interesów

Badanie było sponsorowane przez Cultech Ltd, UK. IG, DRM i SFP są pracownikami Cultech Ltd i nie mieli udziału w rekrutacji, zbieraniu danych i analizie. Pozostali autorzy nie deklarują konfliktu interesów.

Podziękowania

Dziękujemy J Karácsony MD, P Lukács MD, G Miškejová MD, A Žemberová MD, Ľ Chandogová, D Opalená, A Kissová, B Rásóová, K Farkasová, Ľ Zámečníková i M Lengyelová za doskonałą pomoc kliniczną i techniczną oraz wszystkim dzieciom i rodzicom, którzy uczestniczyli w badaniu.

Wkład autorów

IG i JM byli odpowiedzialni za projekt badania, interpretację danych po analizie statystycznej i napisanie manuskryptu; ZN był odpowiedzialny za rekrutację, ocenę kliniczną i zbieranie danych; JL był odpowiedzialny za analizę metabolitów, interpretację danych i napisanie sekcji metabonomicznych; ZO przyczynił się do zbierania danych; DRM przyczynił się do interpretacji danych immunologicznych; DW przeprowadził analizę statystyczną; a SFP i ZĎ przyczynili się do projektu badania, dokumentów komisji etycznej i koordynacji badania. Wszyscy autorzy pomagali w recenzowaniu manuskryptu i zatwierdzili ostateczny manuskrypt.

Bibliografia

1. Hollinghurst S, Gorst C, Fahey T, Hay AD. Measuring the financial burden of acute cough in pre-school children: a cost of illness study. BMC Fam Pract 2008; 9: 10.
2. Dales RE, Cakmak S, Brand K, Judek S. Respiratory illness in children attending daycare. Pediatr Pulmonol 2004; 38: 64–69.
3. Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. Int J Antimicrob Agents 2009; 343: e191–110.
4. Ballengee CR, Turner RB. Supportive treatment for children with the common cold. Curr Opin Pediatr 2014; 26: 114–118.
5. Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. Cochrane Database Syst Rev 2011; 9: CD006895.
6. FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organisation: Cordoba, Argentina. Available at: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/ a0512e/a0512e00.pdf. 2001.
7. Merenstein D, Murphy M, Fokar A, Hernandez RK, Park H, Nsouli H et al. Use of a fermented dairy probiotic drink containing Lactobacillus casei (DN-114 001) to decrease the rate of illness in kids: the DRINK study. A patient-oriented, doubleblind, cluster-randomized, placebo-controlled, clinical trial. Eur J Clin Nutr 2010; 64: 669–677.
8. 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 2001; 322: 1327.

9. 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 2010; 29: 312–316.
10. Leyer GJ, Li S, Mubasher ME, Reifer C, Ouwehand AC. Probiotic effects on cold and influenza-like symptom incidence and duration in children. Pediatrics 2009; 124: e172–e179.
11. Kumpu M, Lehtoranta L, Roivainen M, Rönkkö E, Ziegler T, Söderlund-Venermo M et al. The use of the probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. J Med Virol 2013; 85: 1632–1638.
12. Agustina R, Kok FJ, van de Rest O, Fahmida U, Firmansyah A, Lukito W et al. Randomized trial of probiotics and calcium on diarrhea and respiratory tract infections in Indonesian children. Pediatrics 2012; 129: e1155–e1164.
13. Caceres P, Montes S, Vega N, Cruchet S, Brunser O, Gotteland M. Effects of Lactobacillus rhamnosus HN001on acute respiratory infections and intestinal secretory IgA in children. J Pediatr Infect Dis 2010; 5: 9.
14. Hemilä H, Chalker E. Vitamin C for preventing and treating the common cold. Cochrane Database Syst Rev 2013; 1: CD000980.
15. Gabryszewski SJ, Bachar O, Dyer KD, Percopo CM, Killoran KE, Domachowske JB et al. Lactobacillus-mediated priming of the respiratory mucosa protects against lethal pneumovirus infection. J Immunol 2011; 186: 1151–1161.
16. Hepburn NJ, Garaiova I, Williams EA, Michael DR, Plummer S. Probiotic supplement consumption alters cytokine production from peripheral blood mononuclear cells: a preliminary study using healthy individuals. Benef Microbes 2013; 4: 313–317.
17. Härtel C, Strunk T, Bucsky P, Schultz C. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. Cytokine 2004; 27(4-5), 101–106.
18. Winkler P, de Vrese M, Laue C, Schrezenmeir J. Effect of a dietary supplement containing probiotic bacteria plus vitamins and minerals on common cold infections and cellular immune parameters. Int J Clin Pharmacol Ther 2005; 43: 318–326.
19. Lin JS, Chiu YH, Lin NT, Chu CH, Huang KC, Liao KW et al. Different effects of probiotic species/strains on infections in preschool children: a double-blind, randomized, controlled study. Vaccine 2009; 27: 1073–1079.
20. Cohen HA, Varsano I, Kahan E, Sarrell EM, Uziel Y. 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. Arch Pediatr Adolesc Med 2004; 158: 217–221.
21. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C et al. The human urine metabolome. PLoS One 2013; 8: e73076.
22. Gu H, Pan Z, Xi B, Hainline BE, Shanaiah N, Asiago V et al. 1H NMR me study of age profiling in children. NMR Biomed 2009; 22: 826–833.
23. Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. Pediatrics 2012; 129: 950–960.
24. Maggini S, Wenzlaff S, Hornig D. Essential role of vitamin C and zinc in child immunity and health. J Int Med Res 2010; 38: 386–414.
25. West NP, Pyne DB, Cripps AW, Hopkins WG, Eskesen DC, Jairath A et al. Lactobacillus fermentum (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. Nutr J 2011; 10: 30.
26. Baird IM, Hughes RE, Wilson HK, Davies JE, Howard AN. The effects of ascorbic acid and flavonoids on the occurrence of symptoms normally associated with the common cold. Am J Clin Nutr 1979; 32: 1686–1690.
27. Constantini NW, Dubnov-Raz G, Eyal BB, Berry EM, Cohen AH, Hemilä H. The effect of vitamin C on upper respiratory infections in adolescent swimmers: a randomized trial. Eur J Pediatr 2011; 170: 59–63.
28. Casimir GJ, Heldenbergh F, Hanssens L, Mulier S, Heinrichs C, Lefevre N et al. Gender differences and inflammation: an in vitro model of blood cells stimulationin prepubescent children. J Inflamm (Lond) 2010; 7: 28.